



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Clonagem, expressão e estudo de alguns cDNAs codificando proteínas estruturalmente relacionadas às alfa neurotoxinas da glândula de veneno da cobra coral *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae).

**Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

**São Paulo**

**Fevereiro de 2002**

### Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P949c Prieto da Silva, Álvaro Rossan de Brandão  
Clonagem, expressão e estudo de alguns cDNAs  
codificando proteínas estruturalmente relacionadas às alfa  
neurotoxinas da glândula de veneno da cobra coral *Micrurus  
corallinus* (Serpentes, Elapidae) / Álvaro Rossan de  
Brandão Prieto da Silva. -- São Paulo, 2002.  
173p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade  
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Ho, Paulo Lee

1 . Biologia molecular. 2. Toxina : Proteína : Toxicologia  
3. Serpente : Toxicologia. I. T. II. Ho, Paulo Lee, orientador.

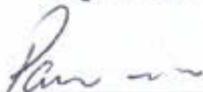
574.88 CDD

"Clonagem, Expressão e Estudo de Alguns  
cDNAs Codificando Proteínas Estruturalmente  
Relacionadas às Alfa Neurotoxinas da Glândula de  
Veneno da Cobra Coral *Micrurus corallinus*  
(Serpentes, Elapidae)"

**ÁLVARO ROSSAN DE BRANDÃO PRIETO DA SILVA**

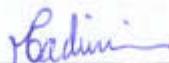
*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área Bioquímica*

**Aprovado por:**



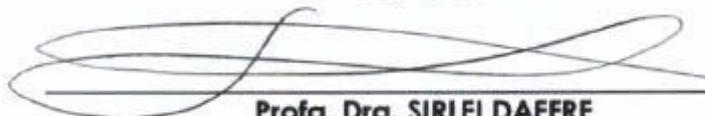
---

**Prof. Dr. PAULO LEE HO**  
IQ – USP  
(Orientador e Presidente)



---

**Prof. Dra. MARIA TERESA MACHINI DE MIRANDA**  
IQ – USP



---

**Prof. Dra. SIRLEI DAFFRE**  
ICB – USP



---

**Prof. Dr. MARCELO PORTO BEMQUERER**  
UFMG



---

**Prof. Dra. ANA MARIA MOURA DA SILVA**  
IB

SÃO PAULO  
28 DE JANEIRO 2002.

AGRADECIMENTOS .....	1
SUMMARY .....	4
RESUMO .....	5
ABREVIATURAS MAIS USADAS .....	6
INTRODUÇÃO.....	9
As Serpentes e seus Venenos .....	9
As Serpentes Elapídicas .....	9
As Cobras Corais .....	10
A Coral da Mata Atlântica ( <i>Micrurus corallinus</i> ).....	11
O Envenenamento por Corais .....	11
A Farmacologia do Veneno .....	12
Imunologia do Veneno .....	13
Bioquímica do Veneno .....	14
Uma Longa Tradição no Estudo dos Venenos Elapídicos .....	14
A Classificação Estrutural das Toxinas .....	16
As Fosfolipases .....	16
Fatores que Afetam o Complemento.....	17
Inibidores Enzimáticos.....	17
A Família das Proteínas em Forma de Três Dígitos .....	18
1. Alfa – Neurotoxinas.....	18
1.1. $\alpha$ - Neurotoxinas Curtas .....	19
1.2. $\alpha$ - Neurotoxinas Longas .....	19
2. $\kappa$ - Neurotoxinas ou Toxinas Neurais .....	20
3. Citotoxinas ou Cardiotoxinas .....	20
4. Fasciculinas ou Anticolinesterases .....	21
5. Toxinas Muscarínicas .....	21
6. Toxinas Bloqueadoras de Canais de Cálcio do Tipo – L .....	21
7. Mambinas.....	22
8. Toxinas Sinérgicas.....	22
9. Homólogos das $\alpha$ - Neurotoxinas Longas .....	22
10. Proteínas com Estrutura em Três Dígitos Não Elapídicas .....	23
10.1 Família Ly-uPAR e inibidores de PLA <sub>2</sub> tipo $\gamma$ .....	23
10.2 Proteínas em forma de três dígitos no sistema nervoso central.....	24
A Biologia Molecular .....	25
A Biologia Molecular das Toxinas em Três Dígitos.....	25

Uma Nova Abordagem para o Estudo do Veneno de <i>Micrurus corallinus</i> .....	28
OBJETIVOS GERAIS .....	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
MATERIAL & MÉTODOS.....	31
1 Análise da Sequência de cDNA.....	31
1.1 Composição de Aminoácidos e Estrutura.....	31
1.2 Determinação do Peptídeo Sinal.....	31
1.3 Similaridade e Alinhamento .....	31
1.4 Filogenias.....	34
1.5 Modelo Tridimensional .....	35
2 Estratégia de Clonagem, Expressão e Purificação .....	36
2.1 Tipos de Vetores e Primers Utilizados.....	36
2.1.1 pRSETC-nxh8M e pRSETB-SSnxh8 .....	36
2.1.2 pCP-NXH8.....	38
2.1.3 pEZZ-NXH8 .....	39
2.1.4 pRSETB-ZZNXH8.....	39
3 Protocolos de Biologia Molecular .....	40
4 Seleção dos Clones Recombinantes.....	40
4.1 Por Tamanho.....	40
4.2 Por Análise de Restrição.....	41
5 Seqüenciamento .....	41
6 Expressão e Obtenção das Proteínas Recombinantes.....	42
6.1 Lise Bacteriana .....	42
6.2 Choque Osmótico .....	42
6.3 Isolamento dos Corpúsculos de Inclusão.....	43
7 Purificação e Renaturação das Proteínas Recombinantes.....	43
7.1 Renaturação de rNXH8 .....	43
7.2 Purificação por Afinidade Metálica .....	43
7.2.1 Purificação de rNXH8.....	44
7.2.2 Purificação de (His)ZZNXH8.....	44
7.3 Diálise.....	44
7.4 Purificação e Renaturação de ZZNXH8 em IgG Sepharose .....	45
8 Análise das Proteínas Recombinantes.....	45
8.1 SDS-PAGE.....	45
8.2 Dosagem de Proteína .....	46

9 Imunização de Camundongos.....	46
10 Elisa.....	46
11 Western Blots .....	47
11.1 Preparo dos Anticorpos para os Western blots.....	47
11.2 Western Blot de Proteínas Recombinantes .....	47
11.3 Venenos e Anticorpos .....	48
11.4 Western blots dos Painéis de Venenos.....	49
12 Ensaio de Ligação em Receptores Nicotínicos de Músculo de Ratos Neonatos .....	49
12.1 Preparo das Vesículas .....	50
12.2 Ensaio de Ligação .....	50
RESULTADOS.....	53
O Clone nxh8 Codifica um Precursor de uma Toxina em Três Dígitos.....	53
NXH8 tem Dez Cisteínas que podem Formar Cinco Pontes Dissulfeto.....	54
Alinhamento de NXH8 com a Família de Toxinas em Três Dígitos.....	54
Dendrograma da Família de Toxinas em Três Dígitos Reflete a Atividade das Toxinas .....	56
As Toxinas com Cinco Pontes Dissulfeto não são um Grupo Homogêneo .....	57
Alinhamento das Toxinas com Ponte Dissulfeto na Primeira Alça.....	58
Dendrograma das Toxinas com Ponte Dissulfeto na Primeira Alça .....	58
Vetores para a Expressão de NXH8 em <i>E. coli</i> .....	59
Somente o Peptídeo Maduro de nxh8 é Expresso.....	60
Os vetores pRSETB-SSnxh8 e pRSETC-nxh8M .....	60
pRSETC-nxh8M Expressa uma Proteína Recombinante em Corpúsculos de Inclusão .....	61
rNXH8 Forma Agregados após a Purificação .....	62
O Vektor pCP-NXH8 .....	62
pCP-NXH8 Expressa uma Proteína de Fusão Solúvel no Citoplasma Bacteriano .....	63
Os Soros Anti – Elapídico e Anti – rNXH8 Reconhecem as Proteínas Recombinantes Expressas por pRSETC-nxh8M e pCP-NXH8 .....	63
Purificação e Renaturação da Proteína rZZNXH8 em IgG - Sepharose.....	63
O Vektor pEZZ-NXH8 Expressa a Proteína de Fusão no Periplasma .....	64
O Vektor pRSET-ZZNXH8 Produz uma Proteína Solúvel com Cauda de Histidinas .....	65
A Proteína Recombinante rNXH8 pode ser Usada como Antígeno .....	66
As Proteínas Recombinantes de Todas as Construções Reagem Contra Soros Homólogos e Heterólogos .....	66
Os Soros Para Os Antígenos Recombinantes tem Reatividade Cruzada Em ELISA.....	66

O Soro Anti – rNXH8 Reconhece uma Proteína do Veneno de <i>Micrurus corallinus</i> e do Veneno de Alguns outros Elapídeos.....	67
Ligação do Veneno de <i>M. corallinus</i> ao Receptor Nicotínico de Acetilcolina do Músculo de Ratos Neonatos .....	69
O Veneno de <i>M. corallinus</i> tem Componentes que se Ligam ao Receptor Muscular de Acetilcolina	69
O Soro anti – rNXH1 não Inibe a Ligação de Componentes do Veneno de <i>M. corallinus</i> ao Receptor Muscular de Acetilcolina.....	70
O Soro anti – rNXH8 Inibe a Ligação de Componentes do Veneno de <i>M. corallinus</i> ao Receptor Muscular de Acetilcolina.....	71
DISCUSSÃO .....	72
Expressão Renaturação e Purificação .....	72
Características Imunorreativas de rNXH8.....	74
O Soro Anti – rNXH8 Impede a Ligação das $\alpha$ - Neurotoxinas do Veneno de <i>M. corallinus</i> ao nAChR do Músculo de Camundongos Neonatos. ....	75
Comparação de NXH8 com outras Toxinas em Três Dígitos.....	76
Aminoácidos Invariantes e Funcionais das $\alpha$ - Neurotoxinas.....	79
O Sítio Funcional da Erabutoxina a e da $\alpha$ - Cobratoxina em Comparação com NXH8.....	81
A Primeira Alça.....	82
A Segunda Alça.....	85
A Terceira Alça.....	89
A Cauda C-terminal. ....	89
Resíduos Importantes para Ligação ao nAChR Muscular.....	90
NXH8 tem os Principais Resíduos do Sítio Funcional de Ligação das $\alpha$ - Neurotoxinas ao nAChR	91
CONCLUSÕES .....	99
FIGURAS .....	100
FIGURA 01: A cobra coral <i>Micrurus corallinus</i> . ....	100
FIGURA 02: Dentição de serpentes.....	100
FIGURA 03: Toxinas de serpentes com estrutura em três dígitos e seus alvos. ....	101
FIGURA 4A: Modelos estruturais de algumas proteínas em forma de três dígitos.....	102
FIGURA 04B: Modelos estruturais de algumas proteínas em forma de três dígitos.....	103
FIGURA 05: Organização do cDNA do clone <i>nxh8</i> . ....	104
FIGURA 06: Predição do ponto de clivagem do peptídeo sinal de NXH8.....	105
FIGURA 07: Alinhamento de toxinas elapídicas com estrutura em três dígitos.....	106
Legenda das FIGURAS 07 e 08: Seqüências utilizadas no alinhamento e no dendrograma .....	107
FIGURA 08: Dendrograma da família das toxinas elapídicas com estrutura em três dígitos.....	109

FIGURA 09: Alinhamento de seqüências de toxinas com a quinta ponte dissulfeto na primeira alça. 110	110
Legenda das FIGURAS 09 e 10: Seqüências utilizadas no alinhamento e no dendrograma. ....	111
FIGURA 10: Dendrograma das seqüências com quinta ponte dissulfeto na primeira alça e sua relação com as $\alpha$ - neurotoxinas longas e curtas. ....	113
FIGURA 11: Clone <i>nxh8</i> no vetor pGEM3ZF(+). ....	114
FIGURA 12: O vetor pRSET B – SSnxh8.....	115
FIGURA 13: O vetor pRSET C – nxh8M.....	116
FIGURA 14: Expressão de pRSET C – nxh8M e pRSET B – SSnxh8 em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	117
FIGURA 15: Purificação por afinidade metálica da proteína recombinante expressa pelo vetor pRSET C – nxh8M em <i>E. coli</i> BL21(DE3). ....	118
FIGURA 16: Protocolo de renaturação e purificação da proteína recombinante rNXH8 expressa pelo vetor pRSET C – nxh8M em <i>E. coli</i> BL21(DE3) em cromatografia de afinidade metálica por Níquel – Sepharose. ....	119
FIGURA 17: Purificação da proteína recombinante rNXH8 expressa por pRSET C – nxh8M em <i>E. coli</i> BL21(DE3) após protocolo de renaturação. ....	120
FIGURA 18: Formação de agregados na diálise de rNXH8 expresso por pRSET C – nxh8M em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	121
FIGURA 19: O vetor pCP – NXH8. ....	122
FIGURA 20: Análise de restrição do vetor pCP – NXH8.....	123
FIGURA 21: Expressão de pCP – NXH8 em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	124
FIGURA 22: Localização e solubilidade da proteína de fusão ZZNXH8 expressa por pCP – NXH8 e de rNXH8 expressa por pRSET C – nxh8M em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	125
FIGURA 23: Western blot com soro anti – elapídico do Instituto Butantan e soro de camundongo anti – rNXH8. ....	126
FIGURA 24: Protocolo de renaturação e purificação da proteína de fusão recombinante rZZNXH8 expressa pelo vetor pCP – NXH8 em <i>E. coli</i> BL21(DE3) por cromatografia de imunoafinidade IgG – Sepharose.....	127
FIGURA 25: Purificação da proteína recombinante renaturada rZZNXH8 expressa por pCP – NXH8 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em cromatografia de imunoafinidade por IgG – Sepharose. ....	128
FIGURA 26: O vetor pEZZ - NXH8.....	129
FIGURA 27: Expressão e western blot da proteína recombinante expressa por pEZZ – NXH8 em <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . ....	130
FIGURA 28: O vetor pRSET B - ZZNXH8. ....	131
FIGURA 29: Análise de restrição do vetor pRSET B – ZZNXH8.....	132
FIGURA 30: Expressão de pRSET B – ZZNXH8 em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	133

FIGURA 31: Protocolo de purificação da proteína de fusão recombinante (His)ZZNXH8 expressa pelo vetor pRSET B – ZZNXH8 em <i>E. coli</i> BL21(DE3), por cromatografia de afinidade a Ni <sup>2+</sup> - Sepharose.....	134
FIGURA 32: Purificação da proteína de fusão recombinante (His)ZZNXH8 expressa por pRSET B – ZZNXH8 em <i>E. coli</i> BL21(DE3) por cromatografia de afinidade metálica em Ni <sup>2+</sup> - Sepharose. ....	135
FIGURA 33: Imunorreatividade do soro anti – elapídico e anticorpos de camundongos antitoxinas recombinantes em western blots contendo extratos dos sistemas de expressão de NXH8. ....	136
FIGURA 34: Resultados do ELISA para determinação dos títulos dos soros. ....	137
FIGURA 35: Imunorreatividade dos soros contra as proteínas recombinantes rNXH8 e rNXH1 e de alguns soros contra venenos de serpentes do gênero <i>Micrurus</i> frente a diversos venenos homólogos e heterólogos. ....	138
FIGURA 36: Ensaio de inibição da competição do veneno de <i>Micrurus corallinus</i> com <sup>125</sup> I - $\alpha$ - Bungarotoxina pelo receptor nicotínico de acetilcolina do músculo esquelético de ratos neonatos. ....	139
FIGURA 37: Aminoácidos responsáveis pelo sítio de ligação das $\alpha$ - neurotoxinas ao receptor nicotínico de acetilcolina do músculo esquelético. ....	140
FIGURA 38: Modelo estrutural da erabutoxina a mostrando seu sítio funcional. ....	141
FIGURA 39: Modelo estrutural da $\alpha$ - cobratoxina mostrando seus sítios funcionais. ....	142
FIGURA 40: Sobreposição dos sítios funcionais da $\alpha$ - cobratoxina que interagem com os subtipos de receptor de acetilcolina muscular e $\alpha$ 7 – neuronal.....	143
FIGURA 41: Modelo tridimensional de NXH8 ilustrando o possível sítio funcional.....	144
TABELAS .....	145
TABELA 01: Seqüências similares ao precursor de NXH8 MICCO.....	145
TABELA 02: Seqüências similares ao peptídeo maduro NXH8 .....	146
TABELA 03: Vetores recombinantes utilizados para expressar NXH8 em <i>E. coli</i> .....	147
TABELA 04: Ensaio de inibição por competição do veneno de <i>M. corallinus</i> com <sup>125</sup> I- $\alpha$ - Bungarotoxina pelo receptor nicotínico de acetilcolina do músculo esquelético de ratos neonatos e neutralização por anticorpos contra as toxinas recombinantes.....	148
BIBLIOGRAFIA.....	149



## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Lee Ho, pela orientação, dedicação e inestimável amizade. O empenho dele neste projeto supera em muito o usual. Sua abordagem pioneira e criativa no estudo do veneno da coral resultou em frutos surpreendentes. A ele agradeço ter sido convidado para trabalhar com biologia molecular de toxinas de serpentes no Butantan. Foi inestimável na minha formação ter participado da gênese desse laboratório.

À Jane Silveira, minha parceira neste estudo das toxinas da coral, sou muito grato por tudo que ela compartilhou comigo, o enorme apoio, a incrível colaboração neste trabalho a quatro mãos, somente possível a uma grande amiga e incentivadora.

À Úrsula Oliveira, que me acompanhou neste trajeto, pela sua amizade, apoio moral e colaboração sempre divertida no trabalho diário do laboratório. Sem o seu trabalho com a fosfolipase da coral, nosso trabalho fica incompleto.

À Patrícia Abreu, com quem este trabalho começou e progrediu.

Ao Inácio Junqueira, com quem compartilho o interesse pelas serpentes.

Ao Gandhi Radis Baptista, pelas discussões e por compartilharmos nosso trabalho e interesse pelas toxinas de serpentes.

Ao Dr. Joaquin Cabrera-Crespo, pela nossa grande amizade e pelo que me ensinou ajudando a purificar e renaturar proteínas.

Ao Professor Isaías Raw, a quem agradeço o irrestrito apoio, incentivo e inestimável orientação.

Ao Dr. Otávio Marques, por tudo que me ensinou sobre as *Micrurus*.

À Dr.<sup>a</sup> Denise Tambourgi, pelo carinhoso apoio e constante incentivo.

Ao Dr. Guiseppe Puerto, por coletar e classificar as serpentes, me ajudar a dissecar as glândulas de veneno e pelas agradáveis discussões sobre herpetologia.

À Dr.<sup>a</sup> Waldelly de Oliveira Dias, pela ajuda nos testes de ELISA e sangria dos camundongos.

À Dr.<sup>a</sup> Regina Markus, por estabelecer em seu laboratório os experimentos de ligação a receptores em que testamos nossas toxinas e anticorpos. E à Dr.<sup>a</sup> Letícia Lotufo e ao Elder por me ajudarem nesses ensaios.

À Dr.<sup>a</sup> Hisako Higashi, ao Dr. Wilson Fernandes, à Dra. Maria de Fátima Furtado, à Dr.<sup>a</sup> Luciana Casais e Silva, à Dr.<sup>a</sup> Josefina Moraes, ao Dr. Marco Antônio Stephano e à Dr.<sup>a</sup> Ivone Yamagushi, pelos venenos tão difíceis de serem obtidos e pelos soros gentilmente cedidos.

Ao Dr. Marcelo Bento Soares, pela biblioteca de cDNA e trabalhos iniciais na clonagem dos constituintes potenciais do veneno de *M. corallinus*.

Ao Dr. André Ménez e ao Dr. Frédéric Ducancel, pelas discussões neste interessante campo de toxinas recombinantes, por todas as sugestões e por terem gentilmente cedido o vetor pCP.

Ao Dr. Oswaldo Vital Brazil, pelas vibrantes e agradáveis conversas que muito me ensinaram. Pelos seus trabalhos sobre o mecanismo de ação dos venenos das *Micrurus*. Que meu trabalho possa agradar o mestre.

A todos os amigos colegas de laboratório e estagiários técnicos que tornam nosso ambiente de trabalho tão divertido, sem os quais não seria possível realizar nossos interesses.

A todo o Centro de Biotecnologia e ao laboratório de seqüenciamento, estou certo de que formamos um grande time.

À FAPESP, CNPq e Fundação Butantan, pelo suporte financeiro.

A toda a minha família, principalmente ao meu pai e à Thereza, pelo apoio irrestrito e compreensão ilimitada. Ao meu irmão Rui, que mesmo do outro lado do Oceano compartilha da mesma empolgação pela ciência. E em especial, ao Cleber, pela nossa grande amizade. Obrigado por acreditarem em mim, estarem sempre presentes, serem tão tolerantes comigo. É por vossa causa que tudo faz sentido.

Ao Professor Tetsuo Yamane, a pessoa mais altruísta e de mais elevados e honestos princípios que tive a fortuna de vir a conhecer e me tornar um grande amigo. Um mestre maravilhoso que compartilha comigo seu enorme amor à ciência e em quem me espelho e me guio para poder seguir na trilha da minha auto realização. Com ele aprendi a manter acesos meus sonhos e a não desistir, por que vale a pena! É um privilégio estar ao lado de um cientista do primeiro time, e saber reconhecida a minha potencialidade.

A este País que me acolheu e me proporcionou uma educação de alto nível e que confia no meu trabalho como cientista. Que eu possa contribuir plenamente, com um Brasil justo e mais feliz.

A este Instituto Butantan, agora centenário! É um privilégio participar de seu corpo. Um sonho em constante realização e ao qual me sinto predestinado.



## SUMMARY

A cDNA sequence encoding a putative new toxin, NXH8, was isolated from the cDNA library constructed from the venom gland of the Brazilian coral snake, *Micrurus corallinus*. This sequence shows a structural similarity with the snake toxin family known as “three-fingered” toxins, a family of toxins with approximately 60 or 70 amino acids and usually 4 or 5 disulfide bonds. Irrespective of whether these proteins are functionally different, their amino acid sequences can be readily aligned, using 8 half-cystines as conserved elements, suggesting the presence of common structural features. The best-known subclass of three-finger-type toxins are the curaremimetic toxins, also called alpha-neurotoxins, found in most venoms from Elapid and Sea snakes. Another toxin with a distinct sequence, known as NXH1 and its isoforms NXH3 and NXH7 had been previously isolated. They belong to the same family of toxins and were characterized from the same cDNA library. In the present study a comparative biochemical, pharmacological and structural analyses of NXH1 and NXH8 are described. Few structural characteristics of NXH8 seem to indicate that it differs from the usual class of alpha – neurotoxins, belonging, possibly, to a new subclass of “three-finger” toxins. The NXH8 protein was expressed in various *E. coli* expression vectors and the resulted recombinant toxin from pRSETC-NXH8 plasmid was used as a “toxoid” for mice immunization. The anti - NXH8 sera, as well as the anti – elapid sera from the Butantan Institute, recognized the recombinant toxin by both ELISA and Western blot assays. In contrast to the claim that anti - NXH1 sera is specific to one component of *M. corallinus*'s venom, the anti – NXH8 sera show cross reactivity to venom of some Neotropical and Old World elapids. The *M. corallinus*'s venom contains alpha – toxins, which inhibit post-synaptic nicotinic acetylcholine receptor of neonatal rat skeletal muscle membrane. The anti - NXH8 serum was capable of blocking the binding of the components of the crude venom to these receptors. In contrast, the anti – NXH1 serum does not show this inhibitory effect. This indicates that either NXH8 presents affinity for muscular nicotinic acetylcholine receptor or it shares a neutralizing epitope also present in *M. corallinus*'s alpha – neurotoxins.

## RESUMO

De uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno da cobra coral brasileira *Micrurus corallinus* foi isolada uma seqüência denominada NXH8. Esta seqüência de cDNA apresenta similaridade estrutural com a família de toxinas de serpentes em “três dígitos” ricas em pontes dissulfeto. A subclasse melhor conhecida nesta família são as alfa - neurotoxinas. Uma outra seqüência distinta, denominada NXH1 e suas isoformas NXH3 e NXH7, foram isoladas anteriormente, pertencem à mesma família de toxinas e estão presentes na mesma biblioteca. Alguns resultados da caracterização de NXH1, são utilizados neste estudo, em comparação com NXH8. Algumas características estruturais tornam a seqüência NXH8 diferente da classe usual das alfa - neurotoxinas, vindo a constituir possivelmente uma nova subclasse da família. A proteína NXH8 foi expressa em diversos vetores de expressão em *Escherichia coli*. A proteína recombinante expressa pelo vetor pRSET C - NXH8, foi utilizada para imunizar camundongos. O soro contra NXH8, assim como o soro anti - elapídico do Instituto Butantan, reconhece a toxina recombinante em ELISA e Western blot. O soro anti - NXH8 detecta apenas uma banda do veneno de *M. corallinus* em Western blot, mas apresenta reatividade cruzada com componentes do veneno de alguns elapídeos neotropicais e do velho mundo. Em contraste, o soro anti - NXH1 é específico para um componente único do veneno de *M. corallinus*. O veneno de *M. corallinus* tem alfa - neurotoxinas que bloqueiam o receptor pós - sináptico nicotínico de acetilcolina nas membranas do músculo esquelético de ratos. O soro anti - NXH8 é capaz de impedir a ligação de componentes do veneno bruto a esses receptores. Já o soro contra NXH1 não apresenta a mesma capacidade inibitória. Isto indica que NXH8 tem afinidade pelo receptor nicotínico muscular de acetilcolina, ou que NXH8 compartilha de um epítipo neutralizante presente também nas alfa - neurotoxinas do veneno da cobra coral *M. corallinus*.

## ABREVIATURAS MAIS USADAS

2YT: Meio de cultura 16g triptona, 10g extrato de levedo, 5g de NaCl.

$\alpha$  - neurotoxinas: Alfa-neurotoxinas.

$\alpha$ Cbt:  $\alpha$  - cobratoxina de *Naja kaouthia* (neurotoxina longa). Número de acesso: P01391 (NXL1 NAJKA).

$\alpha$ BGTx:  $\alpha$  - Bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* (neurotoxina longa) Número de acesso: P01378 (NXL1 BUNMU).

Anti-*M. corallinus*; anti-*M. frontalis*; anti-*M. spixii*: Anticorpos gerados contra os venenos brutos das serpentes, *Micrurus corallinus*, *M. frontalis* e *M. spixii*.

Anti-MIX: Anticorpos gerados em camundongo contra uma mistura 1:1 das proteínas recombinantes purificadas rNXH8 e rNXH1 expressas em *E. coli*.

Anti-NXH1 e anti-NXH8: Anticorpos gerados em camundongo contra as proteínas recombinantes purificadas rNXH1 e rNXH8 expressas em *E. coli*.

(His)ZZNXH8: Proteína recombinante expressa por pRSETB-ZZNXH8 purificada em Ni - Sepharose.

$\beta$ ME: Beta mercaptoetanol.

AChR: “*Acetylcholine Receptor*”. Receptor de Acetilcolina.

BamH I: Endonuclease de restrição I de *Bacillus amyloliquefaciens* H.

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato.

Bgl II: Endonuclease de restrição I de *Bacillus globigii*.

BSA: Albumina sérica bovina.

cDNA: DNA complementar.

Cla I: Endonuclease de restrição I de *Caryophanon latum* L.

CNBr: “*Cyanogen Bromide*”. Brometo de Cianogênio.

CVF: “*Cobra Venom Factor*”. Fator do Veneno de Cobra.

DAB: Tetrahydrocloridrato de 3,3'-diaminobenzidina.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

dNTPs: Deoxinucleotídeos trifosfatos.

ddNTPS: Dideoxinucleotídeos trifosfato.

Ea: Erabutoxina a de *Laticauda semifasciata* (neurotoxina curta). Número de acesso: P01435 (NXS1 LATSE).

EcoR I: Endonuclease de restrição I de *Escherichia coli*.

EDTA: Ácido Etilenodiamina tetracético.

- ELISA: “*Enzyme linked immunosorbent assay*”. Ensaio de adsorção imuno - enzimático.
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol.
- GSH: Glutathiona reduzido.
- GSSG: Glutathiona oxidado.
- Hind III: Endonuclease de restrição III de *Haemophilus influenzae* Rc.
- HPLC: “*High performance liquid chromatography*”. Cromatografia líquida de alta performance.
- IgG: Imunoglobulina G.
- i.m.: Inoculação intramuscular.
- i.p.: Inoculação intra peritonial.
- i.v.: Inoculação intravenosa.
- IPTG: Isoprípil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo.
- kDa: Quilo Dalton.
- Kpn I: Endonuclease de restrição I de *Klebsiella pneumoniae* OK8.
- krpm: Rotações por minuto x 1000.
- LB: Meio de Luria (10g de triptona, 5g de extrato de levedo, 10g de NaCl)
- LB-AMP: Meio de Luria com ampicilina (100  $\mu$ g/ml).
- LD<sub>50</sub>: Dose letal 50.
- MACHR: Receptor muscarínico de acetilcolina.
- Met: Metionina.
- mRNA: RNA mensageiro.
- nACHR: Receptor nicotínico de acetilcolina.
- NBT: Nitroblue tetrazolium ou 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenilileno)-bis-2-(p-nitrofenil)-2H-tetrazolium cloridrato.
- Nde I: Endonuclease de restrição I de *Neisseria denitrificans*.
- NGF: “*Nerve Growth Factor*”. Fator de crescimento de nervo.
- Ni - Sepharose: Resina cromatográfica quelante carregada de íons Ni<sup>2+</sup>.
- Nmm I: Toxina  $\alpha$  de *Naja mossambica mossambica* (neurotoxina curta). Número de acesso: P01431.
- NXH1 MICCO: “*Micrurus corallinus* neurotoxin homolog 1”. Homólogo 1 de alpha neurotoxina de *M. corallinus*.
- NXH8 MICCO: “*Micrurus corallinus* alpha neurotoxin homologue 8”. Homólogo 8 de alfa neurotoxina de *M. corallinus*. Número de acesso: AJ344067.
- OPD: o-dihidrocloreto de fenilenodiamina
- PALP: fosfatase alcalina.
- pb.: Pares de bases.
- PBS: “Phosphate Buffered Saline”. Salina tamponada com fosfato.

PBT: “Phosphate buffered Tween”. Tampão fosfato 100mM com 0,1% Tween 20.

PCR: “*Polimerase chain reaction*”, Reação em cadeia da polimerase.

pH: - log da concentração do íon hidrogênio.

pI: Ponto isoelétrico.

PLA<sub>2</sub>: “*Phospholipase A2*”, Fosfolipase A2.

PMSF: fenilmetil-sulfonil fluoridrato.

Pst I: Endonuclease de restrição I de *Providencia stuartii*.

RNA: Ácido Ribonucléico.

rNXH8: Proteína recombinante expressa pelo vetor pRSETC-nxh8M purificada em Ni - Sepharose.

rZZNXH8: Proteína recombinante expressa pelo vetor pCP-NXH8 purificada em IgG - Sepharose.

s.c.: Inoculação subcutânea.

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

SLR: Sítio de ligação ao ribossomo.

TBE: Tampão Tris-borato 89 mM pH8,9 EDTA 2mM.

Xba I: Endonuclease de restrição I de *Xanthomonas badrii*.

Xho I: Endonuclease de restrição I de *Xanthomonas holcicola*.

ZZ: Domínios Zeta, domínios sintéticos baseados no domínio B da proteína A de *Staphylococcus aureus* com afinidade por IgGs.



## INTRODUÇÃO

### As Serpentes e seus Venenos

As serpentes usam venenos para paralisar e matar suas presas, ou para se defenderem de seus predadores. O veneno é produzido na glândula de veneno que são especializações das glândulas salivares. Assim, parte dos componentes do veneno tem relação com enzimas digestivas, (KOCHVA et al., 1983). São compostos principalmente por polipeptídeos (95% do peso seco), alguns com funções enzimáticas participam da digestão das presas exercendo ações hidrolíticas que facilitam a absorção e distribuição dos componentes tóxicos do veneno no tecido da presa (HIDER et al., 1991; BON, 1991). Algumas dessas enzimas provocam danos locais aos capilares, necrose tissular, hemorragia e dor, mas nem todos os polipeptídeos presentes no veneno são enzimas ou exercem funções tóxicas.

As toxinas desses venenos têm ações rápidas e seletivas muito potentes, interferindo em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares muito específicos. Esses componentes tóxicos atuam direta ou indiretamente, sozinhos ou em associação com outros compostos, perturbando o funcionamento dos nervos, músculos ou do sistema cardiovascular, contribuindo para a imobilização da presa (MÉNEZ, 1996). Cada veneno apresenta uma ação peculiar, característica da espécie de serpente, que é decorrente do tipo de toxinas que o compõem e cuja toxicidade é dirigida a um determinado tipo específico de presa. Entretanto, o veneno também pode agir de forma eficaz em outros alvos da dieta ou possíveis predadores da serpente. Assim as toxinas exibem muitas ações biológicas diversas e complexas.

### As Serpentes Elapídicas

Entre as mais de 3.200 espécies de serpentes existentes, apenas 420 espécies são venenosas. Ou seja, utilizam seu veneno para caçar e são capazes de inoculá-lo (DOWLING & DUELLMAN, 1978). A família de serpentes *Elapidae* é amplamente distribuída por toda a faixa intertropical do planeta habitando ambientes terrestres ou aquáticos, inclusive marinhos. Forma o principal grupo de serpentes venenosas e é composta por cerca de 300 espécies distribuídas em 62 gêneros (SLOWINSKI et al., 1997). A esta família pertencem as cobras corais brasileiras do gênero *Micrurus* e a serpente coral da mata atlântica *M. corallinus*, da qual tratamos aqui (FIGURA 01). Estas serpentes têm uma dentição dita proteróglifa, ou seja, os dentes inoculadores são frontais e possuem um sulco anterior por onde escorre o veneno. A maxila é fixa e não permite o deslocamento dos dentes inoculadores, (FIGURA 02C). O veneno dos

elapídeos caracteriza-se por ter ações neurotóxicas evidentes. A família se subdivide em duas importantes subfamílias:

1. Subfamília *Hydrophiinae*; nela se incluem as serpentes terrestres australianas e melanésias da tribo *Oxyuranini*, compreendendo serpentes do gênero *Acanthophis* (“Death adders”), *Oxyuranus* (“Taipans”) e *Notechis* (“Tiger snakes”), entre outras, e as serpentes marinhas verdadeiras da tribo *Hydrophiini*, tais como *Aypisurus*, *Pelamys* (serpente marinha pelágica) e *Lapemis*, entre outras.
2. Subfamília *Elapinae*; que contém todos os elapídeos terrestres Asiáticos e Africanos, tais como as serpentes do gênero *Bungarus* (“Kraits”), as *Najas* (Cobras), *Dendroaspis* (Mambas), entre outras. São também desta subfamília as serpentes marinhas do gênero *Laticauda* (“Sea kraits”), e os elapídeos Americanos do gênero *Micrurus* (Cobras Corais Verdadeiras).

## As Cobras Corais

As cobras corais venenosas são os únicos elapídeos do Novo Mundo, compreendendo três gêneros: *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (SLOWINSKI, 1995). O gênero *Micrurus* (*micro* = pequeno e *urus* = cauda) possui 53 espécies e 120 subespécies (ROZE, 1982; CAMPBELL & LAMAR, 1989). Essas serpentes são essencialmente uma radiação neotropical das serpentes proteróglifas elapídicas do Velho Mundo ocorrida durante o Mioceno (CADLE & SARICH, 1981). As *Micrurus* têm ampla distribuição geográfica, sendo encontradas desde o sudoeste do Estados Unidos, passando pela América Central até o centro sul da Argentina (DOWLING & DUELLMAN, 1978).

As Corais são reconhecidas pelo padrão colorido característico (anéis pretos, vermelhos e brancos ou amarelos, ver a FIGURA 01). Não têm fosseta loreal e a cabeça é coberta por placas formadas por grandes escamas. A dentição é proteróglifa (FIGURA 02C). Seus hábitos são semi – fossoriais, passando boa parte do tempo enterradas no solo ou sob cobertura foliar do solo em ambientes florestais pouco alterados pela presença humana. São serpentes pequenas, indo de 60 cm até 1,60 m nos espécimes adultos de maior porte. As corais venenosas são chamadas de corais verdadeiras em contraposição às corais – falsas. As falsas corais são serpentes colubrídeas não peçonhentas que mimetizam o padrão cromático de uma determinada espécie de coral. Muitas espécies de serpentes apresentam uma coloração de camuflagem com o ambiente dificultando a localização visual pelos predadores. Já as corais verdadeiras, por serem muito venenosas, utilizam uma estratégia diferente exibindo uma coloração de alerta. Dessa maneira, o

eventual predador é avisado do risco que a serpente representa e evita então capturar as serpentes com o padrão de anéis vermelhos, pretos e brancos. As corais – falsas imitam esse padrão colorido das *Micrurus* como estratégia de defesa procurando enganar e afastar o predador (MARQUES & PUORTO, 1991). É bastante difícil distinguir à primeira vista as corais – falsas das verdadeiras, devido à sobreposição da distribuição geográfica e à semelhança do padrão colorido, entretanto as corais – falsas não são elapídeos e não representam perigo quanto à possibilidade de inoculação de veneno em humanos.

As corais venenosas costumam ser pouco agressivas, não atacando o homem através de botes, tendo sido responsáveis por apenas 0,47% de um total de 70.600 casos de acidentes ofídicos registrados no Brasil entre junho de 1986 e dezembro de 1989 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1990). No Brasil são notificados anualmente cerca de 20.000 acidentes com serpentes venenosas, com uma letalidade em torno de 0,43%. Em cerca de 19% dos óbitos não são informados os gêneros das serpentes envolvidas nos acidentes. Os acidentes com serpentes corais, notificados pelos centros de saúde oficiais, têm uma mortalidade de 0,36%. A *M. corallinus* é a que tem causado maior número de acidentes, dentre os poucos casos registrados em São Paulo e Santa Catarina. Na Bahia, a maioria dos acidentes é devido a *M. ibiboboca* (FUNASA, 1998). A maioria dos acidentes acontece por manuseio das cobras ou quando são pisoteadas com o pé descalço. Porém, quando ocorrem, os acidentes costumam ser graves, causando morte por asfixia após 5 ou 6 horas (VITAL BRAZIL, 1980).

### **A Coral da Mata Atlântica (*Micrurus corallinus*)**

A espécie de cobra coral *Micrurus corallinus* (FIGURA 01) está presente em regiões florestais da Mata Atlântica. O estudo da ecologia da serpente (MARQUES, 1992) mostrou que, ao contrário da maioria das cobras corais, essa espécie apresenta maior atividade no período diurno. Os espécimes variam de 190 a 1040 mm. Sua dieta é composta de lagartos ápodes (cobras cegas), principalmente de anfisbenídeos dos gêneros *Leposternon* e *Amphisbaena* (70%), anfíbios gimnofionos da família *Caeciliidae* (10%), além de outros lagartos (MARQUES & SAZIMA, 1997). Também fazem parte da sua dieta outras serpentes, principalmente da família *Colubridae* sendo por isto, consideradas ofiófagas. Não se pode excluir que *M. corallinus* se alimente também de pequenos roedores neonatos. Neste caso, como a estrutura óssea não está totalmente formada, não há registro estomacal.

### **O Envenenamento por Corais**

As duas espécies de corais que mais causam acidentes no Brasil são *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*, pois habitam regiões populosas do centro, sudeste e sul do País. Ambas as serpentes causam

envenenamentos, cuja característica principal é o choque neurotóxico. Em seus trabalhos pioneiros no Instituto Butantan, VITAL BRAZIL foi o primeiro a indicar que a neurotoxicidade do envenenamento por cobras corais do gênero *Micrurus* era distinta da neurotoxicidade verificada no envenenamento por serpentes cascáveis do gênero *Crotalus* (BRAZIL & BRAZIL F°. 1933). Pode-se observar no indivíduo picado, os sinais típicos de acidente neurotóxico: ptose palpebral, diplopia, sialorréia, paralisia flácida dos músculos da face, faringe e laringe, além de dificuldade respiratória. A perda do tônus muscular progride com o tempo e severa dificuldade respiratória se instala devido à paralisia dos músculos intercostais e do diafragma. A paralisia muscular flácida é similar à causada pelo curare. Por analogia, o veneno das corais, tal como das demais serpentes elapídicas, é dito curarizante ou que contém toxinas curarizantes ( $\alpha$  – neurotoxinas). A morte por asfixia sobrevém dentro de quatro a seis horas (VITAL BRAZIL, 1965; VITAL BRAZIL, 1980).

## A Farmacologia do Veneno

Sabe-se, entretanto que as ações dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* são distintas (VITAL BRAZIL, 1987). Ambos atuam na junção neuromuscular (FIGURA 03C), causa evidente de sua ação letal. O veneno de *M. frontalis* apresenta apenas uma ação pós – sináptica curarizante (VITAL BRAZIL et al. 1976/77), enquanto que o veneno de *M. corallinus* tem uma ação pré – sináptica com aumento espontâneo da liberação de acetilcolina associado ao bloqueio pós – sináptico da transmissão elétrica entre o nervo e o músculo (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84). Como o veneno de *M. frontalis* possui apenas ações pós – sinápticas do tipo curarizante, é possível utilizar drogas anticolinesterásicas como a neostigmina em terapêutica alternativa ou complementar à soroterapia. Isto evidencia o caráter reversível das neurotoxinas do veneno que bloqueiam o receptor nicotínico pós – sináptico de acetilcolina (VITAL BRAZIL & VIEIRA, 1996).

Com base nas evidências farmacológicas, VITAL BRAZIL considera que embora exista um evidente bloqueio do receptor nicotínico por alfa – neurotoxinas, a ação principal do veneno de *M. corallinus* é pré – sináptica. Ocorre um aumento dos potenciais de miniatura da placa terminal, resultando na liberação espontânea de acetilcolina não evocada por estímulo elétrico e que leva a dessensitização do receptor pós – sináptico. Esta ação não pode ser revertida por antagonistas competitivos do nAChR, como a neostigmina. Diferente do que ocorre com *M. fulvius* (WEIS & McISAAC, 1971) não há ação direta de despolarização da membrana muscular, mas podem estar presentes efeitos locais de dano tissular e mionecrose posterior. Os trabalhos de VITAL BRAZIL mostram claramente a complexidade do veneno da *M. corallinus* e prevêem que devem existir pelo menos duas neurotoxinas no veneno: uma  $\beta$  - neurotoxina do tipo PLA<sub>2</sub> e uma  $\alpha$  - neurotoxina do tipo toxina em três dígitos.

As *Micrurus* sempre apresentam venenos com ação neurológica letal, tal como acontece na serpente da América Central *M. nigrocinctus* (DALÓ et al., 1989) e na norte americana, *M. fulvius* (SNYDER et al., 1973). Mas outros efeitos podem estar presentes: em *M. spixii*, *M. lemniscatus*, e *M. avery* observam-se efeitos locais edematogênicos, mionecróticos, e efeitos hemorrágicos (BARROS et al., 1994). Atividade cardiotoxica foi observada em *M. fulvius* (WEIS & McISAAC, 1971; RAMSEY et al. 1971; 1972), hemorrágica em *M. nigrocinctus* (GOMEZ-LEIVA, 1978; MOUSSATCHÉ & MELÉNDEZ, 1979), mionecrótica em *M. frontalis* (PATRÃO-LOMBA et al., 1973; VITAL BRAZIL, 1973/74), *M. corallinus* (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/1984), *M. fulvius* (SNYDER et al., 1973) e em *M. nigrocinctus* (DALÓ, et al., 1989).

Existem poucos estudos sobre os venenos das cobras corais. Diferente dos elapídeos africanos e asiáticos, as *Micrurus* são serpentes raras e que produzem pouco veneno, ainda que extremamente potente. As melhores estudadas são *M. nigrocinctus* (Costa Rica) e *M. fulvius* (EUA). No caso de *M. corallinus* e *M. frontalis*, todo o veneno coletado no Instituto Butantan é utilizado na produção de soro anti – elapídico. Mesmo assim, as quantidades de veneno são muitas vezes insuficientes até para a produção do soro. Seus hábitos as tornam difíceis de capturar e a manutenção em cativeiro é bastante complicada, devido à sua dieta especializada. Além disso, são serpentes de pequeno porte e a quantidade de veneno coletável por extração é muito pequena (0 a 5 µl / extração / cobra). Com isso, raramente tem-se veneno disponível para efetuar estudos farmacológicos e bioquímicos dos seus componentes.

## Imunologia do Veneno

Utilizando-se soros específicos contra o veneno das principais corais brasileiras (*M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*) demonstrou-se que o soro anti – *M. corallinus* é capaz de neutralizar o efeito letal do veneno de *M. corallinus*, mas não o das outras três serpentes. Por outro lado, o soro anti - *M. frontalis* é capaz de neutralizar os efeitos letais do veneno *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*, mas não o veneno de *M. corallinus* (HIGASHI et al., 1990; 1995). Já o soro anti – *M. spixii* se comportou de maneira similar ao soro anti – *M. frontalis*, sugerindo a presença de antígenos de ação tóxica semelhantes nos venenos de *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*, mas diferentes daqueles existentes no veneno de *M. corallinus* (PRIETO DA SILVA et al., 2000). Estes estudos são importantes para a terapêutica do envenenamento pelas corais e corroboram as evidências de que o mecanismo da ação tóxica do veneno de *M. corallinus* é causado por componentes distintos daqueles presentes no veneno de outras corais, tais como *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*.

O soro anti – elapídico produzido pelo Instituto Butantan é feito em cavalos imunizados com os venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* na proporção de 1:1 (RAW et al., 1991) e é capaz de neutralizar os venenos das corais brasileiras mais importantes do ponto de vista de saúde pública (*M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*) (HIGASHI et al., 1995) e de corais norte – americanas (*M. fulvius* e *M. carinicauda dumerilli*) (COHEN & SELIGMANN JR., 1968; FLOWERS, 1966).

## Bioquímica do Veneno

Do ponto de vista bioquímico, determinou-se presença de diferentes atividades biológicas e enzimáticas nos venenos de diversas *Micrurus*. Atividade enzimática para acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, hialuronidase, l-aminoácido desidrogenase, 5' nucleotidase, fosfodiesterase, fosfolipase A2, leucina aminopeptidase, l-aminoácido oxidase estão presentes nos venenos de *Micrurus* de diversas espécies e subespécies tais como *M. corallinus*, *M. carinicauda dumerilli*, *M. frontalis frontalis*, *M. frontalis altirostris*, *M. frontalis brasiliensis*, *M. albicinctus*, *M. fulvius fulvius*, *M. ibiboboca*, *M. rondonianus*, *M. spixii spixii*, *M. nigrocinctus*, *M. nigricolli*, *M. melanoleuca* e *M. surinamensis surinamensis* (AIRD & JORGE DA SILVA, 1991; TAN & PONNUDURAI, 1992).

Alguns componentes responsáveis pelas atividades enzimáticas descritas foram isolados e caracterizados. Do veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus* foram isoladas sete  $\alpha$  - neurotoxinas, cinco fosfolipases A2 e quatro outras proteínas similares a outras toxinas (ROSSO et al., 1996). Também foi determinada a seqüência primária de aminoácidos da  $\alpha$  - neurotoxina majoritária desse veneno. Outros estudos isolaram proteínas cuja seqüência N-terminal é similar às  $\alpha$  - neurotoxinas no veneno de *M. surinamensis surinamensis* (AIRD et al., 1993), *M. nigrocinctus nigrocinctus* (ALAPE-GIRÓN, et al., 1996) e no veneno de *M. frontalis frontalis* (FRANCIS et al., 1997).

## Uma Longa Tradição no Estudo dos Venenos Elapídicos

Os elapídeos do velho mundo são as serpentes mais bem estudadas. Além de representarem um grave problema de saúde pública, cedo atraíram a atenção de metrópoles de longa tradição científica como a Inglaterra e França, que possuíam colônias africanas e asiáticas. Por outro lado, os elapídeos e hidrofinídeos do velho mundo têm algumas espécies de porte razoável que podem ser capturados e mantidos em cativeiro com maior facilidade. Além disso, o veneno é produzido em maiores quantidades e a extração é mais fácil, o que permite obter quantidades abundantes para estudo. Em alguns casos, a toxina majoritária chega a compor 80% do conteúdo protéico do veneno tornando sua purificação mais fácil. Rapidamente os venenos elapídicos revelaram ser uma fonte inestimável de substâncias

importantes em neurologia, fisiologia e outros campos da ciência, pois as toxinas têm alta especificidade e afinidade pelos seus alvos e receptores (ADAMS & OLIVERA, 1994; WONNACOTT & DAJAS, 1994).

Os venenos de serpentes começaram a ser estudados por FONTANA na França em 1781. Em 1843, BONAPARTE separou alguns componentes do veneno de *Vipera*. MITCHELL em 1860 fez o mesmo nos Estados Unidos com o veneno de *Crotalus*. Já em 1883, MARTIN separou em dez frações o veneno de um elapídeo australiano. Uma fração era claramente hemorrágica e outra bloqueava a respiração. No fim do século XIX, estava claro que os venenos elapídicos e hidrofínideos tinham propriedades curarizantes, ou seja, seus princípios tóxicos causavam a paralisia flácida do músculo bloqueando a respiração de maneira semelhante ao curare (revisto em MÉNEZ, 1996). CALMETT foi o primeiro a usar soroterapia para impedir os efeitos nocivos dos venenos de serpentes. Seguindo o exemplo do Instituto Pasteur, diversos centros de produção de soros e antivenenos foram fundados na África, Sudeste Asiático, Austrália e Estados Unidos. No Brasil, a técnica foi empregada com sucesso por VITAL BRAZIL em 1901 no recém fundado Instituto Butantan. Já era de seu conhecimento a natureza peculiar do envenenamento neurotóxico causado por *Micrurus* em contraposição àquele causado por Crotalídeos (BRAZIL & BRAZIL F<sup>o</sup>, 1933), foi ele quem primeiro demonstrou que a soroterapia era específica para cada tipo de veneno de serpente.

Após 1950, PORATH & FLODIN desenvolveram métodos cromatográficos de purificação de proteínas na Suécia. Na década de 60, quase simultaneamente, CAREY & WRIGHT na Grã Bretanha, EAKER, KARLSSON & PORATH na Suécia, LEE & CHANG em Taiwan e TAMIYA no Japão, começaram a estudar os componentes protéicos purificados dos venenos elapídicos. A primeira neurotoxina isolada foi da serpente marinha *Enhydrina scistosa* (CAREY & WRIGTH, 1960). Logo após, a toxina alfa (Tx- $\alpha$ ) do veneno de *Naja nigricollis* teve sua seqüência de aminoácidos determinada (KARLSSON et al., 1966; EAKER & PORATH, 1966). As erabutoxinas a, b e c, foram isoladas e cristalizadas (TAMIYA & ARAI, 1966). Toxinas puras começaram a ser empregadas em estudos farmacológicos na junção neuromuscular (LEE & CHANG, 1966). Diversos estudos farmacológicos, imunológicos e das propriedades químicas dessas proteínas se seguiram.

Foi nesta época que CHEN-YAN LEE sugeriu a JEAN-PIERRE CHANGEUX que utilizasse as propriedades da  $\alpha$  - bungarotoxina, uma neurotoxina curarizante do veneno de *Bungarus multicinctus*, para estudar e isolar o receptor de acetilcolina da raia elétrica *Electrophorus electricus* e do peixe elétrico *Torpedo marmorata* (CHANGEUX et al., 1970; revisto por CHANGEUX, 1993). Desta forma, a  $\alpha$  - bungarotoxina se tornou uma ferramenta paradigmática em neurobiologia. A década de 70 foi marcada por estudos da estrutura e ação dessas neurotoxinas. Assim se tentou determinar a função de certos aminoácidos na

toxina por meio de modificações químicas. Paralelamente, desenvolveram-se estudos de cristalografia. Em 1976, a erabutoxina b, de *Laticauda semifasciata* foi a primeira neurotoxina a ter sua estrutura tridimensional determinada (LOW et al., 1976; TSERNGLOU & PETSKO, 1976). Seguiram-se posteriormente estudos de análise de ressonância magnética e dicroísmo dessas toxinas, o que possibilitou reinterpretar os dados acumulados à luz do aspecto tridimensional e tentar elucidar como essas toxinas poderiam interagir com seus receptores. Na década de 80, levaram-se à frente esses estudos conformacionais com uma preocupação crescente com a estrutura das toxinas quando em solução (DUFTON & HIDER, 1983), ou seja, em seu estado dinâmico utilizando-se métodos como dicroísmo circular, fluorescência e ressonância nuclear magnética. Os dados estruturais permitiram racionalizar a classificação das toxinas de serpentes em famílias, sendo uma das mais importantes a família das toxinas em três dígitos às quais pertencem as  $\alpha$  - neurotoxinas.

## A Classificação Estrutural das Toxinas

Tendo em vista a complexa diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas que as toxinas de serpentes podem exercer é mais fácil classificá-las formando famílias de proteínas de acordo com sua estrutura tridimensional, (MÉNEZ et al., 1992). Assim, as mais importantes toxinas elapídicas se classificam principalmente como toxinas com estrutura similar a fosfolipase A2 e toxinas com estrutura em forma de três dígitos. A seguir descrevemos algumas classes de toxinas presentes nos venenos das serpentes elapídicas.

### As Fosfolipases

A primeira classe estrutural é formada pelas toxinas com estrutura similar à Fosfolipase do tipo A2 pancreática. Estas toxinas exibem inúmeras atividades farmacológicas, sendo que entre elas se encontram as  $\beta$  – neurotoxinas ou toxinas pré – sinápticas (HARRIS, 1991). Existem fosfolipases do tipo C em alguns venenos de serpentes, mas as mais importantes são as fosfolipases tipo A2 (PLA<sub>2</sub>). Elas estão presentes nos venenos da maioria das serpentes venenosas das famílias *Viperidae*, *Elapidae* e *Hydrophiidae* (MÉNEZ et al., 1992). Com 120 resíduos de aminoácidos e 6 ou 7 pontes dissulfeto, são substancialmente compostas por alfa – hélices e alguma estrutura em folhas beta – pregueadas (DUFTON et al., 1983). Podem apresentar as mais diversas funções e especificidades. Atuam diretamente hidrolisando os fosfolipídeos do sistema hemostático. Podem provocar hemólise, inibição da agregação plaquetária ou impedir a coagulação sangüínea. Outras são miotoxinas que despolarizam membranas das células musculares (MEBS & OWNBY, 1990), levando à necrose. Algumas PLA<sub>2</sub> são neurotoxinas pré – sinápticas ( $\beta$  - neurotoxinas) com alvos específicos no sistema nervoso ou na junção neuromuscular (FIGURA 03C), aumentando a liberação dos neuromediadores (revisado por HARVEY et al. 1990;

HARRIS, 1991). Podem ser formadas por uma ou mais subunidades. Nem sempre a atividade tóxica das PLA<sub>2</sub>s é relacionada com atividade enzimática, pois algumas das mais potentes toxinas desta classe não apresentam nenhuma atividade enzimática. Além disso, podem ser multifuncionais e terem mais de um sítio tóxico. Por sua vez, nem todas as PLA<sub>2</sub> presentes nos venenos são tóxicas.

## Fatores que Afetam o Complemento

Os venenos elapídicos, incluindo o das *Micrurus*, apresentam atividades pró-inflamatórias, ativam o sistema complemento do soro humano, causam edema e aumento da permeabilidade vascular (TAMBOURGI et al., 1994). Fatores que afetam o complemento são constituintes importantes dos venenos de algumas serpentes. O sistema de complemento consiste em um sistema multi-enzimático cujo funcionamento contribui para a defesa do organismo. É uma cadeia de eventos que culmina na formação de poros na superfície da célula e sua conseqüente lise em resposta específica a um antígeno. Este sistema é ativado no momento em que mecanismos de controle são inibidos. Entre as enzimas de serpentes que afetam este sistema, as metalo-proteínases são os principais efetores característicos dos venenos botrópicos (jararacas). Sua ação dá-se pela degradação não específica dos componentes da cascata de eventos do complemento. Já os Fatores dos Venenos das Cobras (CVFs – “*Cobra Venom Factors*”), presentes nas *Najas* ativam o sistema complemento, atuando especificamente sobre componentes plasmáticos da via alternativa. O CVF se associa com o fator B e D do sangue da presa, clivando as proteínas C3 e C5 depletando o sistema complemento. Os CVFs são formados por três cadeias de glicoproteínas ligadas por pontes dissulfeto com aproximadamente 150 kDa. Os CVFs têm 70% de similaridade estrutural com a proteína C3b (C3/C5 convertase) do soro sanguíneo dos mamíferos (SHARMA et al., 2001).

## Inibidores Enzimáticos

As dendrotoxinas estão presentes nos venenos de alguns elapídeos (HARVEY & KARLSSON, 1982), tais como as Mambas (*Dendroaspis*) e as Kraits (*Bungarus*). São toxinas que têm similaridade estrutural com os inibidores de serino-proteínases do tipo Kunitz capazes de inibir a tripsina e a quimiotripsina. Elas exercem sua função tóxica aumentando a liberação de neurotransmissores. Os alvos específicos das dendrotoxinas são subtipos de canais de potássio das membranas celulares dos neurônios (revisado por HARVEY, 2001). Veja a FIGURA 03C.

As fasciculinas presentes nos venenos de elapídeos, também são inibidores da enzima acetilcolinesterase (MÉNEZ, 1996). O resultado é a dessensibilização do receptor de acetilcolina por excesso de

neurotransmissor na fenda sináptica. Entretanto, as fasciculinas ou anti – colinesterases são toxinas em forma de três dígitos e, portanto classificáveis na classe descrita a seguir.

## A Família das Proteínas em Forma de Três Dígitos

Os venenos dos elapídeos e hidrofídeos se caracterizam por apresentarem pequenas toxinas sem nenhuma atividade enzimática denominadas de toxinas em três dígitos ricas em pontes dissulfeto (revisado por ENDO & TAMIYA, 1987). Esta família de toxinas elapídicas é especialmente importante pela abundância de seqüências conhecidas, pela diversidade biológica de suas funções e por a ela pertencerem as toxinas pós – sinápticas curarizantes ou  $\alpha$  – neurotoxinas e as citotoxinas (CHANG, 1979; revisado por ENDO & TAMIYA, 1991; TSETLIN, 1999). Mais de 300 seqüências são conhecidas (uma listagem parcial pode ser vista em MEBS & CLAUS, 1991). As  $\alpha$  – neurotoxinas dos elapídeos foram fundamentais no isolamento e caracterização do receptor nicotínico de acetilcolina (CHANGEUX, 1990). (FIGURA 03B e 03C). Esta família de toxinas é estruturalmente homogênea, mas suas toxinas podem exibir até dez subtipos funções farmacológicas distintas.

Toxinas de qualquer subtipo da família podem ter suas seqüências facilmente alinhadas por oito hemi – cistinas muito conservadas (STRYDOM, 1977), que formam o núcleo globular da proteína e de onde emergem três alças (“loops”) formados por 5 folhas –  $\beta$  pregueadas antiparalelas, duas folhas antiparalelas formadas pela primeira alça e três folhas antiparalelas formadas pela segunda alça e parte da terceira alça (Figura 03D). Por esta razão, são chamadas de toxinas com forma de três dígitos (“*three finger shaped toxins*”). Nenhuma estrutura em alfa-hélice é encontrada nessas moléculas. A forma é discoidal achatada, apresentando um lado côncavo e um convexo. Têm massa molecular baixa, entre 7 a 8 kDa, e ponto isoelétrico típico ente pH 8 e 10. São extremamente resistentes às variações físicas ambientais. Devido ao seu pequeno tamanho são facilmente absorvidas e se distribuem rapidamente nos tecidos da presa. Suportam altas temperaturas sem desnaturar e são resistentes à proteólise. Apesar da enorme semelhança estrutural, ações bastante distintas estão presentes em diversos componentes da família, representando classes. Um mesmo veneno pode ter vários subtipos de toxinas em forma de três dígitos com diferentes atividades farmacológicas. A seqüência de cDNA *nxb8* isolada de *M. corallinus* codifica uma proteína da família de toxinas com forma de três dígitos.

### 1. Alfa – Neurotoxinas

Alfa – neurotoxinas: Estas toxinas têm ação pós – sináptica na junção neuromuscular, bloqueando o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), impedindo a ligação do neurotransmissor e, por

consequente, a ativação do canal. Mais de 80  $\alpha$  - neurotoxinas já foram purificadas dos venenos de elapídeos. O alvo primário é o receptor do músculo (FIGURA 03B), resultando em paralisa flácida. São extremamente seletivas e tem alta afinidade de ligação pelo receptor. A constante de dissociação ( $K_D$ ) está entre  $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  mol/L e a  $LD_{50}$  para camundongos varia entre 0,05 a 0,30  $\mu\text{g/g}$ . É possível estabelecer uma correlação entre a afinidade pelo receptor e a toxicidade na presa (ISHIKAWA et al., 1985). As afinidades das  $\alpha$  - neurotoxinas pelo nAChR muscular variam conforme a espécie de origem do receptor. Em geral, tem mais alta afinidade para o receptor muscular que pertencem às presas usuais na dieta da serpente (ISHIKAWA et al., 1985). As  $\alpha$  - neurotoxinas se dividem em dois subtipos:

### 1.1. $\alpha$ - Neurotoxinas Curtas

As  $\alpha$  - neurotoxinas curtas tem 60 a 62 resíduos de aminoácidos e as 4 pontes dissulfeto usuais distintivas da família. Reconhecem apenas o nAChR do músculo esquelético fetal do camundongo (composto pelas subunidades  $\alpha\gamma\alpha\delta\beta$ , FIGURA 03B) ou do órgão elétrico de *Torpedo* com alta afinidade ( $K_d = 10^{-9}$  mol/L). Já pelo receptor pós-natal (composto pelas subunidades  $\alpha\epsilon\alpha\delta\beta$ ), as  $\alpha$  - neurotoxinas exibem uma menor afinidade (TAYLOR et al., 1998; OSAKA et al., 1999). A subunidade do receptor pela qual as toxinas têm afinidade é a subunidade  $\alpha_1$ , que forma o sítio ligante do agonista  $\alpha\delta$  ou  $\alpha\gamma$ . O sítio  $\alpha\epsilon$  também é discriminado, mas com muito menor afinidade. A ligação com o nAChR é considerada reversível. Um modelo da erabutoxina a de *Laticauda semifasciata* pode ser visto na FIGURA 04A.

### 1.2. $\alpha$ - Neurotoxinas Longas

As  $\alpha$  - neurotoxinas longas tem de 70 a 75 resíduos de aminoácidos e cinco pontes dissulfeto. Além das 4 pontes dissulfeto típicas, apresentam uma ponte extra na ponta da segunda alça e uma longa cauda C-terminal. A primeira alça é mais curta em comparação com as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas devido a deleção de vários resíduos de aminoácidos. O sítio de ligação ao nAChR se sobrepõe ao das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e compartilha diversos aminoácidos funcionais (ENDO & TAMIYA, 1987; 1991; UTKIN et al., 1994; TAYLOR et al., 1998; SERVENT et al.; 1997; 2000; ANTIL et al., 1999). Tal como as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, também são capazes de discriminar dois sítios ligantes ( $\alpha\delta$  e  $\alpha\gamma$ ) no nAChR de *Torpedo* (ANTIL et al., 1999). Além de se ligarem à subunidade  $\alpha_1$  do nAChR do músculo, as  $\alpha$  - neurotoxinas longas se ligam com alta afinidade aos receptores neuronais ganglionares e do sistema nervoso central homopentaméricos,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  e  $\alpha_9$  (GOTTI et al., 1997; SERVENT et al., 1997; 2000; ANTIL et al., 1999, ANTIL-DELBEKE et al., 2000). (FIGURA 03A). A quinta ponte dissulfeto na extremidade da segunda alça das neurotoxinas longas é essencial para a afinidade a esses receptores neuronais (SERVENT et al., 1997),

mas não ao nAChR do músculo ou do órgão elétrico do *Torpedo*. Entretanto, as  $\alpha$  - neurotoxinas longas não têm afinidade pelos receptores neuronais heterodiméricos ( $\alpha/\beta$ ), (CHIAPPINELLI, 1993). Um modelo da estrutura tridimensional da  $\alpha$  - cobratoxina de *Naja kaouthia* pode ser visto na FIGURA 04A.

## 2. $\kappa$ - Neurotoxinas ou Toxinas Neuronais

$\kappa$  - neurotoxinas ou toxinas ganglionares são encontradas como componentes minoritários dos venenos das Kraits (*Bungarus*, etc.), têm 66 resíduos de aminoácidos e cinco pontes dissulfeto nas mesmas posições que as apresentadas pelas  $\alpha$  - neurotoxinas longas (revisto por CHIAPPINELLI, 1991). Bloqueiam de forma potente e seletiva o nAChR ganglionar do subtipo  $\alpha_3\beta_2$  (FIGURA 03A). A ligação pode ser revertida. Também bloqueia parcialmente o subtipo  $\alpha_4\beta_2$ . Entretanto, são incapazes de bloquear os subtipos  $\alpha_2/\beta_2$  e  $\alpha_3/\beta_4$  (LUETJE et al., 1990; 1993). Tal como ocorre nas  $\alpha$  - neurotoxinas longas a quinta ponte dissulfeto, na ponta da segunda alça, também desempenha papel crucial na especificidade pelos receptores neuronais (GRANT et al., 1998). As  $\kappa$  - neurotoxinas formam dímeros em condições fisiológicas (CHIAPPINELLI & WOLF, 1985) que são biologicamente ativos (CHIAPPINELLI & WOLF, 1989). Um modelo da  $\kappa$  - bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* pode ser visto na FIGURA 04A.

## 3. Citotoxinas ou Cardiotoxinas

As citotoxinas são toxinas do tipo três dígitos presentes nos venenos de serpentes elapídicas dos gêneros *Naja* e *Hemachatus*. Têm ação lítica em um grande número de tipos celulares e membranas, mas exibem seletividade por determinados alvos (revisto por DUFTON & HIDER, 1991). Tipicamente possuem 60 resíduos de aminoácidos e a mesma estrutura tridimensional formada pelas 4 pontes dissulfeto e as 3 alças com folhas  $\beta$  - pregueadas. Causam contração do músculo cardíaco (HARVEY et al., 1982), despolarização irreversível das células excitáveis (HODGES et al., 1987), apresentam citotoxicidade em células tumorais (CHAIM-MATYAS et al., 1991) e provocam lise de eritrócitos (CHEN et al., 1984). Os sítios ligante e citolítico destas toxinas são distintos (STEVENS-TRUSS & HINMAN, 1996). As cardiotoxinas formam trímeros com o exterior hidrofóbico e um canal central hidrofílico, sugerindo um possível mecanismo de formação de poros nas membranas celulares (BILWES et al., 1994). Os aminoácidos funcionais que interagem com o alvo estão na face côncava voltada na direção C-terminal, posição oposta a que ocorre nas  $\alpha$  - neurotoxinas cujo lado côncavo está oposto à cauda C-terminal. Um modelo da Cardiotoxina IV de *Naja naja atra* pode ser visto na FIGURA 04A.

#### 4. Fasciculinas ou Anticolinesterases

As Fasciculinas ou anticolinesterases estão presentes nos venenos das Mambas (*Dendroaspis*). São inibidores não competitivos de alta afinidade da enzima acetilcolinesterase, cuja função é hidrolisar a acetilcolina na junção neuromuscular (FIGURA 03C). Agem em sinergismo com as  $\alpha$  - neurotoxinas e as dendrotoxinas (inibidores tipo kunitz) presentes em seu veneno. Têm 61 resíduos de aminoácidos e as quatro pontes dissulfeto comuns a toda a família das toxinas em forma de três dígitos (revisto por CERVEŇANSKÝ et al., 1991). São chamadas de fasciculinas devido aos tremores musculares que provocam. O sítio de ligação à acetilcolinesterase também está na face oposta em direção à cauda C-terminal.

#### 5. Toxinas Muscarínicas

Toxinas muscarínicas bloqueiam os receptores muscarínicos de acetilcolina (MACHR) que estão implicados na modulação da transmissão colinérgica inibitória e excitatória do sistema nervoso central. Os receptores muscarínicos não são canais iônicos. Atuam por transmissão do sinal acoplados com proteína G modulando a atividade de segundos mensageiros ou de outros canais iônicos. Muitos sistemas pelo corpo dependem da regulação efetuada pelos MACHRs, tal como contração dos músculos lisos, regulação dos batimentos cardíacos. Estão presentes também nos tecidos glandulares. As toxinas muscarínicas foram primeiro isoladas do veneno da Mamba *Dendroaspis angusticeps* (ADEM et al., 1988). Mais de 10 isoformas tem seletividade por diferentes subtipos de receptores muscarínicos (revisto por BRADLEY, 2000; JERUSALINSKY et al., 2000). A estrutura dessas toxinas é comum a todas as toxinas em três dígitos conservando o arranjo das 8 hemi-cistinas.

#### 6. Toxinas Bloqueadoras de Canais de Cálcio do Tipo – L

As toxinas bloqueadoras de canais de cálcio do tipo – L são toxinas de 60 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto. Tem efeito relaxante no músculo liso e inibem a contração cardíaca. A primeira toxina isolada e purificada do veneno de *Dendroaspis polylepis polylepis* e foi chamada de calciseptina (DE WEILLE et al., 1990). São seletivas para o canal de  $Ca^{2+}$  tipo – L do músculo cardíaco e dos vasos, não atuando nos canais tipo – N ou tipo – T. As toxinas inibidoras do canal tipo - L têm uma estrutura similar à apresentada pelas fasciculinas e cardiotoxinas, conservam a estrutura rica em folhas  $\beta$  - pregueadas antiparalelas e as 8 hemi-cisteínas que formam as 4 pontes dissulfeto usuais e o lado côncavo orientado na direção C-terminal (ALBRAND et al., 1995).

## 7. Mambinas

As mambinas ou dendroaspinas são toxinas inibidoras da adesão celular, especialmente a de plaquetas presentes nos venenos das mambas. Atuam de maneira similar às desintegrinas (DENNIS et al., 1990; McDOWELL et al., 1992). Possuem uma tríade RGD na terceira alça da molécula capaz de inibir a glicoproteína IIb-IIIa que atua como um receptor induzível para o fibrinogênio e outras proteínas adesivas da superfície das plaquetas (JASEJA et al., 1994).

## 8. Toxinas Sinérgicas

As toxinas sinérgicas são um grupo de toxinas do veneno das mambas ainda mal estudado. Em geral são consideradas não tóxicas, mas que potencializam o efeito das outras toxinas do veneno de forma desconhecida, atuando em sinérgia com as fasciculinas e as neurotoxinas (JOUBERT & TALJAARD, 1979; JOUBERT & VILJOEN, 1979; JOUBERT, 1985).

## 9. Homólogos das $\alpha$ - Neurotoxinas Longas

Os homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas ou toxinas tipo - melanoleuca (JOUBERT, 1975; JOUBERT & TALJAARD, 1980) ou neurotoxinas fracas, são estruturalmente relacionadas às  $\alpha$  - neurotoxinas longas que têm sido encontradas recentemente nos venenos ou cDNAs de *Naja* e *Bungarus*, (DANSE et al., 1990; DUCANCEL et al., 1990; CHANG & LIN 1997; HUNG et al., 1998; LIN et al., 1998; QIAN et al., 1998b; 1999; CHANG et al., 2000a; GONG et al., 2000, UTKIN et al., 2001a e 2001b). Possuem 10 hemi-cistinas das quais oito são conservadas como os protótipos da família. Formam cinco pontes dissulfeto, mas a quinta ponte, diferente do que ocorre nas  $\alpha$  - neurotoxinas longas está presente na extremidade da primeira alça. Têm entre 62 a 68 resíduos de aminoácidos. A maioria desses homólogos tem função farmacológica desconhecida e alguns são considerados atóxicos.

Recentemente, foram isoladas toxinas deste tipo com alta toxicidade, mas o seu alvo ainda não está caracterizado (AIRD, et al., 1999). Em certos casos a toxicidade depende da origem do receptor de acetilcolina muscular utilizado no ensaio. Assim podem ter mais afinidade pelo nAChRs de músculos de anfíbios que de mamíferos, sendo capazes de serem seletivas para subtipos de nAChR musculares (CHANG et al., 2000a). Mostrou-se que uma dessas neurotoxinas fracas de *Naja kaouthia* tem menor afinidade pelo nAChR do órgão elétrico de *Torpedo* em comparação com as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas. Entretanto, esta neurotoxina fraca se mostrou equípote em comparação com as  $\alpha$  - neurotoxinas longas em sua afinidade pelo receptor  $\alpha 7$  (UTKIN et al., 2001a). Já a reversibilidade da ligação ao receptor  $\alpha 7$  é muito mais lenta. A Bucandina do veneno de *Bungarus candidus* teve

recentemente sua estrutura tridimensional determinada (KUHNS et al., 2000). Os autores alegam ser a primeira neurotoxina pré - sináptica com estrutura de três dígitos, a ser descrita. Este homólogo aumenta a liberação de acetilcolina nos terminais nervosos por um mecanismo ainda não elucidado. Um modelo da Bucandina pode ser visto na FIGURA 04B. Recentemente, um outro desses homólogos, denominado Cadoxina foi purificada também do veneno de *B. candidus* e teve sua estrutura tridimensional determinada por ressonância nuclear magnética (PARVATHY et al., 2001). A Cadoxina é capaz de bloquear a transmissão colinérgica no músculo esquelético de galinhas e intensifica de maneira significativa a atividade da acetilcolinesterase no veneno (NIRTHANAN et al 2001).

## 10. Proteínas com Estrutura em Três Dígitos Não Elapídicas

Um domínio de topologia similar a das toxinas de serpentes com estrutura em três dígitos é também descrita para outras proteínas não tóxicas de outros seres vivos além das serpentes. Essas proteínas podem ser facilmente alinhadas pelas mesmas hemi-cistinas que compõem as  $\alpha$  - neurotoxinas das serpentes (STRYDOM, 1977) constituindo uma superfamília. É o caso da aglutinina do germe de trigo. Esta proteína dimérica de 41 resíduos de aminoácidos é uma lectina de planta. É capaz de ligar-se a diversas membranas celulares animais e bacterianas. Entre suas atividades pode se descrever a capacidade de aglutinar células tumorais de mamíferos, estimular a divisão de linfócitos e inibir o crescimento de fungos. Outras proteínas com a mesma topologia da aglutinina, formada por um núcleo de 4 pontes dissulfeto e três alças ricas em folhas  $\beta$ , são a heveína da borracha e o alérgeno de pólen Ra5 (DRENTH et al., 1980).

Em anfíbios o motivo estrutural em forma de três dígitos é encontrado em um grupo de peptídeos da secreção da pele, denominados xenoninas (KOLBE et al., 1993). O papel desses peptídeos é pouco compreendido. Entretanto, a xenonina 1 ativa canais de cálcio sensíveis à dihidropiridina presentes nas células do *villus* e causa a diminuição do volume dessas células por influxo de cálcio (MACLEOD et al., 1998).

### 10.1 Família Ly-uPAR e inibidores de PLA<sub>2</sub> tipo $\gamma$

Em mamíferos, o padrão estrutural em três dígitos aparece em grupos de proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e implicadas na adesão celular, sinalização celular e transmissão de sinal. É o caso do receptor de membrana CD59 (KIEFFER et al., 1994). A proteína tem uma quinta ponte dissulfeto extra na alça N-terminal, tal como os homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas. A CD59 se liga às proteínas do complemento C8 e C9 impedindo a formação do complexo lítico. O mesmo padrão é encontrado nas proteínas da família de antígenos murinos Ly-6, que forma um grupo de receptores da

superfície celular envolvidos na ativação de leucócitos (GUMLEY et al., 1995). CD59 e Ly-6 são proteínas monoméricas. Já o receptor para o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase - uPAR (PLOUG & ELLIS, 1994) é uma proteína muito maior, com pelo menos três domínios em três dígitos repetidos *in tandem*, que também é ancorada à membrana por uma cauda glicosilfosfatidilinositol.

RoBo-1 é uma proteína relacionada à família Ly-6/uPAR/neurotoxinas que é abundantemente expressa nos condrócitos, onde a cartilagem está sendo remodelada em osso (NOEL et al., 1998). Curiosamente, RoBo-1 apresenta uma alta similaridade com um domínio de algumas proteínas secretadas no soro sanguíneo de serpentes elapídicas. Essas proteínas séricas das serpentes são inibidores do tipo  $\gamma$  de PLA<sub>2</sub> e apresentam atividades anti - hemorrágicas, anti - neurotóxicas e anti - miotóxicas, inibindo a atividade tóxica da PLA<sub>2</sub> do veneno dessas serpentes (revisto por FAURE, 2000). Os inibidores tipo- $\gamma$  de PLA<sub>2</sub> não são ancorados às membranas celulares por uma cauda GPI e encontram-se solúveis no sangue da serpente. São glicoproteínas que têm entre 90 a 130 kDa, formadas pela associação não covalente de três a seis subunidades entre 20 a 31 kDa. Suas seqüências de aminoácidos contêm duas repetições *in tandem* do domínio de proteínas em formas de três dígitos (OHKURA et al., 1994).

## 10.2 Proteínas em forma de três dígitos no sistema nervoso central

É extremamente interessante que recentemente tenha sido encontrado um pequeno peptídeo neuromodulador ancorado a GPI, altamente expresso no sistema nervoso central de mamíferos. O peptídeo, denominado Lynx-1 está associado a dendritos proximais das células de Purkinje e seus interneurônios pré - sinápticos, além de outras células do cerebelo, hipocampo e córtex, coincidentes com a localização dos nAChR  $\alpha 7$ . A fração solúvel de Lynx-1 aumenta a liberação de acetilcolina evocada por potenciais sinápticos *in vitro* (MIWA et al., 1999). Lynx-1 tem topologia claramente similar a dos Homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas, inclusive apresentando uma quinta ponte dissulfeto na primeira alça, além das quatro usuais presentes no núcleo central e o mesmo arranjo de folhas  $\beta$  pregueadas. (Veja o modelo de Lynx-1 na FIGURA 04B). Além disso, o gene de Lynx-1 tem a mesma organização genômica que a encontrada nas toxinas em três dígitos de elapídeos (CHANG et al., 1997a). Ainda que o papel de Lynx-1 no cérebro esteja por ser esclarecido, é evidente a sua implicação na regulação da função colinérgica *in vivo*, inclusive podendo ter implicações sobre o mecanismo de ação das toxinas de serpentes, tais como os “homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas” ou as “neurotoxinas fracas” e sua interação com os receptores neuronais de acetilcolina.

Recentemente, o gene *odr-2* de *Caenorhabditis elegans* foi caracterizado. O gene codifica uma proteína ODR-2 necessária para a olfação e que têm similaridade estrutural com a superfamília Ly-

6/uPAR/neurotoxinas. A proteína ODR-2 tem um domínio de três dígitos com a mesma formação de pontes dissulfeto e 30% de identidade de seqüência com as neurotoxinas de serpente, devida principalmente a aminoácidos que desempenham papel estrutural na molécula (CHOU et al., 2001). A proteína ODR-2 é exclusivamente expressa em neurônios motores colinérgicos ou em neurônios que fazem sinapse com neurônios motores colinérgicos. De maneira análoga a Lynx-1 ou às neurotoxinas de serpente, é possível que ODR-2 esteja envolvido na neuromodulação e possa atuar modificando a transmissão colinérgica.

Estas ocorrências evidenciam a ancestralidade e a versatilidade da estrutura em forma de três dígitos na aquisição de novas funções. Durante a evolução das glândulas de veneno dos elapídeos, estruturas ancestrais não tóxicas (prototoxinas) foram recrutadas e adaptadas a uma função tóxica por mutações em poucos resíduos expostos na superfície sem alterar a estrutura básica ancestral. O recrutamento de estruturas pré - existentes adquirindo novas funções parece ser uma ocorrência comum no processo biológico evolutivo (ALAPE-GIRON et al., 1999).

## **A Biologia Molecular**

A abordagem bioquímica clássica com venenos animais necessita de grandes quantidades de material bruto para isolar os componentes individuais e, posteriormente, uma quantidade suficiente de determinado componente para a sua caracterização. Assim, venenos cuja fonte é escassa ou cujos componentes estão presentes em baixa concentração tendem a ser ignorados. A biologia molecular mudou esse panorama a partir dos fins da década de 80 mostrando-se uma poderosa técnica à disposição dos laboratórios que trabalham com toxinas de animais (MIDDLEBROOK, 1991). As toxinas podem agora ser clonadas, expressas e caracterizadas, inclusive de animais pequenos ou raros que produzem pouco veneno como abelhas, vespas, aranhas, escorpiões, búzios, entre outros. As toxinas recombinantes podem ser produzidas em grande quantidade. O avanço da tecnologia de técnicas de cromatografia de alta eficiência, massa, ressonância e espectrometria permitem o isolamento e a caracterização de pequenas quantidades moleculares de toxinas (ADAMS & OLIVEIRA, 1994).

## **A Biologia Molecular das Toxinas em Três Dígitos**

O primeiro componente de veneno elapídico clonado e seqüenciado foi a erabutoxina a de *Laticauda semifasciata* (TAMIYA et al., 1985). O cDNA continha 510 pares de bases (pb.), com início da fase de leitura na base 249. O início da seqüência codificava para um peptídeo sinal de 21 resíduos de aminoácidos altamente hidrofóbicos na região N-terminal, mostrando que a toxina era sintetizada na

glândula na forma de um precursor que é posteriormente clivado quando a toxina é secretada para o lúmen da glândula de veneno. Seguiu-se uma seqüência de 186 nucleotídeos codificando para a seqüência exata de 62 aminoácidos da erabutoxina a madura e finalmente uma seqüência não codificante de 240 pb. Demonstrou-se também que as isoformas da erabutoxina a, b, e c, presentes no veneno eram devidas à alteração de uma única base. A partir daí, muitas outras seqüências foram obtidas e inúmeras variantes identificadas, transformando a classe das toxinas em forma de três dígitos, numa das maiores e melhor caracterizadas famílias de proteínas.

A erabutoxina a também foi a primeira a ser produzida de forma recombinante em *Escherichia coli* (DUCANCEL et al., 1989). A expressão foi feita em forma de fusão com a proteína A de *Staphylococcus aureus*. A proteína de fusão erabutoxina a - proteína A bloqueava o receptor nicotínico muscular de acetilcolina, mas se ligava ao receptor com uma afinidade muito mais baixa que a toxina nativa. A toxicidade da quimera também era inferior *in vivo* à toxina da serpente. No ano seguinte, o mesmo grupo alterou a fusão, introduzindo uma metionina na posição -1 da toxina, o que permitiu a clivagem do híbrido recombinante com brometo de cianogênio (CNBr). Obteve-se uma toxina recombinante totalmente ativa e com as mesmas propriedades da toxina nativa (BOYOT et al., 1990).

Estudos de mutagênese sítio dirigida foram realizados para elucidar quais são os sítios de ligação das neurotoxinas curtas ao seu alvo específico, o receptor muscular de acetilcolina (HERVÉ et al., 1992; PILLET et al., 1993; TRÉMEAU et al., 1995). O mesmo foi feito com as toxinas longas:  $\alpha$  - bungarotoxina (ROSENTHAL et al., 1994) e com a  $\alpha$  - cobratoxina (ANTIL et al., 1999; CHANG et al., 1999a). Outras  $\alpha$  - neurotoxinas foram expressas, como a toxina  $\alpha$  de *Naja mossambica mossambica* e os mutantes utilizados para caracterizar sítios funcionais (ACKERMAN & TAYLOR, 1997; ACKERMAN et al., 1998; OSAKA et al., 1999). Estes mesmos trabalhos demonstraram que existem dois sítios de ligação da neurotoxina no receptor de acetilcolina ( $\alpha\delta$  e  $\alpha\gamma$ ), com diferentes afinidades e especificidades (TAYLOR et al., 1998; ANTIL et al., 1999; OSAKA et al., 1999). Os cDNAs clonados e expressos, evidenciaram inúmeras isoformas e diferentes toxicidades e afinidades pelo receptor, além de variações geográficas no veneno da serpente, como é o caso de neurotoxinas de *Naja sputarix sputarix* (AFIFIYAN et al., 1998), e de *Pseudonaja textillis* (GONG et al., 1999; 2000).

Outro resultado importante, é que a manipulação genética das toxinas recombinantes possibilitou identificar epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes ou o mapeamento dos aminoácidos importantes para a estrutura molecular (ZINN-JUSTIN et al., 1994; DUCANCEL et al., 1996). A modificação por mutagênese sítio dirigida mostrou ser possível transformar a erabutoxina a em um

toxóide capaz de elicitar a formação de anticorpos neutralizantes, mas sem os inconvenientes tóxicos da proteína nativa (FROMEN-ROMANO et al., 1997).

Proteínas de fusão podem ser bons repórteres. Assim, inseriu-se a erabutoxina a entre os resíduos +6 e +7 da fosfatase alcalina de *Escherichia coli*. A proteína de fusão recombinante é exportada para o periplasma e apresenta tanto a atividade enzimática da fosfatase quanto a capacidade de ligação e bloqueio do receptor de acetilcolina da neurotoxina (GILLET et al., 1992). A molécula híbrida é resistente à proteólise e pode substituir por um ensaio colorimétrico experimentos de ligação ao receptor de acetilcolina, que tradicionalmente são feitos com neurotoxinas marcadas radioativamente.

A estrutura genômica do gene precursor da erabutoxina c foi determinada (FUSE et al., 1990), mostrando que havia 3 introns. A mesma organização gênica está presente em toda a família de toxinas em três dígitos estudadas até o momento (CHANG et al., 1997a, 1999b; AFIFIYAN et al., 1999) e as isotoxinas presentes no veneno são resultado da expressão de cópias gênicas, não estando envolvidos mecanismos de edição do mRNA. A comparação de diversas seqüências possibilitou o estudo a sobre a evolução destas toxinas. Mecanismos de duplicação gênica foram evidenciados (TAMIYA et al., 1999). Verificou-se que a taxa de mutação na região dos exons era mais elevada do que na região dos introns (TAMIYA et al., 1999; OHNO et al., 1998), fenômeno inesperado de mutação acelerada que foi primeiramente descrito para as PLA<sub>2</sub> (OGAWA et al., 1992 e 1996; NAKASHIMA et al., 1993 e 1995).

Novas seqüências codificando proteínas estruturalmente relacionadas, constituindo novas classes dentro da família das toxinas em forma de três dígitos foram identificadas e estudadas graças às técnicas de biologia molecular (DANSE et al., 1990; DUCANCEL et al., 1990; LIN et al., 1998; QIAN et al., 1998a; 1998b; 1999; CHANG et al., 2000a; GONG et al., 2000). Outras toxinas também vêm sendo produzidas por engenharia genética em *Escherichia coli* e outros sistemas, como diversas PLA<sub>2</sub>, incluindo uma fosfolipase A<sub>2</sub> ativa do veneno de *Agkistrodon piscivorus* (LATHROP et al., 1992) e de *Notechis scutatus scutatus* (HODGSON et al., 1993), a cardiotoxina V (CHI et al., 1994) e a cardiotoxina VII (CHANG et al., 1994; CHANG et al., 2000b) de *Naja*, as dendrotoxinas K, I e E de mambas (DANSE et al., 1994; SMITH et al., 1995), as toxinas ganglionares neuronais, como κ - bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* (FIORDALISI et al., 1991; 1996; CHANG et al., 1997b), as toxinas sinérgicas em *Dendroaspis* (ROWAN et al., 1990), as toxinas muscarínicas (DUCANCEL et al., 1991; NASMAN et al., 2000), as metaloproteases e desintegrinas de *Bothrops* (MOURA DA SILVA et al., 1999; SELISTRE ARAÚJO et al., 2000), entre inúmeras outras.

## Uma Nova Abordagem para o Estudo do Veneno de *Micrurus corallinus*

A abordagem clássica do estudo dos venenos que parte do isolamento bioquímico da toxina em direção à clonagem do gene com a intenção de obter produtos recombinantes não é exequível no caso da coral, pois os componentes do veneno não são conhecidos, devido à quantidade limitada de veneno disponível. Em nossa linha de pesquisa, utilizamos as técnicas de biologia molecular para caracterizar alguns dos componentes potencialmente tóxicos desse veneno. Os dados prévios sobre os componentes tóxicos do veneno de *M. corallinus* eram esparsos e derivavam principalmente de dados farmacológicos da ação do veneno bruto e dados imunológicos, principalmente de reatividade cruzada.

Partindo-se do pressuposto de que a glândula de veneno das serpentes é um tecido diferenciado especializado na síntese de toxinas (SATO et al., 1969) e que os RNA mensageiros da glândula de veneno são relativamente estáveis (TAKEDA et al., 1974), é possível esperar encontrar em uma biblioteca de expressão de cDNA da glândula de veneno de *Micrurus*, clones expressando toxinas que podem ser identificados usando-se soro anti – elapídico. Entretanto, um vez que o soro anti – elapídico é preparado com o veneno bruto, os clones imunorreativos podem apresentar componentes tóxicos e não tóxicos. Por outro lado, tendo em vista a especialização da glândula em sintetizar toxinas, é de se esperar que entre os cDNAs mais abundantes estejam os genes codificantes para essas toxinas. Uma vez seqüenciados esse clones, por comparação da seqüência em bancos de dados é possível identificar o tipo de proteína e a sua possível função biológica. Além disso, os genes identificados podem ser expressos em sistemas heterólogos, fornecendo proteínas recombinantes que poderiam possibilitar a produção de anticorpos específicos e até mesmo a caracterização da atividade biológica da suposta toxina. Foi pensando nessa abordagem reversa que foi construída uma biblioteca de expressão de cDNA dos mRNAs isolados da glândula de veneno da cobra coral brasileira *Micrurus corallinus* em  $\lambda$ gt11D (Pharmacia ®) (HO et al., 1995).

A espécie de serpente foi escolhida porque a ação do veneno exibia duas atividades neurotóxicas distintas (VITAL BRAZIL, 1987). O seu veneno é um dos de mais alta toxicidade entre os venenos das corais (SILVA, et al. 1993) e é a espécie que mais causa acidentes no centro sul do País, sendo seu veneno utilizado para imunizar cavalos e produzir o soro anti – elapídico produzido pelo Instituto Butantan (RAW et al., 1991).

Esse procedimento mostrou-se frutífero, vindo a ser isolado dessa biblioteca alguns genes que apresentaram similaridade estrutural com lectinas, fatores natriuréticos,  $\alpha$  - neurotoxinas e fosfolipases  $A_2$  (HO et al., 1995; HO et al., 1997). Os cDNAs dos clones *nxb1*, *nxb3*, *nxb7* e *nxb8* tinham similaridade com a família de toxinas com estrutura em forma de três dígitos dos elapídeos do velho mundo (HO et

al., 1995). As três primeiras seqüências são possíveis isotoxinas. A seqüência *nxb1* foi subclonada, expressada e caracterizada em nosso laboratório (SILVEIRA de OLIVEIRA, 2000; SILVEIRA de OLIVEIRA et al., 2000; PRIETO da SILVA et al., 2001). A seqüência de *nxb8*, por mostrar-se peculiar em relação às outras, foi o objeto desta tese (FIGURA 05).



## OBJETIVOS GERAIS

1. Definir o papel da proteína NXH8 no veneno de *M. corallinus*.
2. Obtenção de anticorpos que neutralizem possíveis ações tóxicas de NXH8, ou do veneno de *M. corallinus*.



## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análise da seqüência primária de NXH8.
2. Clonagem e expressão do cDNA de NXH8 em *Escherichia coli* em diversos sistemas de expressão bacterianos (pRSET; pCP e pEZZ18).
3. Analisar se a toxina recombinante é reconhecida pelo soro anti - elapídico produzido pelo Instituto Butantan.
4. Produção de anticorpos contra NXH8 recombinante.
5. Verificar se o soro produzido reconhece proteínas de outros venenos elapídicos e não elapídicos.
6. Verificar se esses anticorpos impedem a ligação do veneno bruto de *M. corallinus* aos nAChR do músculo de embriões de rato.



# MATERIAL & MÉTODOS

## 1 Análise da Seqüência de cDNA

### 1.1 Composição de Aminoácidos e Estrutura

A seqüência de cDNA do clone *nxb8* (EMBL *accession number* AJ344067) foi analisada utilizando as ferramentas do “ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) *Molecular Biology Server*” (<http://www.expasy.org>). A seqüência de aminoácidos foi traduzida usando a ferramenta “*Translate*” (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). O 3º quadro de leitura lido de 5'→3' codifica para o precursor de NXH8, contendo 86 aminoácidos, pI 8,32 e massa molecular teórica de 9 591 Da. O peptídeo maduro NXH8 tem 65 aminoácidos pI 8,39 e massa molecular teórica de 7 268 Da.

Os parâmetros físico-químicos foram calculados usando-se a ferramenta “*ProtParam*” (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). A estrutura secundária do peptídeo maduro NXH8 foi analisada independentemente usando-se as ferramentas “*PSIpred*” (<http://insulin.brunel.ac.uk/psipred>, JONES, 1999) e “*PREDATOR*” ([http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator\\_serv.pl](http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator_serv.pl), FRISHMAN & ARGOS, 1995).

### 1.2 Determinação do Peptídeo Sinal

A seqüência do precursor foi analisada no SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Um programa de predição de seqüências sinais de secreção de proteínas de eucariotos. O peptídeo sinal de NXH8, também pode ser determinado por simples comparação com precursores e formas maduras de toxinas similares. As seqüências dos precursores usados foram: NXHL BUNMU (Homólogo de Neurotoxina Longa de *Bungarus multicinctus*); NXS1 LATSE (Precursor da Neurotoxina Curta 1, erabutoxina a de *Laticauda semifasciata*); TXW1 NAJAT (Precursor da Neurotoxina Fraca 1 de *Naja atra*); NXL1 BUNMU (Precursor da  $\kappa$  - Neurotoxina 1,  $\kappa$  - bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*) e TSYL DENAN (Precursor da Toxina Sinérgica de *Dendroaspis angusticeps*).

### 1.3 Similaridade e Alinhamento

As seqüências de aminoácidos do precursor e do peptídeo maduro de NXH8 MICCO (“*Micrurus corallinus*” - Neurotoxin homologue 8) foram submetidas a uma comparação com bancos de dados de

seqüências de proteínas (SWISS-PROT/TREMBL) usando o programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* ([http://www.ch.emblnet.org/cgi-bin/blast20\\_parser.pl](http://www.ch.emblnet.org/cgi-bin/blast20_parser.pl); ALTSCHUL et al., 1997).

Para identificar a qual subclasse da família de toxinas a NXH8 seria relacionada, diversas seqüências escolhidas no SWISS-PROT/TREMBL após uma busca utilizando o programa PSI-BLAST (*Position specific iterative BLAST*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), foram cuidadosamente alinhadas manualmente com NXH8 e NXH1 utilizando-se o programa MACAW - *Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench* (SCHULER et al., 1993). A matriz de similaridade usada foi a BLOSUM 62.

Foram escolhidas 37 seqüências de toxinas de serpentes como representantes de cada tipo de toxinas elapídicas em três dígitos. Assim NXH8 foi alinhado com cardiotoxinas, bloqueadores de canais de cálcio tipo L, inibidores da agregação plaquetária, fasciculinas ou anticolinesterases, toxinas sinérgicas, toxinas muscarínicas, toxinas neuronais ou  $\kappa$  - neurotoxinas,  $\alpha$  - neurotoxinas longas e  $\alpha$  - neurotoxinas curtas. Além dessas, NXH8 foi alinhada com diversos tipos de toxinas de padrão similar quanto às pontes dissulfeto, denominadas neurotoxinas fracas de *Naja*, homólogos de neurotoxinas longas 1 e 2 de *Bungarus* e toxinas tipo bucandina. As seqüências alinhadas e seus códigos de acessos no banco de dados do SWISS-PROT / TREMBL são:

**Homólogos 1 de  $\alpha$  - Neurotoxinas Longas:** NTL1 BUNMU – peptídeo maduro de “Neurotoxin-like protein” *Bungarus multicinctus* (Q9YG19); CADO BUNCA – “Candoxin” *B. candidus* (P81783); NXLH BUNMU – peptídeo maduro de “Long Neurotoxin Homolog” *B. multicinctus* (P15818). **Homólogos 2 de  $\alpha$  - Neurotoxinas Longas:** NXGB BUNMU – “ $\gamma$  - Bungarotoxin” *B. multicinctus* (Q9W796); NXDP BUNMU - peptídeo maduro de “ $\delta$  - protein toxin” *B. multicinctus* (O12963). **Neurotoxinas Fracas:** TXW5 NAJNA – “Weak Neurotoxin 5” *Naja naja* (P29179); TXW4 NAJME – “Weak Toxin S4C11” *N. melanoleuca* (P01400); TXW1 NAJHH – “Weak Toxin CM-11” *N. haje haje* (P01401); TXW3 NAJAT - peptídeo maduro de “Probable Weak Neurotoxin NNAM3” *N. atra* (Q9YGI1); TXW6 NAJNA – “Weak neurotoxin 6” *N. naja*. (P29180). **Bucandina:** BUCA BUNCA – “Bucandin” *B. candidus* (P81782). TX64 DENJA – “Toxin S6C4” *D. jamesoni kaimosae* (P25882);  **$\alpha$  - Neurotoxinas Longas:** NXL1 NAJKA – “Alpha-Cobratoin” *N. naja kaouthia*. (P01391); NXLA BUNMU – “Alpha-Bungarotoxin”, *B. multicinctus* (P01378); NXL1 NAJHC – “Long Neurotoxin III” *N. haje anchietae* (P01389); NXL1 ASPSC – “Toxin S4C6” *Aspidelaps scutatus* (P25670). **Toxinas Neuronais:** NXL1 BUNMU – “ $\kappa$  - Bungarotoxin” *B. multicinctus*. (P01398); NXL2 BUNFL – “ $\kappa$  - Flavitoxin” *B. flaviceps flaviceps* (P15815). **Toxinas Muscarínicas:** TXMA DENPO – “Muscarinic Toxin -  $\alpha$ ”, *D. polylepis polylepis* (P80494); TXM7 DENAN – “Muscarinic Toxin 7” *D. angusticeps* (P80970); TXM1 DENAN – “Muscarinic Toxin 1” *D. angusticeps*

(P81030). **Toxinas Sinérgicas:** TS81 DENAN – “Protein C8S2 Chain 1” *D. angusticeps* (P01410); TS24 DENJA – “Toxin S2C4 chain 1” *D. jamesoni kaimosae* (P01407); TSYL DENAN – peptídeo maduro de “Synergistic-Like Venom Protein” *D. angusticeps* (P17696). **Cardiotoxinas:** CX9H HEMHA – “Cytotoxin Homolog 9B” *Hemachatus haemachatus* (P24778); CX04 NAJAT – “Cardiotoxin IV” *N. naja atra* (P01443); CX01 NAJMO – “Cardiotoxin XIIB” *N. mossambica mossambica* (P01467).  **$\alpha$  - Neurotoxinas Curtas:** NXS1 LATSE – “Erabutoxin a”, *Laticauda semifasciata* (P01435); NXSB NAJAT – “Cobrotoxin B” *N. naja atra* (P80958); NXS1 NAJOX – “Oxiana alpha neurotoxin” *N. oxiana* (P01427); NXS1 MICNI – “Short neurotoxin alpha” *Micrurus nigrocinctus* (P80548). **Fasciculinas:** TXF7 DENAN – “Acetylcholinesterase Toxin F-VII” *D. angusticeps* (P01403); TXAC DENPO – “Acetylcholinesterase Toxin C” *D. polylepis polylepis* (P25681). **Inibidores de agregação plaquetária:** MAMB DENJA – “Mambin”, *D. jamesoni kaimosae* (P28375); TX51 DENJA – “Toxin S5C1” *D. jamesoni kaimosae* (P01413). **Bloqueadores de canais de cálcio tipo - L:** TXCA DENPO – “Calciseptine” *D. polylepis polylepis*. (P22947); TXF2 DENPO – “Toxin FS-2” *D. polylepis polylepis* (P01414). NXH1 MICCO – peptídeo maduro de “Alpha Neurotoxin Homolog 1” *Micrurus corallinus* (Q9PUB7).

NXH8 foi também alinhado com 27 toxinas do veneno de serpentes elapídicas encontradas no SWISS-PROT com dez cisteínas formando cinco pontes dissulfeto com a mesma topologia. O alinhamento foi construído como descrito anteriormente. Como grupos externos para fins de comparação foram utilizadas seqüências de  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas. As seqüências usadas foram:

**Bucandina:** BUCA BUNCA: “Bucandin” de *Bungarus candidus* (P81782); TX64 DENJA: “Toxin S6C4” de *Dendroaspis jamesoni kaimosae* LD<sub>(50)</sub> = 10 mg/kg I.V. (P25682). **Neurotoxinas fracas:** TXW3 NAJAT: Peptídeo maduro de “Weak neurotoxin 3” NNA3 de *Naja atra* (Q9YGI1); TXW5 NAJNA: “Weak Neurotoxin 5” de *Naja naja* (P29179); TXWB NAJHA: “Weak Toxin CM-13B” de *Naja haje annulifera* LD<sub>(50)</sub> = 4,86 mg/kg (P01399); TXW4 NAJME: “Weak Toxin S4C11” de *Naja melanoleuca* LD<sub>(50)</sub> > 20 mg/kg IV. (P01400); TXW1 NAJHH: “Weak Toxin CM-11” *Naja haje haje* LD<sub>(50)</sub> = 13.4 mg/kg SC. (P01401); TXW6 NAJNA: “Weak Neurotoxin 6” de *Naja naja* (P29180); TXWK NAJAT: Peptídeo maduro de “ $\kappa$ -Cobrotoxin Weak toxin Precursor” de *Naja atra* (O93422); TXW0 NAJNI: “Weak Toxin CM-10 de *Naja nivea* LD<sub>(50)</sub> = 16 mg/kg IV. (P25680); TXW7 NAJNA: “Weak neurotoxin 7” *Naja naja*, (P29181); TXW8 NAJNA: “Weak neurotoxin 8” de *Naja naja* (P29182); TXWW NAJKA: “Weak Tryptophan-Containing Neurotoxin” de *Naja naja kaouthia* (P82935); TXW9 NAJKA: “Weak Toxin CM-9A” de *Naja naja kaouthia*, LD<sub>(50)</sub> = 82 mg/kg (P25679); WTX1 NAJSP: peptídeo maduro de “Weak Neurotoxin Isoform 1” de *Naja sputatrix* (O42256); WTX3 NAJSP: Peptídeo maduro de “Weak Neurotoxin Isoform 3” de *Naja sputatrix* (O42255); WTX2 NAJSP: Peptídeo maduro de “Weak

Neurotoxin Precursor” de *Naja sputatrix* (Q9W714); WTX4 NAJSP: Peptídeo maduro de “Weak neurotoxin 9 isoform” de *Naja sputatrix* (Q9W713); WTX4 NAJNA: Peptídeo maduro de “Neurotoxin NNA4” de *Naja naja* (Q9YGI7); XXX9 NAJAT: Peptídeo maduro de “Weak neurotoxin TA-N9” (NNA2) de *Naja atra* (Q9YGI4). **Homólogos de neurotoxinas longas 2:** NXDP BUNMU: Peptídeo maduro de “ $\delta$  - Neurotoxin Precursor” de *B. multicinctus* (O12963); NXD2 BUNMU: peptídeo maduro de “Neurotoxin-Like Protein Precursor” de *B. multicinctus* (Q9YGH9); NXGB BUNMU: Peptídeo maduro de “ $\gamma$  - Bungarotoxin Precursor” de *B. multicinctus* LD<sub>(50)</sub> = 0,15 mg/kg (Q9W796). **Homólogos de neurotoxinas 1:** CADO BUNCA: “Candoxin” de *Bungarus candidus* (P81783); NXLH BUNMU: Peptídeo maduro de “Long Neurotoxin Homolog Precursor” de *B. multicinctus* (P15818); NTL1 BUNMU: Peptídeo maduro de “Neurotoxin-like protein 1” de *B. multicinctus* (Q9YGI9).

A similaridade com NXH8 foi calculada, segundo as propriedades físico – químicas dos aminoácidos agrupados como: (Ile, Leu, Val, Met) (Phe, Trp, Tyr) (Lys, Arg, His) (Asp, Asn, Glu, Gln) (Gly, Ala, Ser, Thr) (Pro) (Cys). A similaridade foi calculada dividindo o número de posições alinhadas contendo resíduos sinônimos divididos pelo o número de posições comparadas. Entretanto, o alinhamento foi colorido segundo uma escala baseada na matriz BLOSUM62. O alinhamento perfaz 79 posições, levando em conta os intervalos para inserções e deleções.

## 1.4 Filogenias

Os dendrogramas das FIGURAS 08 e 10 foram construídos usando-se os alinhamentos das FIGURAS 07 e 09 no “*Phylogeny Inference Package*” (PHYLIP 3.57c). As distâncias entre as seqüências foram calculadas pelo PROTDIST com base em uma matriz dos mesmos grupos de propriedades físico-químicas dos aminoácidos tal como citado. A probabilidade de mudança de categoria desses grupos foi ajustada usando-se  $e = 0,55$ . Os intervalos foram considerados como substituições. A matriz de distâncias assim calculada foi então utilizada no programa KITSCH (método de Fitch-Margoliash com espécies contemporâneas) para construir o dendrograma (FELSENSTEIN, 1989 e 1995).

Para o dendrograma da família mostrada na FIGURA 08, usou-se como grupo externo a seqüência do peptídeo maduro de Lynx1 (LYNX MOUSE, *Mus musculus* (Q9WVC2), que tem 10 cisteínas que podem ser alinhadas com as cisteínas de NXH8. As cisteínas são responsáveis por quase 16% da similaridade total e a similaridade de Lynx-1 com as seqüências de serpente alinhadas está ao redor de 30%. Esta seqüência foi alinhada, apenas para ser usada na filogenia como grupo externo e portanto, não é mostrada no alinhamento da FIGURA 07.

Para o dendrograma da FIGURA 10 usou-se como grupos externos a  $\alpha$  - Neurotoxina curta - NXS1 LATSE: “Short Neurotoxin 1 - Erabutoxin a” de *L. semifasciata*, LD<sub>(50)</sub> = 0.15 mg/kg i.m. (P01435). E as  $\alpha$  – neurotoxinas longas: NXL1 NAJKA: “Long neurotoxin 1 -  $\alpha$  Cobratoxin” de *Naja naja kaouthia* LD<sub>(50)</sub> = 0.1 mg/kg (P01391) s.c. e a NXLA BUNMU: “alpha neurotoxin 1 -  $\alpha$  Bungarotoxin” de *B. multicinctus*, LD<sub>(50)</sub> = 0.3 mg/kg s.c. (P01378).

## 1.5 Modelo Tridimensional

As figuras dos modelos tridimensionais foram analisadas e montadas utilizando o “Swiss-PdbViewer” (<http://www.expasy.org/spdbv>, GUEX & PEITSCH, 1997) e utilizados para fins ilustrativos. O modelo de NXH8 utilizado (FIGURA 41) foi montado com a ferramenta “SWISS-MODEL” (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). A sequência de NXH8 foi alinhada com os modelos tridimensionais **1JE9** (Modelo NMR da neurotoxina curta II de *Naja Kaouthia*), **1NOR** (Modelo de NMR da neurotoxina II de *Naja naja oxiana*), **1TXA** (Modelo de NMR da neurotoxina longa - toxina B, *Ophiophagus Hannah*), **1COD** (Modelo de NMR da neurotoxina curta “cobrotoxin” de *Naja naja atra*), **1NEA** (Modelo de NMR da Toxina  $\alpha$  de *Naja oxiana*), Modelos **1CTX** (Modelo de cristalografia da neurotoxina longa  $\alpha$  - cobratoxina de *Naja kaouthia*), **1G6M** (Modelo de NMR da neurotoxina longa  $\alpha$  - cobratoxina de *Naja kaouthia*), **1ERA** (Modelo de NMR de erabutoxina B de *Laticauda semifasciata*), **1QKE** (Modelo de cristalografia da erabutoxina a de *Laticauda semifasciata*), **1F94** (Modelo de cristalografia da Bucandina de *Bungarus candidus*), **2ABX** (Modelo de cristalografia da  $\alpha$  - bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*), **1TGXA** (Modelo de cristalografia da cardiotoxina  $\gamma$  de *Naja nigricollis*) e **1ERG** (Modelo de NMR do domínio extracelular solúvel da proteína regulatória do complemento CD59).

Cada modelo foi utilizado independentemente e em combinação com outros para gerar o modelo de NXH8. Os modelos resultantes foram submetidos às ferramentas de validação de modelos (<http://biotech.embl-heidelberg.de:8400>), “PROCHECK” (LASKOWSKI et al., 1993) e “WHAT IF” (RODRIGUEZ et al., 1998). O melhor modelo resultou do alinhamento de NXH8 com **1F94**, **1COD**, **1NOR** e **1CTX**. A probabilidade do modelo de NXH8, gerado usando a combinação desses quatro moldes, estar correto é de 0,94. Como controle negativo usou-se o modelo de cristalografia do inibidor da tripsina pancreática bovina (**1BPI**), uma pequena proteína rica em pontes dissulfeto não relacionada com o padrão estrutural das toxinas de serpente em forma de três dígitos. A probabilidade desse modelo de NXH8, gerado com base em **1BPI**, estar correto foi menor que 0,5.

Para gerar as figuras das ilustrações foram usados os seguintes modelos: erabutoxina a (**1QKE**);  $\alpha$  - cobratoxina (**1CTX**); cardiotoxina IV (**1KBS**);  $\kappa$  - bungarotoxina (**1KBA**); bucardina (**1F94**); CD59 (**1ERG**) e Lynx-1. O modelo de Lynx-1 foi gentilmente oferecido pelo Dr. Roberto Sánchez (*Laboratory of Molecular Biophysics – Rockefeller University*).

## 2 Estratégia de Clonagem, Expressão e Purificação

### 2.1 Tipos de Vetores e Primers Utilizados

Os vetores utilizados, suas características e funções mais importantes estão indicados na TABELA 03.

#### 2.1.1 pRSETC-nxh8M e pRSETB-SSnxh8

Os vetores da série pRSET (Invitrogen®) são plasmídios derivados do vetor de clonagem pUC 18/19, projetados para obtenção de proteínas recombinantes com altos níveis de expressão em *Escherichia coli* e facilidade de purificação em um único passo de cromatografia de afinidade. Esses vetores têm um promotor de T7 e um sítio de ligação ao ribossomo (SLR) posicionado antes do códon ATG de iniciação de tradução, uma série de seis códons para histidina que funcionam como um domínio ligante de metais na proteína traduzida, uma seqüência do gene 10 do fago T7 estabilizadora do transcrito, uma seqüência com o sítio de clivagem da enteroquinase e um sítio de clonagem da proteína de interesse (FIGURA 12 e 13).

O domínio ligante de metal permite a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade em uma coluna quelante carregada com  $\text{Ni}^{2+}$ . O sítio de enteroquinase entre o peptídeo de fusão e a proteína clonada possibilita a retirada da fusão N - terminal da proteína recombinante purificada. Esses plasmídios têm ainda um gene de resistência a ampicilina, que serve como marca de seleção.

O plasmídio recombinante deve ser amplificado em uma linhagem de *E. coli* que não contém a RNA polimerase do fago T7 para prevenir o escape da indução e com baixa taxa de recombinação e endonucleases. Em geral foram utilizadas linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$  ou JM109. A expressão pode ser feita em uma linhagem bacteriana que contenha a RNA polimerase do fago T7 sob o controle de um promotor indutível, tal como *Lac UV-5*, que é induzido na presença de IPTG. Assim o hospedeiro de escolha para a expressão foi a *E. coli* BL21(DE3). Alternativamente se utilizaram as cepas *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* e BL21(DE3)SI.

Os vetores da série pRSET têm um sítio policlonal com diversos sítios para enzimas de restrição (ver FIGURA 12 e 13). A diferença entre os plasmídios pRSET a, b e c, é a seqüência do sítio policlonal, permitindo a escolha do vetor na qual a seqüência da proteína fique em fase com o ATG inicial.

Para construir o vetor pRSET B – SSnxh8 digerimos o vetor pGEM3Zf-nxh8 com as enzimas EcoR I e Pst I. O inserto purificado foi subclonado direcionalmente em fase no vetor pRSET B nos mesmos sítios de restrição. O inserto contém toda a região codificante para o precursor de NXH8. (FIGURA 12)

Para construir o vetor pRSET C – nxh8M amplificamos por PCR o vetor pGEM3Zf-nxh8. A FIGURA 13 mostra a estratégia de clonagem de pRSETC-nxh8M. Usamos um oligonucleotídeo como *primer* 5' hibridizando para a região inicial do peptídeo maduro de NXH8. Esse oligonucleotídeo insere um sítio de BamH I na terminação 5':



O outro *primer* foi o M13/pUC universal reverso que hibridiza na seqüência N - terminal da  $\beta$  - galactosidase do vetor pGEM3ZF(+):



O produto da amplificação por PCR digerido por BamH I pode entrar na direção direta ou reversa quando ligado ao vetor pRSET C. Para selecionar o plasmídio contendo o inserto corretamente orientado utilizou-se análise de restrição com a enzima Xba I (ver FIGURA 13).

O vetor pRSET C - nxh8M expressa o peptídeo maduro de NXH8 em fusão com a cauda de histidinas o que permite a purificação em  $\text{Ni}^{2+}$  - Sepharose. O sítio de clivagem permite que se utilize a enzima enteroquinase, liberando a cauda de poli-histidina e NXH8 acrescido de quatro resíduos aminoácidos na região N – terminal (Asp-Arg-Trp-Ile-NXH8). A fusão expressa por pRSETC-nxh8M, na forma de corpúsculos de inclusão foi denominada rNXH8.

### 2.1.2 pCP-NXH8

O vetor pCP foi gentilmente cedido pelo laboratório do Professor André Ménez, CEA, França. Este vetor também possui um promotor de T7. O promotor está posicionado imediatamente antes da seqüência dos domínios ZZ sintéticos da proteína A de *Staphylococcus aureus*, responsáveis pela ligação dessa proteína à porção Fc da molécula de IgG. Logo em seguida temos o sítio policlonal que possui os sítios de diferentes enzimas de restrição, como mostra a FIGURA 19. O pCP tem ainda um gene de resistência a ampicilina. A presença dos domínios ZZ permite a purificação dessa proteína de fusão por cromatografia em coluna de IgG - Sepharose. A expressão dá-se da mesma forma que nos vetores pRSET. O plasmídeo recombinante é transformado em uma bactéria *E. coli* que tem em seu genoma o gene da RNA polimerase do fago T7 sob o controle de um promotor indutível, como *Lac UV-5*, que é induzido na presença de IPTG. O hospedeiro de expressão de escolha foi a *E. coli* BL21(DE3).

Para construir o vetor pCP-NXH8, parte da seqüência codificante para o peptídeo maduro de NXH8 foi amplificada por PCR e inserida nos sítios Kpn I e BamH I do vetor pCP. Como molde para PCR utilizamos o vetor pGEM3Zf-nxh8. Um oligonucleotídeo contendo um sítio de Kpn I na extremidade 5' e um códon para metionina na posição -1 e uma região complementar ao início dos 21 primeiros nucleotídeos da seqüência que codifica o peptídeo maduro NXH8, foi utilizado como *primer* 5':



Essa metionina separa NXH8 da fusão com ZZ e permite a clivagem por Brometo de Cianogênio (CNBr). Uma vez que a seqüência madura de NXH8 não contém metioninas, a fusão pode ser clivada por CNBr liberando uma toxina idêntica à nativa encontrada no lúmen da glândula de veneno da serpente. O outro *primer* utilizado na reação de amplificação foi o M13/pUC universal reverso que hibridiza na seqüência N - terminal da  $\beta$  - galactosidase do vetor pGEM3ZF(+):



A proteína de fusão recombinante é expressa no citoplasma da bactéria na forma solúvel por pCP-NXH8 foi denominada rZZNXH8.

### 2.1.3 pEZZ-NXH8

O vetor pEZZ (Pharmacia ®) é um vetor para expressão e secreção de proteínas que podem ser purificadas por afinidade a IgG Sepharose 6FF. O vetor codifica a sequência sinal da proteína A e dois domínios sintéticos “Z” baseados no domínio “B” de ligação às IgGs da proteína A. Proteínas em fusão com ZZ são então secretadas no meio de cultura sob direção da sequência sinal da proteína A. O domínio ZZ de 14 kDa tem características peculiares que pouco interferem na renaturação do seu parceiro de fusão. O promotor da proteína A que controla a secreção não é induzível. Alguns elementos da proteína A fornecem o códon iniciador ATG e o sítio de ligação ao ribossomo. O códon de terminação tem de ser inserido pelo inserto. O plasmídeo ainda confere resistência à ampicilina.

Para construir o vetor pEZZ-NXH8 inserimos a região codificante do peptídeo maduro de NXH8 nos sítios BamH I e Kpn I do vetor pEZZ18. Para isto, simplesmente digerimos o vetor pCP-NXH8 com as mesmas enzimas e o inserto purificado foi inserido no pEZZ18. O inserto carrega a metionina -1 de separação de NXH8 na fusão com ZZ e o *stop* códon próprio. O vetor pEZZ-NXH8 e a estratégia de clonagem são mostrados na FIGURA 26.

### 2.1.4 pRSETB-ZZNXH8

Para construir, o vetor pRSETB-ZZNXH8 amplificamos o vetor pCP-NXH8 por PCR. O produto da reação purificado foi digerido com BamH I e clonado no vetor pRSET B digerido no mesmo sítio com suas extremidades desfosforiladas. O *primer* de amplificação direto foi:

BamH I  
5' G ACG GAT CCG CAT ATG CCG CAA CAC GAT GAA CC 3'  
*seqüência para ZZ (região 1353-1370)*

O primer de amplificação reverso foi:

BamH I  
5' CCG GAA TTC TCG AGG ATC CGG TTT ATT CGA TTC TCA AAC T 3'  
*seqüência para a região 3' não traduzida de nxh8 ( 460 - 420)*

A estratégia de clonagem do vetor pRSET B – ZZNXH8 pode ser vista na FIGURA 28. O produto da amplificação por PCR digerido com BamH I pode entrar no sentido reverso ou direto ao ser ligado ao vetor pRSET B. Para selecionar o plasmídeo contendo o inserto na orientação correta foi feita uma análise de restrição usando-se as enzimas Bgl II, Nde I e Cla I (ver FIGURA 29)

O vetor pRSET B – ZZNXH8 expressa a fusão ZZNXH8 com uma cauda de histidinas e expressa a proteína recombinante solúvel no citoplasma. Essa proteína recombinante foi denominada (His)ZZNXH8 e pode ser purificada tanto por cromatografia de afinidade metálica em Ni<sup>2+</sup> – Sepharose, quanto em cromatografia de imunoafinidade. A toxina NXH8 pode ser separada da fusão por clivagem com CNBr.

### 3 Protocolos de Biologia Molecular

Todos os protocolos padrões de biologia molecular tais como preparo de bactérias competentes, reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforeses de DNA em géis de agarose, mini -preparações de plasmídios, digestões com enzimas de restrição, preparo e purificação de insertos de DNA, reação de desfosforilação de terminações de plasmídios digeridos com enzimas de restrição, reações de ligação, e etc. se basearam nos métodos descritos em SAMBROOK et al., 1989 e em AUSUBEL et al., 1989, observando as especificações dos fabricantes dos reagentes utilizados. Plasmídios, insertos e produtos de PCR foram também purificados dos géis de agarose utilizando-se o sistema “GeneClean” (BIO 101 ®)

### 4 Seleção dos Clones Recombinantes

#### 4.1 Por Tamanho

Para a seleção dos clones contendo os plasmídios recombinantes foi utilizado o método de seleção rápido descrito por BEUKEN et al., 1998. Algumas colônias de bactérias transformadas com o produto de ligação vetor: inserto foram amplificadas em meio LB líquido com ampicilina num volume de 3 mL cada durante uma noite, sob agitação constante a 37°C. Na manhã seguinte, 300 µL de cada cultura foram centrifugados por 30 segundos a velocidade máxima (14 krpm) em microcentrífuga e o meio foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 40 µL de tampão de aplicação (*Ficoll Dye*) e acrescentaram-se 14 µL de fenol: clorofórmio 1:1 a cada tubo. Os tubos foram agitados em vortex por 5 a 10 segundos para a lise das células e centrifugados por 3 minutos para separação das fases orgânica e aquosa. Foram aplicados 40 µL da fase aquosa de cada amostra em um gel de agarose 1,2% sem brometo de etídio. Nesse mesmo gel foi aplicado uma amostra de DNA do respectivo plasmídio parental não recombinante não digerido, além de um padrão de DNA  $\lambda$ / Hind III. Depois da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e as amostras foram visualizadas em transiluminador UV. Os DNAs das amostras cujas massas moleculares aparentes eram nitidamente

maiores que o tamanho do vetor vazio (não recombinante) tiveram seu DNA plasmidial purificado com o kit *Nucleon Mip* (Amersham) a partir da própria cultura inicial.

## 4.2 Por Análise de Restrição

Os possíveis plasmídios recombinantes selecionados por tamanho foram analisados com enzimas de restrição capazes de identificar a presença do inserto de NXH8 e novamente analisados em gel de agarose a 1%. Os plasmídios digeridos foram aplicados em gel de agarose 1% e visualizados em transiluminador UV.

As amostras digeridas que apresentavam um inserto do tamanho esperado e de acordo com o mapa de restrição foram amplificadas novamente em bactérias DH5 $\alpha$  e o DNA plasmidial foi purificado com o kit *Nucleon Mip* (Amersham). Alternativamente os plasmídios recombinantes foram obtidos de culturas saturadas reamplificadas e então tratadas pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Os plasmídios purificados foram digeridos com as enzimas de restrição usadas em cada clonagem e demais enzimas mostradas na estratégia de clonagem de cada vetor.

## 5 Seqüenciamento

Os plasmídios recombinantes pRSETC-nxh8M; pCP-NXH8; pEZZ-NXH8 e pRSETB-ZZHNXH8 foram amplificados em bactérias *E. coli* da linhagem DH5 $\alpha$  e purificados com o kit *Nucleon Mip* (Amersham). Precipitou-se o DNA plasmidial com 2 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio, pH 5,2. Esse DNA foi seco e ressuspendido em água para uma concentração de 200 ng/mL. 400 ng de DNA de cada plasmídio foram seqüenciados em seqüenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* Perkin Elmer (Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan) pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Usaram-se nos seqüenciamentos a Taq DNA Polimerase, dNTPs e ddNTPs *ABI Prism Big Dye terminator*, todos componentes do kit *Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer). Depois da termociclagem, os produtos de reação foram separados em gel de seqüenciamento de DNA de 36 cm de comprimento (4,25% acrilamida: bisacrilamida na proporção 19:1 v./v. em TBE e uréia 6 mol/L), montado segundo a especificação do fabricante, por 6 horas. O aparelho está ligado a um sistema de detecção que consiste em uma fonte de laser e um detector de fluorescência, localizados na parte inferior do gel de seqüenciamento. Cada ddNTP *Big Dye* emite uma fluorescência específica que é captada pelo detector, que por sua vez, envia a informação a um computador que automaticamente registra a posição do nucleotídeo no eletroferograma.

Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos para o sequenciamento completo dos plasmídios recombinantes: os *primers* M13/pUC universais e T7 Promoter, ou os próprios *primers* de clonagem já descritos.

## 6 Expressão e Obtenção das Proteínas Recombinantes

Bactérias *E. coli* da linhagem BL 21 (DE3) competentes por cloreto de cálcio foram transformadas com os plasmídios recombinantes. As bactérias transformadas foram crescidas em meio líquido 2YT com ampicilina a 37°C, sob agitação constante até atingirem densidade óptica a 600 nm entre 0,6 e 1,0. A expressão do gene recombinante foi induzida pela adição de 1 mmol/L de IPTG ao meio de cultura. Amostras da cultura antes da indução e após indução foram recolhidas para análise em gel de SDS-PAGE.

A cultura induzida foi centrifugada a 5 000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus, com o rotor SLA - 3000 por 20 minutos a 4°C e o meio foi desprezado. As células foram congeladas a - 80°C até o momento da purificação da proteína recombinante.

### 6.1 Lise Bacteriana

As culturas de bactérias induzidas foram centrifugadas a 5 000 rpm e ressuspensas em 1/10 do volume da cultura em tampão de lise (Tris pH 8 50 mmol/L; NaCl 100 mmol/L; EDTA 10 mmol/L; PMSF 1 mmol/L; 0,1% Triton-X100). As células foram rompidas em prensa hidráulica (“*French Press*”) a 21 000 psi. Alternativamente as células foram rompidas por sonicação de 15 minutos num banho de gelo, em ciclos de 5 segundos com sonicador para microtip a 60% da potência por ciclo. As frações de proteínas solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação por 20 minutos a 4°C numa velocidade de 12 000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus e rotor SS-34.

### 6.2 Choque Osmótico

As culturas bacterianas induzidas ou não por IPTG na O.D.  $_{600nm} = 0,6$  foram incubadas com lisozima (100 µg/mL) durante 20 minutos sob agitação branda. A seguir as culturas (~2 mL) foram centrifugadas a 4°C a 5 000 rpm e delicadamente ressuspensas em um tampão sucrose 20%; Tris pH 8,0 30 mmol/L; PMSF 1 mmol/L; EDTA 10 mmol/L. O material foi incubado sob agitação branda por 10 minutos e então centrifugado durante 15 minutos a 5 000 rpm a 4 °C. O procedimento foi novamente repetido. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi delicadamente ressuspensado em 100 µl de

uma solução gelada de 5 mmol/L KCl e 1 mmol/L EDTA, deixou-se agitando em banho de gelo durante 15 minutos e centrifugou-se novamente. As amostras de sobrenadante e precipitado foram recolhidas e misturadas com 5X tampão de aplicação de SDS-PAGE.

### 6. 3 Isolamento dos Corpúsculos de Inclusão

A proteína expressa em corpúsculos de inclusão pelas culturas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas por pRSETC-nxh8M foi isolada após a lise bacteriana por centrifugação a 7 000 rpm durante 15 minutos. O precipitado sofreu três lavagens por centrifugação e foi ressuspensão em tampão Tris pH 8,0 50 mmol/L; NaCl 100 mmol/L; PMSF 1 mmol/L; EDTA 10 mmol/L; 0,1% Triton X-100; 3 mol/L de uréia (10ml de tampão/g de precipitado). A seguir, os corpúsculos foram lavados 3 vezes no mesmo tampão sem o Triton X-100. O precipitado foi então solubilizado (10mL/g) em um tampão de solubilização uréia 8 mol/L; Tris pH 8,0 50 mmol/L; NaCl 100 mmol/L;  $\beta$ ME. 10 mmol/L Deixou-se homogeneizando por agitação em “roller” durante 1 hora a temperatura ambiente e o material foi centrifugado a 12 000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante da solução uréia 8 mol/L foi reservado.

## 7 Purificação e Renaturação das Proteínas Recombinantes

### 7.1 Renaturação de rNXH8

A proteína recombinante rNXH8 solubilizada em tampão de solubilização de corpúsculos de inclusão com Ureia 8 mol/L foi diluída na proporção 1:200 (v/v) por gotejamento usando uma bomba peristáltica em um tampão de renaturação contendo: Tris pH8,0 100 mmol/L; NaCl 150 mmol/L; cistina 1mmol/L e cisteína 5 mmol/L (1:5). Alternativamente, utilizou-se glutatona reduzida 2 mmol/L e oxidada 4 mmol/L (2: 4). A solução foi mantida em agitação magnética por 10 horas a 14°C. A seguir, a solução foi centrifugada a 12 000 rpm por 15 minutos ou filtrada em 0,22  $\mu$ .

### 7.2 Purificação por Afinidade Metálica

As proteínas recombinantes rNXH8 e (His)ZZNXH8 foram purificadas com a utilização de uma resina carregada com Ni<sup>2+</sup> como descrito por CROWE & HENKO, 1992. Foi acrescentado à resina *Chelating Sepharose* (Pharmacia®) 0,5 volume de coluna de NiSO<sub>4</sub> 300 mmol/L. Após mistura por inversão, a resina foi deixada por 5 minutos a temperatura ambiente e decantada. A resina foi lavada 4 vezes com tampão de equilíbrio 1X (NaCl 300 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,9) e armazenada a temperatura ambiente com dois volumes desse mesmo tampão.

### 7.2.1 Purificação de rNXH8

A solução de proteína recombinante rNXH8 expressa sobre a forma de corpúsculos de inclusão, solubilizados e renaturados como descrito anteriormente, foi aplicada a coluna de Ni<sup>2+</sup> – Sepharose (5 mL para cada 100 mL de solução de proteína). A seguir a coluna foi lavada com 5 volumes de tampão de lavagem contendo Tris 50 mmol/L pH 6,3; NaCl 100 mmol/L; imidazol 5 mmol/L. O eluato da coluna foi monitorado nos comprimentos de onda de 420 e/ou 280 nm. Quando se estabeleceu a linha de base, a coluna foi eluída com 5 volumes de um tampão contendo 250 mmol/L imidazol; 50 mmol/L Tris pH 8,0; 100 mmol/L NaCl. A seguir, a coluna foi eluída com 100 mmol/L EDTA; 50 mmol/L Tris pH 8,0; 100 mmol/L NaCl.

Alternativamente rNXH8 foi purificado em condições desnaturantes. Os corpúsculos de inclusão solubilizados em tampão de uréia 8 mol/L de Tris 50 mmol/L pH 8,0; NaCl 100 mmol/L;  $\beta$ ME 1 mmol/L foram aplicados diretamente na coluna de cromatografia em Ni<sup>2+</sup> – Sepharose previamente equilibrada com um tampão uréia 8 mol/L; NaCl 300 mmol/L; Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,9. A coluna foi lavada até formar linha de base com um tampão contendo uréia 4 M; Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mmol/L; imidazol 5 mmol/L e a seguir, a proteína recombinante foi eluída em um tampão uréia 2 mol/L; imidazol 250 mmol/L; Tris 50 mmol/L pH 8,0; NaCl 100 mmol/L.

### 7.2.2 Purificação de (His)ZZNXH8

A proteína expressa por pRSETB-ZZNXH8 em *E. coli* BL21(DE3) obtida no sobrenadante do lisado da cultura bacteriana foi adsorvida a colunas de Ni<sup>2+</sup> – Sepharose. A coluna foi, a seguir, lavada com 5 volumes de tampão de equilíbrio 300 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris pH8,0; 0,1% Tween 20. Subseqüentemente, a coluna foi lavada com mais 5 volumes de tampão 300 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris pH6,3; 20 mmol/L imidazol. A seguir, foi eluída com 50 mmol/L Tris pH5,9; 100 mmol/L NaCl; 250 mmol/L imidazol.

## 7.3 Diálise

A diálise foi realizada em membranas semipermeáveis de 3 500 Da. Foram feitas 4 trocas de 10 volumes de um tampão PBS 5 mM EDTA durante 48 horas a 4°C. Se a proteína eluída (rNXH8 ou (His)ZZNXH8) não estava previamente renaturada, a solução de proteína era ajustada para uma concentração de 0,1mg/mL em uma solução de uréia 8 mol/L e  $\beta$ ME 10 mmol/L e dializada contra um tampão

contendo uréia 2 mol/L e glutatona reduzida e oxidada (2: 4 mmol/L). Após 10 horas de diálise a 4°C, metade do tampão era substituído por PBS com EDTA 5 mmol/L e assim subsequente em 4 trocas sucessivas.

## 7.4 Purificação e Renaturação de ZZNXH8 em IgG Sepharose

A purificação da proteína de fusão rZZNXH8 (expressa por pCP-NXH8) foi realizada segundo o procedimento descrito por DREVET et al., 1997. A resina IgG - Sepharose “Fast Flow Pharmacia” (5 mL para cada 100 mL de lisado bacteriano) foi equilibrada com 5 volumes de PBT (tampão fosfato 100 mmol/L pH 8,0, 0,1% Tween - 20). O extrato bacteriano foi adicionado à resina e a mistura foi incubada por 3 horas em “roller” a 4 °C para adsorção da proteína. A seguir, a coluna foi montada numa geladeira e lavada com 2 volumes de tampão acetato de amônio 5 mmol/L pH 5,0. A coluna foi então carregada com 2 volumes do tampão de renaturação (tampão fosfato 100 mM pH 8,0; EDTA 5 mM; glutatona reduzida glutatona oxidada 2: 4 mmol/L) e deixada no “roller” durante 15 horas a temperatura ambiente. A coluna foi remontada em geladeira. A coluna foi lavada com PBT até a absorbância atingir uma linha de base. Seguiu-se uma lavagem com acetato de amônio 5 mmol/L pH 5,0, até a densidade ótica atingir nova linha de base. O monitoramento do processo foi feito através da leitura de frações de 1 mL em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 260 e 280 nm. A eluição foi feita com tampão acetato de amônio pH 3,4 500 mmol/L. As amostras que apresentaram leituras de absorbância foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Cada amostra foi ressuspensa em 100 a 200 µL de Tris-HCL 100 mmol/L pH 8,8.

## 8 Análise das Proteínas Recombinantes

### 8.1 SDS-PAGE

As amostras de culturas induzidas e/ou não induzidas, e as amostras de proteínas recombinantes purificadas foram analisadas em géis unidirecionais desnaturantes de poliacrilamida 15% ou, em alguns casos, géis de gradiente de 10 a 20% de poliacrilamida com espessura de 1,00 mm segundo o protocolo descrito por LAEMMLI, 1970. As amostras foram ressuspensas em tampão de SDS-PAGE 1X, com βME e fervidas por 3 minutos, imediatamente antes da aplicação no gel. Depois da eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue R250 0,25% dissolvido em metanol50% / ácido acético10%, exceto nos géis usados para Western blot.

## 8.2 Dosagem de Proteína

Sempre que necessária a dosagem de proteína, foi feita pelo método descrito por BRADFORD 1976. Alternativamente a proteína foi quantificada por densitometria dos SDS-PAGE corados por Coomassie Blue R250 em comparação com uma curva padrão de BSA em um densitômetro *ID-Image Master Plus* Pharmacia ®.

## 9 Imunização de Camundongos

As proteínas recombinantes rNXH1 e rNXH8 foram usadas para imunizar camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de 20g, segundo os protocolos de HARLOW & LANE, 1988. Foram inoculados 10 µg de cada proteína recombinante em grupos de 10 camundongos. Em outro grupo, 5 µg de cada proteína recombinante rNXH8 e rNXH1 foram inoculados por animal. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford. As proteínas recombinantes foram diluídas em PBS na presença de 10% de hidróxido de alumínio. Injeções de 0,5 mL foram aplicadas subcutaneamente. Foi feita sangria dos animais um ou dois dias antes de cada inoculação. No total, foram realizadas 3 injeções com um intervalo de 14 dias entre elas. Os títulos dos soros foram acompanhados por ELISA.

## 10 Elisa

Os antígenos (proteínas recombinantes rNXH8 e rNXH1) foram diluídos para 1 µg/100 µl em tampão de sensibilização (tampão carbonato 0,1 mol/L, pH 9,6). Foram adicionados 100 µL de solução de antígeno em cada poço em placas de poliestireno para ELISA. Cada placa foi incubada por 2 horas a 37°C e a temperatura ambiente por uma noite. Cada placa foi então esvaziada e lavada 3 vezes com tampão de lavagem (5g Tween-20 em um litro de PBS). Para o bloqueio, foram adicionados a cada poço 200 µL de tampão de lavagem com 10% de leite em pó desnatado MOLICO. Foi feita uma incubação de 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes novamente. Os soros de camundongo foram previamente tratados de forma a retirar anticorpos antibactéria inespecíficos (veja a seguir). Foi feita uma diluição seriada do soro na placa num volume de 100 µL por poço, a partir da segunda coluna (a primeira ficou como controle). Cada placa foi incubada por 2 horas a 37°C. As placas foram esvaziadas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem.

Foram adicionados 100 µL por poço de solução de anticorpo caprino anti – IgG de camundongo biotilado diluído em tampão de lavagem com leite MOLICO 10% 1:2 000 (v/v). As placas foram incubadas por mais 1 hora a 37°C. Repetiram-se as lavagens. Foi acrescentado a cada poço 100 µL de

estreptoavidina - peroxidase diluída 1:1 000 (v/v) em tampão de lavagem. As placas foram incubadas por mais uma hora a 37°C e lavadas novamente. A revelação foi feita com o-dihidroclorato de fenilenodiamina (8 mg de OPD, 20 ml de tampão citrato/ fosfato, 100 µl de água oxigenada a 30%). Para parar a reação, foram adicionados 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mol/L. A leitura dos resultados foi feita em leitor de ELISA *Multiskan* com filtro de 492 nm.

## 11 Western Blots

### 11.1 Preparo dos Anticorpos para os Western blots

A remoção dos anticorpos antibactéria *E. coli* BL21(DE3) presentes nos soros utilizados nos Western blots e ELISA foi feito segundo o protocolo descrito por GRUBER & ZINGALES, 1995. Foi crescida uma cultura de *E. coli* da linhagem BL2 1 (DE3) por uma noite a 37°C sob agitação constante. A cultura foi separada em 2 frascos com 1 litro cada. Um deles foi autoclavado a 121°C. Foi adicionado ao outro frasco formaldeído para uma concentração final de 0,5% e a cultura foi incubada a 37°C por 2 horas sob agitação. Depois de esfriar a temperatura ambiente, as duas culturas foram novamente misturadas e centrifugadas a 5000 g por 10 minutos. O precipitado bacteriano foi lavado 2 vezes com PBS (200 mL) e novamente ressuspensionado em 200 mL de PBS. A cultura foi então dividida em 8 tubos de centrifuga e centrifugada novamente. Os tubos foram armazenados a -20°C.

No dia seguinte, os soros foram diluídos 1:50 em PBS contendo 1% BSA. Cada tubo contendo a massa bacteriana foi previamente descongelado em gelo. O conteúdo foi ressuspensionado em 15 mL de soro diluído. Os tubos foram incubados por 2 horas a 4°C, sob agitação suave. Os tubos foram então centrifugados e o precipitado foi desprezado. Repetiu-se o ciclo de absorção seqüencialmente, mais oito vezes. Ao final, o soro foi filtrado em membrana Millipore 0,22 µm e armazenado a -20°C.

### 11.2 Western Blot de Proteínas Recombinantes

Os Western blots usaram o soro equino anti - elapídico do Instituto Butantan ou soros de camundongos produzidos contra as proteínas recombinantes rNXH8 e rNXH1. Essas proteínas foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) transformadas com vetores de expressão baseadas no sistema pRSET e purificadas por cromatografia em Ni<sup>2+</sup>- Sepharose. De maneira geral, os protocolos de western blot seguiram o protocolo descrito por AUSUBEL et al., 1989. Os SDS-PAGEs contendo os extratos bacterianos e proteínas purificadas foram transferidos em sistema semi - seco (Pharmacia®) para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de transferência utilizado foi Tris-HCl 0,94 mol/L pH 8,8;

glicina 0,33 mol/L; SDS 1,5% contendo 10% de metanol. A transferência foi feita com uma corrente de 0,65 mA/cm<sup>2</sup> por 45 minutos. A membrana foi corada com Ponceau S 5%, ácido acético 1% por 5 minutos, lavada com água destilada e as posições das canaletas e do padrão de massa molecular foram marcadas a lápis. O bloqueio foi feito com PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 5% leite em pó desnatado MOLICO por uma noite.

Como primeiro anticorpo, usaram-se soros equinos anti - elapídico, ou os soros murinos anti – rNXH8 e anti – rNXH1, ou o soro preparado em camundongos imunizados com ambos os antígenos recombinantes: anti – rNXH8/rNXH1, também chamado anti – Mix. Os anticorpos primários foram incubados com as membranas de nitrocelulose por 2 horas numa diluição de 1:1 000 em PBS 1X, 0,05% Tween-20. Foram feitas 3 lavagens com PBS 1X, 0,05% Tween-20 de 10 minutos cada. O segundo anticorpo utilizado foi anticorpo de caprino anti – IgG equina ou murina biotinilada (Sigma) diluído 1:2 000 em PBS/Tween-20. A membrana foi incubada por uma hora com esse anticorpo. Repetiram-se as lavagens com PBS/Tween-20. Por fim, a membrana foi incubada por uma hora com Estreptoavidina - peroxidase diluída 1:1000 em PBS/Tween-20. A membrana foi lavada novamente e a revelação foi feita com DAB (9 mL de PBS/Tween-20, 1 mL de cloreto de cobalto, 5 mg de DAB, 10 µL de água oxigenada). A reação foi interrompida descartando-se a solução de revelação e lavando-se com água destilada várias vezes e seca em papel de filtro. Todo o procedimento foi feito à temperatura ambiente.

Alternativamente, foi também utilizado estreptoavidina – PALP diluída 1:2 000 no mesmo tampão, durante uma hora. Para a revelação se utilizou BCIP (16mg/mL) mais NBT (0,33mg/mL) em tampão Tris L pH9,5 0,1 mol/L; NaCl 0,1 mol/L; MgCl<sub>2</sub> 50 mmol/L. A revelação foi realizada no escuro por 10 minutos e interrompida com EDTA pH8,0 0,5 mol/L. A membrana foi lavada com água várias vezes e seca em papel de filtro. Todo o procedimento foi feito a temperatura ambiente.

### 11.3 Venenos e Anticorpos

Todos os venenos foram obtidos do Instituto Butantan (São Paulo), com exceção dos venenos de *Micrurus frontalis*, *Micrurus surinamensis*, *Micrurus carinicauda dumerilli*, *Dendroaspis angusticeps*, *Notechis scutatus scutatus* e *Bungarus multicinctus*, que foram adquiridos comercialmente (Sigma). Os anti – imunoconjugados e a cardiotoxina de *Naja naja kaouthia* usados também foram obtidos comercialmente (Sigma). Os anticorpos contra os venenos de *Micrurus corallinus*, *Micrurus frontalis* e *Micrurus spixii* foram precipitados por ácido caprílico (DOS SANTOS et al., 1989) seguida de filtração tangencial (*cut off* 30 kDa) e purificados por cromatografia de troca iônica (CORTHER et al., 1984),

gentilmente cedidos por Marco Antônio Stephano (Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan). O soro equino anti – elapídico do Instituto Butantan foi preparado conforme RAW et al. 1991. Todos os soros tiveram os anticorpos anti – *E. coli* removidos segundo o método de GRUBER & ZINGALES, 1995.

### 11.4 Western blots dos Painéis de Venenos

Foram preparados géis de SDS-PAGE com um gradiente de 10 a 20% de poliacrilamida, onde foram aplicados 20 µg de cada veneno por canaleta. Cada gel foi então transferido em sistema semi - seco (Pharmacia®) para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de transferência utilizado foi tris-glicina contendo 10% metanol. A transferência foi feita a 0,65 mA/cm<sup>2</sup> por 45 minutos. A membrana foi corada com Ponceau S 5%, ácido acético 1% por 5 minutos, lavada com água destilada e as posições das canaletas e do padrão de massa molecular foram marcadas a lápis. O bloqueio foi feito com PBS contendo 0,05% Tween-20 e 5% leite em pó desnatado MOLICO por uma noite.

Na manhã seguinte, foi adicionado o anticorpo primário numa diluição específica para cada soro utilizado. O soro anti – *Micrurus frontalis* foi utilizado na diluição 1: 5 000 (v/v), o soro anti – *M. spixii* foi utilizado em uma diluição 1:1 000 (v/v). O soro anti – *M. corallinus*, anti – rNXH8 e anti – rNXH1 foram utilizados na diluição 1:500 (v/v). A membrana foi incubada com 0,1 mL/cm de soro diluído em PBS contendo 0,05% de Tween-20 por 2 horas. A membrana foi então lavada 3 vezes com o tampão com leite (o mesmo utilizado no bloqueio) por 10-15 minutos/lavagem e 1 vez com PBS/Tween-20 sem leite rapidamente. A membrana foi incubada então por 1 hora com o segundo anticorpo: soro caprino anti – IgG equina ou anti – IgG murina conjugado com peroxidase. Repetiram-se as lavagens descritas anteriormente. A revelação foi feita com diaminobenzidina (20 mg de DAB, 36 ml de tampão PBS/Tween-20, 4 mL cloreto de cobalto 0,3% e 40 µL de água oxigenada). Para interromper a revelação, foi descartada a solução e adicionada água destilada. A membrana foi lavada com água várias vezes e seca em papel de filtro. Todo o procedimento foi feito à temperatura ambiente.

## 12 Ensaios de Ligação em Receptores Nicotínicos de Músculo de Ratos Neonatos

Os experimentos de ligação ao receptor nicotínico foram feitos em colaboração com a Dr.<sup>a</sup> Letícia Veras Costa Lotufo no Laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dra. Regina Pekelmann Markus do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP.

## 12.1 Preparo das Vesículas

A partir de uma cultura primária de células de músculo esquelético de ratos neonatos, as células foram raspadas, centrifugadas a 12 000 rpm e lavadas com Tris 20 mmol/L pH7,4 contendo 10 mmol/L EDTA para retirar o meio de cultura. As células foram então homogeneizadas em “potter”, centrifugadas, lavadas mais uma vez para retirar os componentes citosólicos solúveis e ressuspensas no tampão de ligação (Tris-HCl 20 mmol/L pH7,4 contendo EDTA 0,1 mmol/L). As vesículas foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. A dosagem de proteínas das vesículas foi feita pelo método de Bradford.

## 12.2 Ensaios de Ligação

Os ensaios de ligação ao receptor de acetilcolina foram realizados para um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Dependendo de cada ensaio, o volume foi ajustado variando-se a quantidade de tampão de ligação (Tabela 4). Cada tubo em triplicata, continha 10  $\mu\text{L}$  de solução 10X BSA (Albumina Bovina 2mg/mL) e 20  $\mu\text{L}$  de membranas de culturas primárias de células musculares esqueléticas de ratos neonatos (25  $\mu\text{g}$  de proteínas totais). Um volume de um determinado ligante (0,05; 0,5 e 5 $\mu\text{g}$  de veneno ou soro mais veneno); um volume ajustado de tampão de ligação (*q.s.p* 90  $\mu\text{L}$ ) e após 1 hora de incubação sob agitação branda à temperatura ambiente, acrescentaram-se 10  $\mu\text{L}$  de  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina ( $10^{-8}$  mol/L). Seguiu-se incubando por mais uma hora a temperatura ambiente, sob agitação branda. A concentração final de  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina no ensaio foi de  $10^{-9}$  mol/L. Os tubos foram então centrifugados a 18 krpm em microcentrífuga por 10 minutos e os sobrenadantes foram desprezados. As membranas foram ressuspensas em tampão de ligação e lavadas novamente por três vezes. O precipitado final foi ressuspendido em água e adicionado a líquido de cintilação e a radioatividade foi estimada através do uso de um contador de cintilação.

O veneno de *M. corallinus* foi diluído para concentrações de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ . Foram preparados tubos em triplicata contendo as membranas e o tampão 10X BSA e 55  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação. Acrescentaram-se 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição do veneno. Os tubos foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação branda. Cada tubo tinha concentrações de veneno de 0,05; 0,5 e 5 $\mu\text{g}$  de veneno por 100  $\mu\text{L}$  de ensaio de ligação. Após 1 hora de incubação sob agitação branda a temperatura ambiente, acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina ( $10^{-8}$  mol/L). Seguiu-se incubando por mais uma hora a temperatura ambiente, sob agitação branda. O ensaio seguiu segundo o procedimento já descrito.

O veneno de *M. corallinus* foi neutralizado com soros de camundongo imunizados com as proteínas recombinante rNXH1 (anti – rNXH1), rNXH8 (anti – rNXH8) e rNXH8/rNXH1 (anti – Mix). 3,0 µL de veneno (*Stock* a 10 µg/µL) foram diluídos em 57 µL de soro. Após homogeneização, 6 µl da mistura foram diluídos em mais 54 µL de soro e a seguir 6 µL dessa mistura foram diluídos em mais 54 µL de soro. Formando 3 diluições seriadas, respectivamente contendo: 0,5µg/µL; 0,05µg/µL e 0,005µg/µL de veneno neutralizado com cada soro contra as proteínas recombinantes. As misturas soros/venenos foram incubadas por 15 minutos. Então 10 µL de cada neutralização foram acrescentadas a triplicatas de tubos contendo 10 µL de tampão 10X BSA; 20 µL de 20 µL de membranas musculares (25 µg de proteína total); 50 µL de 1X tampão de ligação. Cada triplicata continha respectivamente 5µg; 0,5µg e 0,05µg de veneno neutralizado com soro em ensaios de 100 µL. Os tubos foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação branda.

Por fim, foram adicionados a todos os ensaios, 10 µL de <sup>125</sup>I-α- bungarotoxina 10<sup>-8</sup> mol/L. Foi feita nova incubação de uma hora a temperatura ambiente e sob lenta agitação. A seguir, as membranas foram centrifugadas e lavadas, como descrito anteriormente. A radiatividade foi lida em um contador de cintilações.

Como controles positivos da ligação da <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina foram utilizados triplicatas de tubos contendo 10 µL de 10X BSA (Albumina Bovina 2mg/mL), mais 20 µL de membranas de células musculares esqueléticas da cultura primária (25 µg de proteína total), mais 60 µL de tampão de ligação e 10 µL de <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina (10<sup>-8</sup> mol/L) incubada por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação branda, perfazendo um volume total de 100 µL de ensaio com 10<sup>-9</sup> mol/L de <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina.

Como controle negativo foram utilizados tubos em triplicata contendo 10 µL de tampão 10X BSA, 20 µL de vesículas musculares, 50 µL de tampão de ligação, 10 µL de nicotina (10<sup>-1</sup> mol/L) incubada por uma hora, sob agitação branda. Ao final, acrescentou-se 10 µL de <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina (10<sup>-8</sup> mol/L) incubada por mais uma hora a temperatura ambiente, sob agitação branda. Perfazendo um volume total de 100 µL de ensaio com 10<sup>-2</sup> mol/L de nicotina.

Em outro controle, foram utilizados tubos em triplicata contendo 10 µL de tampão 10X BSA, 20 µL de membranas musculares (25 µg de proteína total), 50 µL de tampão de ligação, 10 µL de soro anti –

rNXH8/rNXH1 (anti – Mix) em uma incubação de 1 hora, sob agitação branda, após a qual, acrescentaram-se 10 µL de  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina ( $10^{-8}$  mol/L) e incubou-se por mais uma hora à temperatura ambiente.

Após a incubação final com  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina, os tubos foram então centrifugados e tratados da maneira anteriormente descrita para os demais ensaios. A radioatividade foi estimada através do uso do mesmo contador de cintilação. O experimento pode ser observado esquematicamente na Tabela 4.



## RESULTADOS

### O Clone *nxb8* Codifica um Precursor de uma Toxina em Três Dígitos

A seqüência do clone *nxb8* foi caracterizada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Micrurus corallinus* (HO et al., 1995) (FIGURA 05). O cDNA de *nxb8* é constituído de uma região 5' não traduzida curta (01 a 05 pb), seguido por uma seqüência codificante para um precursor de 86 aminoácidos (06 a 263 pb). Essa região contém uma seqüência codificante para um peptídeo sinal de 21 aminoácidos (06 a 68 pb) e para um peptídeo maduro de 65 resíduos aminoácidos (69 a 263 pb). A massa molecular teórica desse peptídeo é de 7 839 Da e o pI 8,39. Segue-se um códon de terminação (264 a 266 pb) e uma longa região 3' não traduzida (264 a 471). Um sinal de poliadenilação pode ser identificado antes da cauda poli A<sup>+</sup>. Esta organização do cDNA é similar à descrita para o precursor da erabutoxina a de *Laticauda semifasciata* (NXS1 LATSE - TAMIYA et al., 1985) e para outros precursores de proteínas da família de toxinas em três dígitos (DANSE et al., 1990; ROWAN et al., 1990; QIAN et al., 1998a e 1998b; AFIFIYAN et al., 1998 e 1999; TAMYIA et al., 1999; GONG et al., 1999 e 2000).

O clone codifica para um precursor denominado NXH8 MICCO ("*Micrurus corallinus* - Neurotoxin homologue 8" AJ344067). A seqüência de aminoácidos do precursor foi submetida a uma comparação com bancos de dados de seqüências de proteínas (por exemplo: SWISSPROT) usando o programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* ([http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/blast20\\_parser.pl](http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/blast20_parser.pl); ALTSCHUL et al., 1997) e apresentou grande similaridade com as toxinas de serpentes elapídicas pertencentes à família das toxinas em três dígitos. As dez seqüências com escore de semelhança mais alto são mostradas na TABELA 01. As seqüências mostradas nessa tabela são classificadas como homólogos de neurotoxinas longas de serpentes do gênero *Bungarus*, neurotoxinas fracas de serpentes do gênero *Naja* e  $\alpha$  - neurotoxinas curtas de serpentes do gênero *Naja* e Hidrofinídeos .

A seqüência do precursor foi analisada no SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (FIGURA 06). O ponto de clivagem foi predito, mostrando que existe um peptídeo sinal de 21 aminoácidos de caráter hidrofóbico, seguido pelo peptídeo maduro de 65 aminoácidos. O peptídeo sinal de NXH8, também pode ser determinado por simples comparação com precursores e formas maduras de toxinas similares. No destaque da FIGURA 06, são mostrados alguns desses peptídeos sinais alinhados com o de NXH8: NXHL BUNMU (Homólogo de Neurotoxina Longa de *Bungarus multicinctus*); NXS1 LATSE (Precursor da Neurotoxina Curta 1, erabutoxina a de *Laticauda semifasciata*); TXW1 NAJAT (Precursor da Neurotoxina Fraca 1 de *Naja atra*); NXL1 BUNMU (Precursor da Neurotoxina Longa 1,  $\kappa$ -

bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*) e TSYL DENAN (Precursor da Toxina Sinérgica de *Dendroaspis angusticeps*).

Podemos observar na FIGURA 06, que o peptídeo sinal de NXH8 obedece as características de um peptídeo sinal de eucariotos (VON HEIJNE, 1983). Uma região *n* de dois a cinco resíduos (dois neste caso) após a metionina sendo um deles carregados positivamente. Se o alfa aminoácido for incluído a carga líquida é +2. Uma região *h* composta de sete a quinze resíduos (treze neste caso) de caráter bastante hidrofóbico, composto principalmente por leucina e valina. E uma região *c* de cinco aminoácidos que definem o fim do peptídeo sinal. O sítio de clivagem pela peptidase sinal é definido pelos resíduos da posição -1 e -3. Na posição -1 são comuns os resíduos Gly, Ala, Ser, Cys ou Thr. O peptídeo sinal de NXH8 apresenta treonina na posição -1. A posição -3 não pode ter resíduos aromáticos (Phe, His, Tyr, Trp), nem carregados (Asp, Glu, Lys, Arg) e também não podem ocorrer resíduos polares grandes (Asn, Gln). A posição -3 do peptídeo sinal de NXH8 apresenta uma glicina.

Os peptídeos sinais desta família de toxinas dirigem a secreção da toxina madura para o lúmen da glândula de veneno e são extremamente conservados. Por essa razão, foi feita a mesma comparação com o banco de dados, utilizando apenas a seqüência do peptídeo maduro NXH8 MICCO. O resultado foi um pouco diferente e as dez seqüências mais similares são mostradas na TABELA 02. Neste caso, as seqüências mais freqüentes foram apenas os homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas dos venenos de *Bungarus* e as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas de diversos elapídeos africanos, australianos e asiáticos.

## **NXH8 tem Dez Cisteínas que podem Formar Cinco Pontes Dissulfeto**

### **Alinhamento de NXH8 com a Família de Toxinas em Três Dígitos**

Outras seqüências similares a *nxb8*, denominadas *nxb1*, *nxb3* e *nxb7* foram identificadas na mesma biblioteca da glândula de veneno de *M. corallinus*. Estas seqüências, também têm similaridade com a família de toxinas de serpentes com estrutura em três dígitos. As seqüências de aminoácidos de NXH1, NXH3 e NXH7 diferem entre si, apenas por 2 aminoácidos e provavelmente são isoformas da mesma toxina (HO et al., 1995; SILVEIRA DE OLIVEIRA, 2000; SILVEIRA DE OLIVEIRA et al., 2000). Com relação a essas seqüências de *M. corallinus* (NXH1, NXH3 e NXH7), NXH8 compartilha apenas 42% de similaridade. NXH8 tem 65 aminoácidos enquanto que NXH1 tem apenas 57 resíduos. Na FIGURA 07, NXH1 está indicado em azul e NXH8 em vermelho.

Para identificar a qual subclasse da família de toxinas NXH8 seria relacionada, diversas seqüências escolhidas no SWISS-PROT/TREMBL após uma busca utilizando o programa PSI-BLAST (*Position specific iterative BLAST* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), foram cuidadosamente alinhadas com NXH8 e NXH1 (ver FIGURA 07), utilizando-se o programa MACAW - *Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench* (SCHULER et al., 1993). Foram escolhidos alguns representantes de cada tipo de toxinas elapídicas em três dígitos. Assim NXH8 foi alinhado com cardiotoxinas, bloqueadores de canais de cálcio tipo L, inibidores da agregação plaquetária, fasciculinas ou anticolinesterases, toxinas sinérgicas, toxinas muscarínicas, toxinas neuronais ou  $\kappa$  - neurotoxinas,  $\alpha$  - neurotoxinas longas e  $\alpha$  - neurotoxinas curtas. Além dessas, NXH8 foi alinhada com diversos tipos de toxinas de padrão similar quanto às cinco pontes dissulfeto, denominadas neurotoxinas fracas, homólogos de neurotoxinas longas 1 e 2; e toxinas tipo Bucandina, uma nova subclasse com ação pré – sináptica (KUHN et al., 2000).

A similaridade com NXH8 foi calculada usando grupos de propriedades físico – químicas dos aminoácidos. O alinhamento perfaz 79 posições, levando em conta os intervalos para inserções e deleções. Todos os resíduos das toxinas alinhadas serão referidos, daqui para diante, com base nessas posições absolutas do alinhamento da FIGURA 07.

Chama a atenção que dos 65 aminoácidos de NXH8, dez são cisteínas, correspondendo a 15,4% da composição. Por similaridade, estas cisteínas provavelmente formam cinco pontes dissulfeto. NXH8 é facilmente alinhado com as demais toxinas tomando como base oito dessas cisteínas, comuns às cisteínas das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e cardiotoxinas (KARLSON, 1979), formando as quatro pontes dissulfeto entre as posições (03-26), (19-47), (51-63) e (64-70). NXH1, assim como todas as toxinas com estrutura em forma de três dígitos possui essas quatro pontes dissulfeto, de onde emergem as alças formadas por cinco folhas  $\beta$  - pregueadas antiparalelas representadas na FIGURA 03D. Na FIGURA 07 o padrão estrutural das pontes dissulfeto é indicado para todos os subtipos e pode ser comparado com os modelos tridimensionais das toxinas em três dígitos na FIGURA 04A e 04B.

Entretanto, NXH8 tem mais duas cisteínas que formam possivelmente uma ponte dissulfeto entre as posições 06 e 11. Um modelo de NXH8 também é mostrado na FIGURA 04B. Outras toxinas apresentam cisteínas na mesma posição. NXH8 compartilha uma similaridade elevada com seqüências de homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas de serpentes do gênero *Bungarus*, tais como: CADO BUNCA ( “Candoxin” de *Bungarus candidus*) e NTL1 BUNMU ( “Neurotoxin like protein” de *Bungarus multicinctus*), com as quais compartilha 70% de similaridade e NXLH BUNMU ( “Long Neurotoxin homologue” de *B. multicinctus* ), com a qual compartilha 68% de similaridade. A função destas toxinas no veneno de *Bungarus* permanece desconhecida até o momento. Mas existem indicações de que a Candoxina é capaz

de bloquear a transmissão colinérgica no músculo esquelético de galinhas e de intensificar de maneira significativa a atividade da acetilcolinesterase no veneno, podendo atuar como uma toxina sinérgica (NIRTHANAN et al 2001; PARVATHY et al 2001).

As toxinas da FIGURA 07 organizam-se de forma consistente em relação ao tamanho da cadeia, grau de similaridade com NXH8 e organização das pontes dissulfeto. É possível identificar que NXH8 tem o mais alto grau de similaridade com o grupo de homólogos de *Bungarus* e com algumas  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas. NXH8 tem similaridade acima de 60% com: NXL1 ASPSC (Neurotoxina longa 1 - S4C6 de *Aspidelaps scutatus*, 63%), NXSB NAJAT (Neurotoxina curta B, “*Cobrotoxin B*” de *Naja atra*, 64%), NXS1 NAJOX (Neurotoxina curta 1, “*oxiana toxin alpha*” de *Naja oxiana*, 64%), TXW NAJNA (Neurotoxina fraca 5 de *Naja naja*, de 60%). Esta última é uma neurotoxina fraca atípica porque tem 62 aminoácidos enquanto a maioria das fracas tem 65 aminoácidos.

Existe uma única seqüência completa com função conhecida em um veneno de outra serpente coral que por isso foi incluída no alinhamento. É a NXS1 MICNI (Neurotoxina curta 1 “*toxin  $\alpha$* ” de *Micrurus nigrocinctus*) com quem NXH8 compartilha 58% de similaridade. Algumas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas foram incluídas no alinhamento por serem bem conhecidas e utilizadas em inúmeros experimentos de neurofarmacologia. É o caso da erabutoxina a (NXS1 LATSE) e das neurotoxinas longas  $\alpha$  - cobratoxina (NXL1 NAJKA) e  $\alpha$  - bungarotoxina (NXLA BUNMU). Com as  $\alpha$  - neurotoxinas, NXH8 tem similaridade alta, variando entre 57% e 64%. Esta similaridade é principalmente devida às regiões da segunda e terceira alça entre as posições 19 e 71. Com as demais seqüências, a similaridade é mais baixa e está entre 30 a 50%.

Ainda na FIGURA 07, é importante notar que, as toxinas sinérgicas formam dímeros interligados por uma ponte dissulfeto intercadeia, através da cisteína da posição 60. Nota-se que nas seqüências TS81 DENAN e TS24 DENJA estão faltando os três últimos resíduos C-terminais devido provavelmente a erros nas seqüências publicadas.

## **Dendrograma da Família de Toxinas em Três Dígitos Reflete a Atividade das Toxinas**

Para melhor representar as relações de similaridade entre as seqüências do alinhamento da FIGURA 07, foi construída uma filogenia usando-se o “*Phylogeny Inference Package*” (PHYLIP 3.57c – FELSENSTEIN, 1989 e 1995). Como grupo externo foi usada a seqüência do peptídeo maduro de Lynx-1 (LYNX

MOUSE), um neuromodulador de mamífero relacionado à família de toxinas em três dígitos (MIWA et al., 1999). O modelo tridimensional de Lynx-1 pode ser visto na FIGURA 04B. A razão de se usar esta seqüência no alinhamento é eliminar o “ruído” de convergência representado pelas cisteínas e ressaltar as possíveis relações funcionais entre as demais toxinas. Além disso, Lynx-1 evidencia que as seqüências de serpente alinhadas apesar da alta diversidade funcional formam um grupo relacionado.

O dendrograma é mostrado na FIGURA 08. Pode-se observar que as toxinas foram agrupadas em grupos funcionais de acordo com a similaridade do alinhamento e não pela espécie de serpente à qual pertence a toxina. O alinhamento reflete as características funcionais dessas toxinas. As  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas e as toxinas neuronais formam uma clade com as toxinas homólogas 1 e 2 de *Bungarus* e NXH8. O grupo que NXH8 forma conjuntamente com os homólogos 1 e 2 relaciona-se com as  $\alpha$  - neurotoxinas com maior grau de afinidade do que as neurotoxinas fracas. Já NXH1 é agrupada entre os bloqueadores de canais de cálcio e as fasciculinas, ainda que o braço longo indique uma alta divergência da seqüência. Além disso, as toxinas sinérgicas foram corretamente agrupadas segundo sua função a despeito do erro C - terminal. Já o grupo da bucardina é bastante divergente das demais toxinas de serpente e pouco relacionada a NXH8 ainda que exiba o mesmo arranjo estrutural de cinco pontes dissulfeto.

## **As Toxinas com Cinco Pontes Dissulfeto não são um Grupo Homogêneo**

As  $\alpha$  - neurotoxinas longas e as toxinas neuronais ( $\kappa$  - neurotoxinas) têm cinco pontes, mas a ponte extra está localizada na extremidade da segunda alça e é formada pelas cisteínas 32 e 36 como indicado nas FIGURAS 07 (Veja também os modelos da FIGURA 04A). NXH8 possui uma possível ponte dissulfeto extra formada pelas cisteínas da posição 06 e 11 localizadas na região N-terminal da proteína, mais especificamente na ponta da primeira alça. Portanto, tem todas as suas cisteínas nas mesmas posições que são encontradas nas neurotoxinas fracas e nos diversos homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas, inclusive na toxina pré - sináptica Bucandina (BUCA BUNCA, KUHN et al., 2000) e a Cadoxina, que também teve sua estrutura determinada por ressonância nuclear magnética (CADO BUNCA, PARVATHY et al 2001). (Veja o alinhamento dessas toxinas e a posição das pontes dissulfeto na FIGURA 09).

Outras proteínas não elapídicas apresentam o mesmo arranjo estrutural de cinco pontes dissulfeto como as xenoninas presentes na pele de sapos (KOLBE et al., 1993; MACLEOD et al., 1998), as proteínas de mamífero com uma âncora GPI, como o já citado neuropeptídeo Lynx-1 (MIWA et al., 1999), os receptores da superfície de leucócitos CD59 e Ly-6 (KIEFFER et al., 1994), o monômero do receptor para o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase - uPAR (PLOUG & ELLIS, 1994) e a proteína

expressa em moto-neurônios colinérgicos, ODR-2 de *C. elegans* (CHOU et al., 2001). Modelos tridimensionais que mostram as pontes dissulfeto dessas moléculas estão representados na FIGURA 04B e podem ser comparados com NXH8.

Esse arranjo de cinco pontes dissulfeto, com a quinta ponte extra localizada na primeira alça, foi primeiro descrito para um grupo de toxinas encontradas em serpentes do gênero *Naja*, denominadas de Toxinas do Tipo Melanoleuca ou Neurotoxinas Fracas (TXW/WTX – *Weak neurotoxins*). As toxinas foram denominadas fracas devido à baixa toxicidade para roedores quando comparadas com a toxicidade comumente apresentada pelas  $\alpha$  - neurotoxinas. Na legenda da FIGURAS 09/10 são apresentadas algumas  $DL_{50}$  para essas toxinas. O mesmo padrão de pontes dissulfeto foi encontrado também em serpentes do gênero *Bungarus* e denominadas de homólogos de neurotoxinas longas (CARLSSON, 1975; JOUBERT, 1975; JOUBERT & TALJAARD, 1978; JOUBERT & TALJAARD, 1980; DANSE et al., 1990; SHAFQAT et al., 1991; CHANG & LIN 1997; HUNG et al., 1998; LIN et al., 1998; QIAN et al., 1998b; AIRD et al., 1999; CHANG et al., 2000a; GONG et al. 2000; , KUHN et al., 2000; PARVATHY et al 2001; UTKIN et al., 2001a e b). Chama a atenção que a  $\gamma$  - bungarotoxina (NXGB BUNMU) tem a  $DL_{50} = 0,15$  mg/kg similar às  $\alpha$  - neurotoxinas (AIRD et al., 1999).

As pontes dissulfeto destas toxinas foram determinadas para TXW4 NAJME (CARLSSON, 1975), TXW1 NAJHH (JOUBERT & TALJAARD, 1978), TXWW NAJKA (UTKIN et al., 2001a), CADO BUNCA (PARVATHY et al 2001) e BUCA BUNCA, (KUHN et al., 2000). Todas possuem o mesmo arranjo de cinco pontes dissulfeto. Por similaridade é razoável supor que NXH8 e as demais toxinas correlatas formem a mesma ponte (FIGURA 09).

### **Alinhamento das Toxinas com Ponte Dissulfeto na Primeira Alça**

Na FIGURA 09, as seqüências conhecidas com esse padrão de pontes dissulfeto foram alinhadas com NXH8, utilizando o programa MACAW. A similaridade foi calculada da mesma maneira, que no alinhamento anterior. O posicionamento dos resíduos corresponde às posições da FIGURA 07, razão pela qual o intervalo da posição 67 foi mantido. O número de aminoácidos em cada toxina está indicado e varia de 62 a 68.

### **Dendrograma das Toxinas com Ponte Dissulfeto na Primeira Alça**

Para representar as inter-relações das toxinas alinhadas na FIGURA 09 foi montada uma filogenia mostrada na FIGURA 10. Para avaliar a relação dessas seqüências com as  $\alpha$  - neurotoxinas longas,

utilizaram-se para calcular as matrizes de distância, duas  $\alpha$  - neurotoxinas longas:  $\alpha$  - cobratoxina (neurotoxina longa 1 de *Naja kaouthia* - NXL1 NAKA) e  $\alpha$  - bungarotoxina (alfa neurotoxina longa de *Bungarus multicinctus* NXLA BUNMU). Foi também adicionado ao alinhamento uma  $\alpha$  - neurotoxina curta: erabutoxina a (neurotoxina curta 1 de *Laticauda semifasciata* NXS1 LATSE).

O dendrograma da FIGURA 10 mostra que podem ser distinguidos quatro grupos de toxinas com a quinta ponte na primeira alça. Os homólogos de neurotoxinas longas presentes no veneno *Bungarus* e que denominamos grupo *Bungarus* tipo 1 são os mais próximos de NXH8, cuja similaridade está perto de 70%. Outros homólogos de neurotoxinas longas constituem o grupo *Bungarus* tipo 2, cuja similaridade está ao redor de 50%. Este grupo de *Bungarus* tipo 2 inclui a  $\gamma$  - bungarotoxina (NXGB BUNMU) e outras seqüências correlatas das serpentes do gênero *Bungarus*. Já as Neurotoxinas fracas, cuja similaridade com NXH8 varia de 60% a 42%, pertencem às serpentes do gênero *Naja* e formam um grupo distinto. E por fim, a Bucandina (*B. candidus*) e TX64 DENJA (*Dendroaspis jamesoni*) formam um grupo em separado que apesar de terem o mesmo padrão de pontes dissulfeto apresentam alta divergência com as demais toxinas alinhadas.

As toxinas com a quinta ponte dissulfeto na alça N-terminal estão mais estreitamente relacionadas às  $\alpha$  - neurotoxinas longas que com as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas. Entretanto, subdividem-se em 3 grandes grupos, sendo que os homólogos encontrados em *Bungarus* e NXH8 formam um grupo aliado às  $\alpha$  - neurotoxinas longas. As neurotoxinas fracas formam outra clade mais divergente. Já Bucandina e TX64 formam outro grupo distinto. Neste dendrograma, NXH8 tem um braço longo que a aproxima mais do ancestral das  $\alpha$  - neurotoxinas longas.

Dentro das neurotoxinas fracas é possível distinguir pelo menos dois subtipos relativos à posição 31 do alinhamento. Note-se ainda que seqüências de uma mesma espécie podem ser mais similares às seqüências encontradas em venenos de outras espécies, refletindo a organização estrutural com possíveis implicações funcionais.

### **Vetores para a Expressão de NXH8 em *E. coli***

Foram construídos cinco tipos de plasmídios recombinantes para a expressão de NXH8 em *E. coli*. As construções estão resumidas na TABELA 03. O cDNA de *nxb8* estava clonado em pGEM3Zf(+) (Promega ®) no sítio de Hinc II em orientação reversa em relação ao promotor de T7, formando o plasmídio denominado pGEM3Zf-nxb8, representado na FIGURA 11. Foi este cDNA que serviu de

molde para as construções subsequentes. Cada construção e os resultados da expressão e purificação da proteína recombinante resultante serão tratados a seguir.

## Somente o Peptídeo Maduro de *nxh8* é Expresso

### Os vetores pRSETB-SS*nxh8* e pRSETC-*nxh8M*

O cDNA *nxh8* foi utilizado em duas construções no vetor pRSET (Invitrogen®). O sistema pRSET é um sistema de alta expressão, sob o controle do promotor do fago T7. Seu sítio de ligação aos ribossomos (SLR) é altamente eficiente e possui um sítio de terminação igualmente forte. O lisôgeno de *E. coli* BL21(DE3) expressa a RNA polimerase do fago T7 sob o controle do promotor LacUV5 indutível por IPTG e é o hospedeiro de escolha para expressar o vetor pRSET (STUDIER & MOFAT, 1986). O vetor expressa proteínas recombinantes em fusão com um epítipo da proteína do capsídeo viral (gene 10) ligada a uma cauda de seis histidinas N-terminais. Essa cauda permite a purificação por cromatografia de afinidade em Ni<sup>2+</sup>-Sephrose.

A seqüência inteira de *nxh8* foi retirada do vetor pGEM3Zf-*nxh8* por digestão com as enzimas de restrição EcoR I e Pst I e inserida em fase nos sítios de EcoR I e Pst I do vetor pRSET-B, originando o vetor de expressão pRSETB-SS*nxh8* (FIGURA 12). Os clones recombinantes foram selecionados por tamanho e análise de restrição. Este vetor foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) para a expressão do precursor de NXH8 após indução com IPTG. A massa molecular teórica da proteína de fusão expressa por pRSETB-SS*nxh8* seria de 13 661 Da, correspondendo à fusão com as caudas de histidina mais o precursor de NXH8. A proteína recombinante poderia ser liberada da cauda N-terminal por clivagem em um sítio específico para a enteroquinase.

Paralelamente, usando o vetor pGEM3Zf-*nxh8* como molde, a seqüência do peptídeo maduro NXH8 foi amplificada por PCR. Utilizaram-se como primer 3' o M13/pUC universal, que hibridiza em uma região do promotor T7/β-gal do vetor pGEM3Zf(+) e um oligonucleotídeo 5' que insere um sítio de BamH I 5' terminal e hibridiza na região 72 a 92 de *nxh8*, desta forma apenas a região do peptídeo maduro é amplificada e o peptídeo sinal é excluído.

O produto da reação foi purificado e digerido com BamH I e clonado no vetor pRSET C desfosforilado no mesmo sítio. O inserto poderia estar orientado em relação ao promotor de forma direta ou reversa (FIGURA 13). O vetor pRSETC-*nxh8M* com o inserto na orientação correta foi selecionado após análise de restrição com a enzima Xba I. A proteína de fusão expressa por pRSETC-*nxh8M* teria uma massa

molecular teórica de cerca de 11 339 Da. Essa proteína de fusão poderia ser clivada pela enteroquinase, liberando uma toxina recombinante que iria possuir quatro aminoácidos N - terminais extras, além da seqüência de NXH8 (DRWI-NXH8).

Bactérias *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com os vetores pRSETB-SSnxh8 e pRSETC-nxh8M. Verifica-se na FIGURA 14 que apenas as culturas transformadas com pRSETC-nxh8M expressam uma proteína de fusão após indução com IPTG. Pode se ver facilmente a banda expressa por pRSETC-nxh8M no tamanho estimado (~11 kDa), mas nenhuma banda da proteína induzida por pRSETB-SSnxh8 ao redor de 13,6 kDa. O peptídeo sinal de NXH8 provavelmente inibe a expressão da proteína recombinante.

### **pRSETC-nxh8M Expressa uma Proteína Recombinante em Corpúsculos de Inclusão**

A proteína expressa por pRSETC-nxh8M em culturas de *E. coli* BL21(DE3) após indução por IPTG, permanece no precipitado após centrifugação do lisado celular (FIGURA 15). Esse precipitado pôde ser solubilizado em tampões contendo 8 mol/L de uréia ou 6 mol/L de cloridrato de guanidina e posteriormente purificado por afinidade metálica em coluna cromatográfica com resina de Sepharose quelante carregada de níquel. O material purificado pode ser eluído da coluna por acidificação ou competição com imidazol. Devido à expressão intracitoplasmática em *E. coli*, as pontes dissulfeto de NXH8 não se formam. Esta é provavelmente a razão da proteína de fusão ser expressa na forma de corpúsculos de inclusão, ainda que os altos níveis de expressão também possam induzir a formação de agregados. Usando este protocolo de purificação na presença de uréia 8 mol/L, é possível obter a NXH8 recombinante bastante purificada e solúvel, no entanto, na forma desnaturada. (FIGURA 15).

Na FIGURA 16 é apresentado o protocolo de expressão, renaturação e purificação da proteína expressa por pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3). A proteína recombinante é solubilizada em alta concentração de uréia e renaturada por diluição em um tampão contendo cistina e cisteína. Após adsorção em resina Ni<sup>2+</sup> - Sepharose, a proteína recombinante foi eluída em duas frações: por competição com Imidazol e por quelação do Ni<sup>2+</sup> com EDTA. A FIGURA 17 mostra o resultado desse protocolo de purificação e renaturação. Podemos observar que a purificação obtém altos rendimentos e pureza. Na amostra correspondente à fração eluída com EDTA existe a presença de uma banda de pouco mais de 21 kDa que pode corresponder a um contaminante ou a um dímero da proteína recombinante rNXH8 (a proteína recombinante de fusão com a cauda de histidina tem uma massa molecular teórica de 11 339 Da e o dímero teria 22 678 Da). O material assim purificado foi dialisado e

o sobrenadante inoculado em camundongos para obter-se um soro contendo anticorpos capazes de reconhecerem a proteína rNXH8.

### **rNXH8 Forma Agregados após a Purificação**

Verificamos, entretanto, que na renaturação ou durante a diálise para a retirada do imidazol a proteína recombinante formava um precipitado. Na FIGURA 18 podemos observar o resultado de uma purificação em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose feita com uréia 2 mol/L e a diálise de rNXH8. Verificou-se que após a diálise, tinha ocorrido a precipitação de rNXH8 restando uma parcela ainda em solução que aparecem no gel sem βME. O material precipitado não penetra o gel na ausência de βME. O ponto crítico desse fenômeno de agregação da proteína rNXH8 acontece quando a concentração de uréia é reduzida abaixo de 2 mol/L e a retirada de imidazol também parece ter implicações na precipitação.

### **O Vetor pCP-NXH8**

O vetor pCP expressa proteínas recombinantes em fusão com domínios sintéticos (ZZ) da proteína A de *Staphylococcus aureus* sob o controle do promotor do fago T7. Esses domínios ZZ ligam-se à região Fc de IgGs. A proteína de fusão pode ser purificada por afinidade em resinas cromatográficas com IgG acoplada. Além disso, a erabutoxina de *Laticauda semifasciata* já havia sido expressa, purificada e renaturada de forma eficiente nesse plasmídeo (DREVET et al., 1997). Para subclonar a seqüência do peptídeo maduro de *nxh8* em pCP, o vetor pGEM3Zf-nxh8 foi utilizado como molde para PCR. Utilizou-se um oligonucleotídeo 5' que hibridiza para a região 69 a 89 de *nxh8* e insere um sítio de Kpn I 5'-terminal e um códon para metionina na posição -1. A função desse códon é introduzir uma metionina entre os domínios ZZ e a proteína NXH8 na fusão. Dessa forma NXH8 poderia ser retirada da fusão por clivagem por CNBr, uma vez que não existem metioninas na seqüência de NXH8. Essa proteína obtida após clivagem poderia ser idêntica à proteína nativa encontrada no lúmen da glândula de veneno da serpente. O oligonucleotídeo reverso foi o pUC/M13 universal. O produto de PCR digerido com as enzimas de restrição Kpn I e BamH I foi subclonado em pCP nos mesmos sítios (FIGURA 19). Os clones recombinantes foram selecionados por tamanho e análise de restrição (FIGURA 20).

O resultado da indução de culturas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pCP-NXH8 é mostrado na FIGURA 21. Nota-se uma banda de proteína induzida com pouco mais de 20 kDa. A massa molecular teórica da proteína de fusão rZZNXH8 seria de 22 243 Da.

## **pCP-NXH8 Expressa uma Proteína de Fusão Solúvel no Citoplasma Bacteriano**

A FIGURA 22 mostra que as culturas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas por pCP-NXH8 e induzidas por IPTG expressam uma proteína de fusão solúvel no citoplasma bacteriano. As culturas induzidas foram tratadas com lisozima e sonicadas. No sobrenadante do sonicado encontramos a banda da proteína induzida. O precipitado do sonicado também mostra a mesma banda, talvez devido à lise parcial das células bacterianas, à formação de agregados insolúveis ou devido à contaminação de proteínas solúveis no precipitado. Em contraste, a proteína expressa por pRSETC-nxh8M permanece totalmente no precipitado insolúvel

## **Os Soros Anti – Elapídico e Anti – rNXH8 Reconhecem as Proteínas Recombinantes Expressas por pRSETC-nxh8M e pCP-NXH8**

A FIGURA 23 mostra um Western blot feito com diferentes anticorpos primários. No filtro A verificamos que o soro anti – elapídico do Instituto Butantan produzido com o veneno bruto de cobras corais *M. corallinus* e *M. frontalis* (proporção 1:1 v/v), reconhece tanto a proteína recombinante expressa por pRSETC-nxh8M quanto por pCP-NXH8 em extratos bacterianos induzidos. A proteína rNXH8, expressa por pRSETC-nxh8M e purificada em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose, também é reconhecida pelo mesmo soro. Essa proteína rNXH8 foi utilizada para imunizar camundongos e o soro obtido foi capaz de identificar a proteína homóloga purificada, tal como é visto no filtro B. A tira C não contém anticorpos primários e, portanto, nenhuma banda foi detectada.

## **Purificação e Renaturação da Proteína rZZNXH8 em IgG - Sepharose**

A FIGURA 24 mostra o protocolo de purificação e renaturação da proteína recombinante expressa por pCP-NXH8. A proteína de fusão obtida pode ser purificada pela afinidade conferida pelos domínios ZZ regiões Fc das moléculas de IgG acopladas a uma resina de Sepharose. Ainda que solúvel no citoplasma bacteriano, é necessário renaturar a proteína recombinante para a devida formação das pontes dissulfeto. Para isto seguimos um protocolo idêntico ao descrito por DREVET et al., 1997.

Fundamentalmente o protocolo consiste em ligar a proteína recombinante a uma resina de IgG - Sepharose e renaturá-la na própria resina usando um tampão contendo glutatona reduzida e oxidada. A seguir, a proteína recombinante é eluída em pH ácido. O resultado é mostrado na FIGURA 25. Podemos ver nas frações eluídas da resina, bandas que devem corresponder às cadeias leve e pesada das IgGs. Não

obtivemos sucesso nessa purificação, inclusive com outras proteínas recombinantes. De maneira geral, a resina era danificada permanentemente, perdendo a IgG e a capacidade de ligação das proteínas em fusão com os domínios ZZ. A proteína recombinante nunca pode ser identificada e a resina reutilizada após esse procedimento.

### **O Vetor pEZZ-NXH8 Expressa a Proteína de Fusão no Periplasma**

O vetor pEZZ18 (Pharmacia ®) é capaz de expressar proteínas recombinantes em fusão com os domínios ZZ diretamente no periplasma bacteriano. Isso pode ser uma alternativa quando é necessário produzir proteínas recombinantes ricas em pontes dissulfeto em sua conformação nativa. A FIGURA 26 mostra o resultado da subclonagem de NXH8 em pEZZ18. Para isto, o plasmídeo pCP-NXH8 foi digerido com BamH I e Kpn I e o inserto subclonado no vetor pEZZ18 nos mesmos sítio, originado o vetor pEZZ-NXH8. Os clones recombinantes foram selecionados por tamanho e análise de restrição com a enzima Cla I. O vetor pEZZ-NXH8 expressa a proteína de fusão sob o controle do promotor da proteína A de *Staphylococcus aureus* constitutivamente. O peptídeo sinal da proteína A dirige a fusão para o periplasma bacteriano. Após o processamento a proteína recombinante pode ser recuperada por choque osmótico ou no próprio meio de cultura em certos casos. A fusão clivada por CNBr poderia gerar NXH8 idêntica à provável toxina nativa.

A FIGURA 27 mostra o resultado dessa expressão. É difícil detectar no SDS-PAGE a proteína expressa tanto nos extratos totais quanto nos fluidos obtidos após o choque osmótico. Entretanto, o Western blot demonstra que a proteína recombinante foi expressa. Nos extratos bacterianos encontramos a proteína expressa por pEZZ-NXH8 em duas formas que podem corresponder ao precursor e a fusão rZZNXH8 processada. Nos fluidos osmóticos oriundos do periplasma, encontramos apenas uma banda equivalente a massa molecular teórica de 22 243 Da correspondente à proteína processada. Chamamos a atenção que o Western blot foi realizado tendo com anticorpo primário o soro anti – elapídico do Instituto Butantan. Esse soro é fabricado de maneira que as imunoglobulinas de cavalo são clivadas, retirando-se a porção Fc da molécula. Desta forma, não existe afinidade dos domínios ZZ da proteína recombinante pelo soro que é constituído apenas pela fração Fab das IgGs. Assim sendo, as bandas reveladas são devidas à reatividade desse soro com o domínio NXH8 da fusão.

## O Vetor pRSET-ZZNXH8 Produz uma Proteína Solúvel com Cauda de Histidinas

Fizemos também uma construção com a intenção de adicionar uma cauda de histidinas à proteína de fusão rZZNXH8. Para isto o plasmídeo pCP-NXH8 foi amplificado por PCR utilizando-se um oligonucleotídeo que hibridiza para a região 5'-terminal de ZZ e insere um sítio de BamH I e um oligonucleotídeo reverso que hibridiza na região 3' não traduzida de *nxb8* e também insere o mesmo sítio na extremidade 3'. O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição BamH I e clonado no vetor pRSET B desfosforilado no sítio de BamH I (FIGURA 28). O plasmídeo contendo o inserto na orientação correta em relação ao promotor T7 foi escolhido após análise de restrição, tal como indicado na FIGURA 29. O vetor assim construído foi denominado pRSET-ZZNXH8 e expressa uma proteína de fusão recombinante com uma cauda de histidinas N-terminal: (His)ZZNXH8. A massa molecular teórica da proteína de fusão é de 26 313 Da. Essa proteína de fusão pode então ser purificada por afinidade em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose. Uma vez que a seqüência madura de NXH8 não contém resíduos de metionina, se a proteína de fusão for tratada com CNBr, ocorrerá clivagem após o resíduo de metionina inserido entre a região (His)ZZ e a toxina, liberando como produto, NXH8 idêntico à provável toxina nativa expressa na glândula de veneno da serpente.

A FIGURA 30 mostra o resultado da expressão de pRSET-ZZNXH8. Podemos identificar uma banda de indução quase com a mesma migração da banda de 30 kDa do padrão de proteínas. Entretanto, a expressão da fusão (His)ZZNXH8 é menor que aquela obtida com a construção pRSETC-nxh8M nas mesmas condições. O protocolo de purificação da proteína expressa por pRSET-ZZNXH8 está mostrado na FIGURA 31. A proteína foi expressa na forma solúvel (FIGURA 32) o sobrenadante do lisado na prensa hidráulica (French Press) contém a banda de proteína recombinante que adsorve à resina de cromatografia. A FIGURA 32 mostra o resultado da purificação em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose, sem o processo de renaturação. As frações eluídas com imidazol mostram uma banda correspondente à (His)ZZNXH8. Ainda restam diversos contaminantes, o que nos obriga a melhorar o protocolo de purificação. Entretanto, este vetor pode ser uma alternativa à expressão obtida por pRSETC-nxh8M com a vantagem de produzir uma proteína solúvel e cuja renaturação e purificação pode ser mais simples. Essa banda também é reconhecida pelo soro anti - rNXH8 e pelo soro anti - elapídico (Resultados a seguir).

## **A Proteína Recombinante rNXH8 pode ser Usada como Antígeno**

### **As Proteínas Recombinantes de Todas as Construções Reagem Contra Soros Homólogos e Heterólogos**

Vimos anteriormente que rNXH8 expresso em corpúsculos de inclusão por pRSETC-nxh8M e purificado em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose, foi utilizado para imunizar camundongos e obter um soro específico para NXH8. De maneira análoga foi feito um soro capaz de reconhecer NXH1 (SILVEIRA DE OLIVEIRA, 2000). A FIGURA 33 mostra o resultado dos Western blots realizados com o soro anti – elapídico do Instituto Butantan, e os soros contra as proteínas recombinantes produzidos em camundongos denominados anti – rNXH8 e anti – rNXH1. Todos os soros foram previamente adsorvidos com extratos totais de *E. coli* BL21(DE3), tentando evitar a detecção de bandas não específicas.

Tal como esperado, as culturas induzidas de *E. coli* transformadas com os diversos vetores de expressão (pEZZ-NXH8 que secreta a toxina de forma solúvel no periplasma ou no meio de cultura; pRSETC-nxh8M que produz a proteína recombinante em corpúsculos de inclusão; pRSET-ZZNXH8 e pCP-NXH8, que expressam a proteína de fusão solúvel no citoplasma) tiveram bandas correspondentes à proteína NXH8 reconhecidas pelos soros anti – elapídico e anti – rNXH8 (Western blots B e C). Isso demonstra que NXH8 foi expresso por todos os vetores. Como o soro anti – elapídico é produzido contra o veneno bruto das cobras corais *M. corallinus*, *M. frontalis*, podemos inferir que NXH8 ou está presente no veneno ou compartilha epítomos imunorreativos com os componentes desses venenos. Entretanto, o soro anti – rNXH1 também é capaz de reconhecer em Western blot as proteínas recombinantes contendo a seqüência NXH8 (western blot D). Pode-se verificar que os soros detectam várias bandas de pesos variados, além das principais, no extrato total bacteriano. Isto pode ser devido à formação de agregados de proteína recombinante, ou aos respectivos produtos de degradação desses agregados, ou a reações inespecíficas com proteínas bacterianas, ou ainda devido à diluição dos anticorpos primários e secundários ou aos conjugados enzimáticos utilizados no Western blot.

### **Os Soros Para Os Antígenos Recombinantes tem Reatividade Cruzada Em ELISA**

A FIGURA 34 mostra o resultado de ELISA utilizando placas sensibilizadas com rNXH8 e rNXH1. Os soros utilizados foram o soro anti – elapídico do Instituto Butantan, o soro anti – rNXH8 produzido em camundongos inoculados com rNXH8, o soro anti – rNXH1 produzido em camundongos inoculados com

rNXH1. É um soro anti – rNXH8/rNXH1 produzido em camundongos inoculados com ambos os antígenos recombinantes purificados em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose.

O soro anti – elapídico reconhece as proteínas rNXH8 e rNXH1 mais fracamente que os soros específicos. Isto pode refletir o tamanho da população de anticorpos específicos para rNXH1 e rNXH8 ou que as proteínas recombinantes foram expressas com uma conformação distinta daquela presente no veneno. O soro anti – rNXH8/rNXH1 também reconhece os dois tipos de antígenos recombinantes. Entretanto, rNXH8 é mais fortemente reconhecida. Pode-se ver que existe reação cruzada entre os soros anti – rNXH8 e anti – rNXH1, pois os dois reconhecem as duas proteínas nas duas placas de ELISA confirmando os resultados obtidos no Western blot (FIGURA 33). Neste caso, o soro homólogo sempre apresenta um maior título. Além disso, os soros anti – rNXH8, anti – rNXH1 e anti – rNXH8/rNXH1 sempre foram capazes de reconhecer ambas as proteínas recombinantes em diluições superiores a 1: 10 000. Podemos concluir que existe reação cruzada entre ambas as proteínas recombinantes e os soros policlonais anti – rNXH1 e anti – rNXH8.

### **O Soro Anti – rNXH8 Reconhece uma Proteína do Veneno de *Micrurus corallinus* e do Veneno de Alguns outros Elapídeos**

O soro anti – rNXH8 foi testado contra o veneno de *M. corallinus*, contra os venenos de outras serpentes do gênero *Micrurus*, contra os venenos de outros gêneros de serpentes elapídicas e de outras serpentes não relacionadas aos elapídeos. Foi feito um painel desses venenos que foi utilizado em réplicas para produzir Western blots com soros anti - *Micrurus corallinus*, soro anti – *Micrurus frontalis* e soro anti – *Micrurus spixii*, produzidos em cavalos pelo Instituto Butantan. Além desses soros, foram utilizados também os soros produzidos em camundongos contra os antígenos recombinantes anti – rNXH1 e anti – rNXH8 (PRIETO DA SILVA et al., 2001). Esse painel permite avaliar a imunorreatividade dos componentes de diversos tipos venenos frente aos diversos soros policlonais.

O painel foi feito por um SDS-PAGE em gradiente de 10 a 20% com 16 venenos diferentes e corado por Coomassie Blue R250 (Ver FIGURA 35A). O primeiro grupo de venenos é composto por venenos de onze espécies de serpentes do gênero *Micrurus* (canaletas de 2 a 12). Inclusive aquelas corais brasileiras que são mais importantes de ponto de vista de saúde pública: *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*. Foram incluídos também os venenos de alguns elapídeos africanos, australianos e asiáticos, tais como: de *Dendroaspis angusticeps*, de *Notechis scutatus scutatus* e *Bungarus multicinctus* (canaletas de 14 a 16). Uma cardiotoxina purificada do veneno de *Naja naja kaouthia* também está presente (canaleta 18). Por fim, foram incluídos, os venenos de dois viperídeos: *Crotalus durissus terrificus* (canaleta 17) e

*Bothrops jararaca* (canaleta 19). Podemos ver que os venenos do gênero *Micrurus* têm um padrão de proteínas muito similar, principalmente proteínas de baixa massa molecular. Já os venenos de viperídeos são distintos. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* tem uma banda forte na altura de 30 kDa e outros componentes majoritários abaixo de 21 kDa. O veneno de *Bothrops jararaca* apresenta uma distribuição mais homogênea de componentes de diversas massas moleculares entre 70 a 14 kDa. Já os venenos dos elapídeos não pertencentes ao gênero *Micrurus* apresentam um padrão similar com componentes majoritários de baixa massa molecular.

Na FIGURA 35B vemos um Western blot produzido com o soro anti - *Micrurus corallinus*. Vemos que esse soro reage contra todos os venenos de *Micrurus*. Ainda que reaja mais fortemente com o veneno homólogo. Também reage com os venenos de outros elapídeos não pertencentes ao gênero *Micrurus* (canaletas de 14 a 16): *Dendroaspis angusticeps*, *Notechis scutatus scutatus* e *Bungarus multicinctus*. Também detecta a cardiotoxina de *Naja naja kaouthia* (canaleta 18). Reage fortemente com uma banda de cerca de 43 kDa do veneno de *Bothrops jararaca* (canaleta 19).

O mesmo painel foi utilizado com soro anti - *M. frontalis* mostrado na FIGURA 35C. Esse soro reage contra os venenos de todas as serpentes do gênero *Micrurus*, mas detecta mal componentes do veneno de *M. corallinus* (canaleta 2) e reage melhor com os venenos de *M. lemniscatus* (canaleta 4), *M. spixii* (canaleta 5), *M. frontalis* (canaleta 6), *M. spixii martiusi* (canaleta 11). Detecta levemente uma banda no veneno de *Notechis scutatus scutatus* (canaleta 15), a cardiotoxina de *Naja naja kaouthia* (canaleta 18) e a banda de 43 kDa do veneno de *Bothrops jararaca* (canaleta 19).

A FIGURA 35D mostra o Western blot feito com o mesmo painel de venenos utilizando o soro anti - *Micrurus spixii*. O soro reage bem com os venenos de serpentes do gênero *Micrurus*. Mas podem ser detectados diferentes níveis de reatividade. Os venenos de *M. frontalis altirostris* (canaleta 7), *M. surinamensis* (canaleta 8), *M. carinicauda dumerilli* (canaleta 9), e *M. hemprichii* (canaleta 10) são um pouco menos reativos. Mas o soro detecta também bandas no veneno de *Notechis scutatus scutatus* (canaleta 15), *Bungarus multicinctus* (canaleta 16) e *Crotalus durissus terrificus* (canaleta 17). Também foi detectada a banda de 30 kDa do padrão de proteínas.

Note que o soro produzido contra o veneno de *M. corallinus* (FIGURA 35A) o soro anti - *M. corallinus* diluído 1:500 reconhece mais bandas em outros venenos, inclusive em elapídeos não pertencentes ao gênero *Micrurus*. Isto parece indicar que o veneno de *M. corallinus* possui uma miscelânea abrangente de toxinas encontradas em diversos venenos elapídicos. De uma maneira geral, a detecção dos componentes dos venenos foram mais intensos utilizando soros homólogos.

Na FIGURA 35E vemos o Western blot produzido pelo soro anti – rNXH8 contra os venenos do mesmo painel. Verifica-se que o soro é capaz de reconhecer fortemente uma banda de baixa massa molecular do veneno de *Micrurus corallinus* (canaleta 2). Mas reconhece também mais fracamente bandas de mesma massa nos venenos de *M. frontalis altirostris* (canaleta 7), *Dendroaspis angusticeps* (canaleta 14) e *Bungarus multicinctus* (canaleta 16).

Já a FIGURA 35F mostra o Western blot realizado com o soro anti – rNXH1. Esse soro em contraposição aos demais é específico para o veneno de *M. corallinus* (canaleta 2), (SILVEIRA DE OLIVEIRA et al., 2000). Isto reforça o caráter único do veneno de *M. corallinus*.

Conclui-se que os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* compartilham proteínas imunorreativas entre si e com venenos de outras serpentes. Entretanto, têm componentes específicos de cada espécie. O soro anti - rNXH8 não é específico para o veneno de *M. corallinus*, enquanto que o soro anti - rNXH1 não reconhece na diluição utilizada nenhum dos outros venenos testados.

## **Ligação do Veneno de *M. corallinus* ao Receptor Nicotínico de Acetilcolina do Músculo de Ratos Neonatos**

### **O Veneno de *M. corallinus* tem Componentes que se Ligam ao Receptor Muscular de Acetilcolina**

Estudos farmacológicos descritos na literatura (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/1984) demonstraram que o veneno de *M. corallinus* bloqueia a junção neuromuscular de duas formas distintas. Uma, eleva a liberação espontânea de acetilcolina de forma não responsiva ao impulso nervoso, uma ação pré - sináptica na membrana neuronal. A outra ação é o bloqueio da despolarização da membrana muscular que deixa de responder aos impulsos de acetilcolina. Esta última é uma ação pós - sináptica de bloqueio dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na junção neuromuscular que deve ser resultante da ação de  $\alpha$  - neurotoxinas presentes nesse veneno. O resultado final é a paralisia flácida do músculo.

Um ensaio clássico (CHANGEUX et al., 1970; ROSENTHAL et al., 1994) utiliza uma  $\alpha$  - neurotoxina longa do veneno de *Bungarus multicinctus* como um antagonista colinérgico, com alta seletividade e ligação quase irreversível para estudar o nAChR ( $\alpha$  - bungarotoxina,  $K_d = 10^{-12}$  mol/L). Usando essa

propriedade, verificamos que o veneno de *M. corallinus* era capaz de inibir a ligação de  $\alpha$  - bungarotoxina marcada radiativamente com  $^{125}\text{I}$ . Esse ensaio está descrito na Tabela 4.

A FIGURA 36 mostra o resultado da incubação de membranas do músculo esquelético de camundongos neonatos com o veneno de *M. corallinus* (0,05; 0,5 e 5 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ). Após uma hora de incubação, adicionou-se  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina. Após mais uma hora de incubação, as membranas foram lavadas e a radiatividade foi medida por cintilação. Vemos na FIGURA 36, nas barras em tons castanhos - amarelados, que quanto maior é a quantidade do veneno menor é a quantidade de radiatividade medida nas membranas. Concentrações de 0,5 – 5,0  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  são suficientes para o bloqueio total dos receptores de maneira análoga à efetuada pela nicotina em concentrações de  $1 \times 10^{-2}$  mol/L (barra branca). Já o veneno diluído para concentrações de 0,05  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  é capaz de reduzir quase à metade a quantidade de  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina ligada aos receptores. Este resultado indica que o veneno de *M. corallinus* realmente tem  $\alpha$  - neurotoxinas capazes de impedir a ligação da  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina ao nAChR do músculo.

### **O Soro anti – rNXH1 não Inibe a Ligação de Componentes do Veneno de *M. corallinus* ao Receptor Muscular de Acetilcolina**

Soros produzidos contra proteínas do veneno de *M. corallinus* poderiam ser capazes de impedir a ligação desses componentes do veneno ao nAChR se essas toxinas tiverem afinidade pelo receptor. Assim testamos quais os efeitos de neutralização da afinidade do veneno de *M. corallinus* seria causado pelos soros anti – rNXH1, anti – rNXH8 e anti – rNXh8/rNXH1 (MIX). Para isso o veneno em diversas concentrações foi incubado previamente com cada soro durante 1 hora. Posteriormente, essa mistura foi utilizada em incubações de uma hora com as membranas musculares. E, finalmente, a  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina foi adicionada.

Vemos na FIGURA 36 nas barras em tons azuis que o soro anti – rNXH1 não foi capaz de impedir a ligação dos componentes do veneno que têm afinidade pelo nAChR. Mesmo quando o veneno é adicionado na mais baixa concentração (0,05 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ) a quantidade de sítios disponíveis para a competição com a  $^{125}\text{I}$  -  $\alpha$  - bungarotoxina é similar àquela obtida apenas com o veneno sozinho. Isso mostra que o soro anti – NXH1 não é capaz de neutralizar componentes do veneno de *M. corallinus* que tenham afinidade pelo nAChR.

## O Soro anti – rNXH8 Inibe a Ligação de Componentes do Veneno de *M. corallinus* ao Receptor Muscular de Acetilcolina

Também na Figura 36 podemos ver, nas barras de tons vermelhos, que o soro anti – rNXH8 é capaz de inibir a ligação de componentes do veneno de *M. corallinus* ao nAChR, quando o veneno é utilizado em concentrações de 0,05 µg/100µL e 0,5µg/100µL, após incubação por uma hora do veneno com o soro. Nestes dois casos a neutralização da afinidade foi total porque a <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina voltou a se ligar às membranas de maneira comparável ao controle sem veneno (barra cinza). Já quando o veneno é utilizado na concentração de 5µg/100µL, o soro anti – rNXH8 não é capaz de neutralizar todos os componentes do veneno que têm afinidade pelo nAChR, pois a quantidade de radiatividade medida é similar àquela obtida com nicotina (barra branca), ou somente com veneno em igual concentração (barra castanho claro), indicando que um volume maior de soro precisaria ser utilizado para neutralizar o excesso de veneno presente neste caso.

A FIGURA 36 ainda mostra que o soro produzido contra ambos os antígenos (soro anti – rNXH8/rNXH1 (MIX) em barras de tons verdes), tem um comportamento similar ao soro anti – rNXH8, ainda que seja um pouco menos potente. Pode-se ver que o soro contra as proteínas recombinantes não impede a ligação da <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina aos nAChR das membranas, indicado pela barra cinza clara, que representa a quantidade de <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina ligada às membranas em presença de soro anti – rNXH8/rNXH1 (anti – MIX). A quantidade de radiatividade medida na presença de soro foi semelhante àquela medida no controle usando-se apenas <sup>125</sup>I - α - bungarotoxina na concentração de  $1 \times 10^{-8}$  mol/L (barra cinza escura).



## DISCUSSÃO

Neste trabalho foi clonada uma possível toxina do veneno de *Micrurus corallinus* chamada NXH8. Esta toxina pertence à família de proteínas em três dígitos. Apresenta algumas características distintas tais como elementos característicos de  $\alpha$  - neurotoxinas longas, uma quinta ponte dissulfeto extra, localizada na primeira alça e uma cauda curta C-Terminal. Isso nos motivou a caracterizar esta toxina peculiar, clonando a seqüência e produzindo uma toxina recombinante em *Escherichia coli* para imunizar camundongos, obtendo um soro anti-rNXH8.

### Expressão Renaturação e Purificação

Utilizamos diversos sistemas de expressão em *E. coli* (TABELA 03). Ficou demonstrado que a presença do peptídeo sinal do precursor de NXH8 inibe a síntese da proteína recombinante. Isso deve ser devido à característica hidrofóbica do peptídeo sinal que se liga à membrana interna interferindo com diversos sistemas vitais da bactéria. Além disso, os peptídeos sinais eucariotos são diferentes dos peptídeos sinais procariotos. Já o peptídeo maduro foi expresso em *E. coli* em altos níveis com grande eficiência (Veja a FIGURA 14). A proteína recombinante expressa por pRSETC-nxh8M tem uma fusão com uma cauda de histidinas acoplada. Essa cauda N-terminal permite a purificação da toxina recombinante em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose. Além disto, é pouco imunogênica e não afeta a compartimentalização, a secreção ou a formação da estrutura terciária da proteína recombinante, sendo que freqüentemente, não é necessário retirar esta cauda para se obter uma proteína funcional (DÖEBLI et al., 1990; STÜBER et al., 1990).

A proteína de fusão apresenta ainda um sítio de clivagem para a enzima enteroquinase ((Asp)4Lys). Se a enteroquinase for usada para clivar a proteína de fusão, produz-se NXH8 com 4 aminoácidos extras N-terminais (Asp-Arg-Trp-Ile-NXH8). Entretanto, não nos preocupamos em retirar essa cauda, pois tínhamos indicações que era possível obter uma proteína funcional ainda que em fusão. De fato, a erabutoxina havia sido clonada e expressa em fusão com o domínio extracelular ligante de IgGs da proteína A de *Staphylococcus aureus* (446 aminoácidos, 48,6 Kda) que é maior que a neurotoxina. O híbrido ainda assim era capaz de se ligar aos nAChRs (DUCANCEL et al., 1989).

Tal como acontece com a maioria das proteínas heterólogas expressas em *E. coli*, rNXH8 foi expressa em forma de corpúsculos de inclusão (MARSTON, 1986) (veja na FIGURA 15). Esse fenômeno de agregação protéica ocorre devido aos altos níveis de expressão e a interações iônicas e hidrofóbicas entre as cadeias de proteína recombinante nascente. Soma-se a isto, o fato das foldases e chaperoninas bacterianas não

serem adequadas e ou em quantidades suficientes para enovelarem a proteína nascente (HOCKNEY 1994; WALL & PLÜCKTHUN, 1995; MAYHEW et al., 1996). Outra das principais causas da formação de agregados é que as pontes dissulfeto não se formam no interior do citoplasma bacteriano, por não haver condições de óxido - redução favoráveis e devido à presença de diversas tiorredoxina reductases (*trxB*) e glutathione reductases (*gor*) que não deixam essas pontes se formarem no citoplasma. As proteínas com pontes dissulfeto devem ser secretadas para o periplasma para aí serem enoveladas por diversas dissulfeto - isomerases do sistema *Dsb* (RIETSCH et al., 1996).

A expressão em corpúsculos de inclusão implica em passos posteriores de solubilização usando agentes desnaturantes fortes. Diálise e renaturação são necessárias para obter uma proteína recombinante com a estrutura terciária e com a correta formação de pontes dissulfeto. Esses protocolos de renaturação são sempre empíricos, dependem da proteína a ser renaturada e de inúmeras outras variáveis, como concentração, pH, temperatura, condições de oxirredução, a presença de detergentes e outros aditivos (KOHNO et al., 1990).

Por outro lado, a expressão em corpúsculos de inclusão pode ser vantajosa em termos de purificação. Os corpúsculos são facilmente recuperados por centrifugação após a lise celular. São resistentes às proteases e em poucos passos de purificação pode-se obter alta pureza e rendimento (MARSTON, 1986; KOHNO et al., 1990). NXH8 é rica em cisteínas, todas elas envolvidas na formação de pontes dissulfeto necessárias à sua estrutura tridimensional e, portanto, à sua atividade, necessitando ser renaturada para adquirir plena atividade.

Tivemos pleno sucesso expressando e purificando NXH8 no sistema pRSET, ainda que a renaturação da proteína necessite ser mais bem estabelecida a fim de obter uma toxina ativa e que não precipite (FIGURA 18).

Procurando outras possibilidades de expressão de NXH8 usamos o vetor o pCP-NXH8 que expressa NXH8 em fusão com domínios ZZ que têm afinidade pela porção Fc das IgGs. A proteína de fusão é expressa solúvel no citoplasma (FIGURA 22). Mas ainda necessita ser renaturada para a correta formação das pontes dissulfeto. Seguimos um protocolo de expressão, purificação e renaturação para proteínas ricas em pontes dissulfeto acoplado a resinas de IgG - Sepharose (DREVET et al., 1997). Esse protocolo de purificação e renaturação se mostrou bem sucedido com toxinas similares, como é o caso da erabutoxina a. No entanto, não conseguimos os mesmos resultados de DREVET et al., 1997 (FIGURA 25). O procedimento de renaturação danifica irreversivelmente a resina cromatográfica. Entretanto, os rendimentos desse protocolo mesmo com erabutoxina a são naturalmente baixos e exigem o uso de

fermentadores de 30 litros. Após a renaturação em IgG - Sepharose, são necessários novos passos cromatográficos por cromatografia de fase reversa. Além disso, é normal a formação de produtos de degradação de proteínas expressas no citoplasma bacteriano, em fusão com proteína A ou domínios ZZ (comunicação pessoal, A. MÉNEZ).

Usamos também o vetor pEZZ18 que secreta constitutivamente, sob o controle do promotor da proteína A, a fusão ZZ-NXH8 no periplasma da *E. coli*. Os rendimentos com o sistema de secreção periplasmático do pEZZ-NXH8 foram muito baixos, mas possivelmente a proteína pode estar renaturada e ativa se for secretada e processada corretamente (FIGURA 27). O sistema de secreção para o periplasma da *E. coli* depende da ligação do peptídeo nascente à proteína SecB e posterior translocação e clivagem do peptídeo sinal pelo sistema Sec. Posteriormente, a proteína é enovelada com o auxílio de diversas chaperoninas do complexo Dsb, envolvidas na formação de pontes dissulfeto (PUGSLEY et al., 1990; STEWART et al., 1998). Entretanto, além do baixo rendimento da expressão dirigida para o periplasma, não é raro ocorrerem também a formação de agregados periplasmáticos da proteína recombinante. No nosso caso os níveis de expressão no espaço periplasmático foram baixos, somente detectável por Western blot (FIGURA 27B). Não verificamos a possibilidade da proteína recombinante estar sendo secretada para o meio de cultura.

Procurando aliar a expressão e purificação eficiente do sistema pRSET à fusão com ZZ, usamos a construção pRSETB-ZZNXH8. Esta construção permite a purificação em resina de Ni<sup>2+</sup> - Sepharose da proteína de fusão solúvel. A quantidade de (His)ZZNXH8 expressa é um pouco inferior àquela obtida por pRSETC-nxh8M. Os resultados obtidos com essa construção são promissores (FIGURA 32), ainda que o sistema de purificação e renaturação precise vir a ser mais bem elaborado. Atualmente estão disponíveis mutantes de *Escherichia coli* (*trxB* e *gor*) que permitem a formação de pontes dissulfeto no citoplasma bacteriano (PRINZ et al., 1997; BESSET et al., 1999). Assim, tanto rNXH8 quanto (His)ZZNXH8, podem vir a ser obtidos na forma nativa em *E. coli*.

### **Características Imunorreativas de rNXH8**

NXH8 deve ser uma proteína presente na glândula de veneno da *M. corallinus*, uma vez que o soro anti – elapídico, preparado com os venenos brutos e *M. corallinus* e *M. frontalis* em cavalos pelo Instituto Butantan, reconheceu a proteína recombinante expressa em *E. coli*, (FIGURAS 23, 27 e 33C). Da mesma forma, o soro anti-rNXH8 reconhece uma banda de massa molecular esperada no veneno de *M. corallinus*.

Este soro anti – rNXH8 reconheceu em Western blot a proteína recombinante expressa em *E. coli* por todas as construções que foram utilizadas, inclusive no fluido periplasmático de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada com pEZZ-NXH8. (FIGURAS 24 e 34B)

Esse soro também reconheceu rNXH8 e rNXH1 em Western blot e ELISA. O mesmo ocorreu com o soro anti – rNXH1, mostrando que ambas as toxinas são estruturalmente relacionadas e tem imunorreatividade cruzada, ao menos na forma desnaturada. (FIGURAS 34 e 35).

O soro anti - rNXH1 é específico para o veneno de *M. corallinus*, pois reconhece uma única banda presente apenas no veneno desta serpente (FIGURA 35F). Já o soro anti – rNXH8 reconhece uma banda no veneno de *M. corallinus* e também uma banda no veneno de uma outra coral: *M. frontalis altirostris*, além da mesma banda nos venenos da Mamba africana *Dendroaspis angusticeps* e da Krait asiática *Bungarus multicinctus* (FIGURA 35E). Os venenos de outras nove corais não apresentaram proteínas reconhecidas por anti – rNXH8. Isso demonstra que NXH8 tem similares em outros venenos de elapídeos ou compartilha epítomos com proteínas estruturalmente relacionadas presentes nesses venenos.

Tais resultados evidenciam o caráter único do veneno de *M. corallinus* primeiro por conter uma proteína que não é encontrada em nenhum outro veneno (NXH1) e segundo porque excetuando *M. frontalis altirostris*, é mais semelhante ao veneno de elapídeos africanos e asiáticos, em relação à presença de proteínas relacionadas com NXH8, que com os demais venenos de corais. Além disso, em comparação com os soros para os venenos de *M. frontalis* e *M. spixii*, o soro anti – *M. corallinus* parece ter reatividade cruzada com um número maior de venenos. Isto pode indicar outra característica única do veneno de *M. corallinus* que é o de conter um largo espectro de toxinas que podem atuar em uma gama variada de presas, confirmando os dados descritos por JORGE da SILVA & AIRD, 2001.

### **O Soro Anti – rNXH8 Impede a Ligação das $\alpha$ - Neurotoxinas do Veneno de *M. corallinus* ao nAChR do Músculo de Camundongos Neonatos.**

O ensaio de ligação ao nAChR mostrou que o veneno de *M. corallinus* tem componentes que impedem a ligação da I<sup>125</sup> -  $\alpha$  - bungarotoxina ao nAChR. Portanto, esse veneno deve conter  $\alpha$  - neurotoxinas que bloqueiam esse receptor (FIGURA 36), confirmando os dados prévios de VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/1984. O soro anti – rNXH8, produzido em camundongos imunizados com rNXH8 mostrou-se eficiente em neutralizar esses componentes. O soro produzido com uma mistura de rNXH8 e rNXH1 tem características similares. Entretanto, o soro anti – rNXH1 não foi capaz de neutralizar as  $\alpha$  - neurotoxinas

do veneno de *M. corallinus*. Isto indica que, NXH8 provavelmente deve-se ligar ao nAChR muscular ou que as  $\alpha$  - neurotoxinas presentes no veneno compartilham com NXH8 um epítipo neutralizante. Eventualmente, proteínas atóxicas podem elicitar anticorpos capazes de neutralizar toxinas. É o caso de uma proteína atóxica de escorpião (TsNTxP - *Tityus serrulatus*), estruturalmente relacionada às toxinas  $\alpha$  e  $\beta$ . Quando essa proteína atóxica é utilizada como antígeno, elicita a formação de anticorpos capazes de neutralizar a fração tóxica do veneno (GUATEMOSIN et al., 2000). Como quando rNXH8 é inoculada como antígeno em camundongos (até 10-30  $\mu$ g) não exibe efeitos tóxicos, podemos pensar que NXH8 não apresenta atividade tóxica ou que foi expressa em conformações diferentes da nativa na forma de toxóide. Já NXH1 deve ter outra função não relacionada com as  $\alpha$  - neurotoxinas.

### Comparação de NXH8 com outras Toxinas em Três Dígitos

Vimos que NXH8 tem o mesmo padrão estrutural observado na família das toxinas em três dígitos, ou seja, três alças (“loops”) formadas por cinco folhas—pregueadas antiparalelas. Duas folhas antiparalelas formadas pela primeira alça e três folhas antiparalelas formadas pela segunda alça e parte da terceira alça. Essas alças emergem de um núcleo formado por quatro pontes dissulfeto. Não existem alfa – hélices na molécula (ver modelo da FIGURA 04B). Entretanto, as toxinas de serpente com este padrão estrutural apresentam inúmeras atividades tóxicas diferentes. O peptídeo maduro de NXH8 tem uma massa molecular teórica de 7 839 Da que é semelhante ao apresentado pelas demais toxinas em três dígitos e um pI de 8,39 que é similar ao ponto isoelétrico das  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas.

Peculiarmente, NXH8 tem a quinta ponte dissulfeto na ponta da primeira alça, que é uma característica de vários homólogos de  $\alpha$  - neurotoxinas longas de serpentes do gênero *Bungarus* e de neurotoxinas fracas de serpentes do gênero *Naja*. Essas seqüências ainda estão mal caracterizadas. Uma das toxinas com essa ponte dissulfeto é denominada Bucandina (BUCA BUNCA) e teve sua estrutura tridimensional determinada (KUHN et al., 2000). Os autores afirmam tratar-se de uma neurotoxina de ação pré – sináptica, mas ainda não foram publicados os ensaios biológicos que permitiram chegar a essa conclusão. Isto é peculiar, uma vez que todas as neurotoxinas conhecidas até agora na família eram pós – sinápticas. Os venenos elapídicos também apresentam ações pré – sinápticas, mas até agora se imaginava que essas ações eram devidas unicamente a  $\beta$  - neurotoxinas com padrão estrutural das PLA<sub>2</sub>. Outra dessas toxinas, com a qual NXH8 tem alta similaridade é a Cadoxina (CADO BUNCA). A estrutura da Cadoxina foi determinada (PARVATHY et al., 2001). Os ensaios biológicos e farmacológicos são preliminares, mas indicam que a Cadoxina é capaz de bloquear a transmissão

colinérgica na junção muscular de galinhas e intensificar a enzima acetilcolinesterase do veneno (NIRTHANAN et al., 2001).

Além disso, é interessante observar que as proteínas atóxicas de outros animais com esse padrão estrutural em três dígitos também têm a mesma quinta ponte dissulfeto na ponta da primeira alça. É o caso das xenoninas de sapo (KOLBE et al., 1993; MACLEOD et al., 1998), dos receptores de membrana ligados a GPI de mamíferos como CD59 e Ly-6 (KIEFFER et al., 1994; GUMLEY et al., 1995), do receptor para o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase - uPAR (PLOUG & ELLIS, 1994), ODR-2 uma proteína requerida para olfação em *C. elegans*, que é expressa exclusivamente em moto - neurônios colinérgicos (CHOU et al., 2001) e de Lynx-1, um peptídeo neuromodulador (MIWA et al., 1999), altamente expresso nas células de Purkinje e com alta afinidade por receptores neuronais homopentaméricos. A fração solúvel de Lynx-1 apresenta atividade pré - sináptica *in vitro* se ligando a receptores tipo  $\alpha 7$  e aumentando a liberação de acetilcolina. Modelos de NXH8 e demais proteínas desta família são vistos na FIGURA 4B. Lynx-1 e as neurotoxinas de serpentes são igualmente dissimilares na sua estrutura primária, tanto quanto de ODR-2. Assim, é possível que ODR-2, tal como Lynx-1 ou como as neurotoxinas, também seja um neuromodulador colinérgico. Estes dados nos levam a imaginar se este padrão de cinco pontes dissulfeto poderia estar implicado em um novo tipo de função reconhecendo novos tipos de receptores. O que poderia indicar que a aquisição de modulação colinérgica por proteínas em forma de três dígitos é ancestral e que essa topologia de cinco pontes dissulfeto pode ser uma aquisição primária. Chama a atenção no modelo de NXH8 que ele tem um arranjo de folhas  $\beta$  - pregueadas similar às  $\alpha$ - neurotoxinas curtas ainda que a ponte dissulfeto interrompa as folhas antiparalelas da primeira alça. Já as  $\alpha$ - neurotoxinas longas não tem folhas  $\beta$  nessa região.

O alinhamento de NXH8 com as toxinas em três dígitos de elapídeos mostrou que há alta similaridade com alguns homólogos de  $\alpha$  - neurotoxinas longas do veneno de serpentes do gênero *Bungarus* (~70%) e também similaridade superior a 60% com algumas  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas. Os dendrogramas dos alinhamentos (FIGURAS 08 e 10) organizaram as seqüências em grupos funcionais capazes de prever possíveis funções de toxinas desconhecidas e assim permitir o planejamento de ensaios funcionais. O dendrograma da FIGURA 08 evidencia que NXH8 é relacionado às  $\alpha$  - neurotoxinas. Além disso, é bastante diferente de outra seqüência da mesma classe encontrada em *M. corallinus* denominada NXH1.

Com relação ao grupo das toxinas elapídicas com o mesmo padrão estrutural de cinco pontes dissulfeto, com a quinta ponte localizada na primeira alça, o dendrograma da FIGURA 10 mostra que o grupo não é

homogêneo. O grupo da bucandina (BUCA BUNCA) é o mais divergente. A erabutoxina a, uma  $\alpha$  - neurotoxina curta, forma um grupo distinto. NXH8 e os homólogos de *Bungarus* formam uma clade relacionada às  $\alpha$  - neurotoxinas longas. As neurotoxinas fracas formam um grupo relacionado, mas distinto das  $\alpha$  - neurotoxinas longas, de NXH8 e similares. Mesmo entre as neurotoxinas fracas é possível estabelecer subgrupos nítidos.

Estudos de caracterização funcional recentes foram feitos com algumas dessas neurotoxinas fracas. TXWW NAJKA (“*Weak Tryptophan-containing neurotoxin*” de *Naja kaouthia* - UTKIN et al., 2001a e 2001b) e XXX9 NAJAT (“*Weak neurotoxin*” de *Naja atra* TA-N9 CHANG et al., 2000a). Essas toxinas reconhecem o nAChR muscular, mas têm diferentes afinidades dependendo da espécie de origem do receptor. O nAChR do músculo de anfíbios é melhor reconhecido que o de mamíferos. Também têm afinidade pelos receptores neuronais tipo  $\alpha 7$ , de maneira similar às  $\alpha$  - neurotoxinas longas. Essas toxinas parecem ter uma estrutura tridimensional menos ordenada e menos rica em estruturas tipo folha -  $\beta$  sem entretanto, apresentarem alfa - hélices. Isto talvez esteja relacionado à menor toxicidade e/ou à capacidade de reconhecer diversos subtipos de nAChRs (CHANG et al., 2000a). Essa heterogeneidade estrutural pode indicar que essas neurotoxinas fracas sejam capazes de sofrerem alterações conformacionais quando se ligam a diferentes receptores. A NXGB BUNMU ( $\gamma$  - bungarotoxina de *B. multicinctus*) apresenta alta toxicidade quando injetada intracerebralmente em camundongos com uma  $LD_{50} = 0,15$  mg/kg, idêntica à toxicidade das  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas. NXH8 está mais próximo dos Homólogos das  $\alpha$  - neurotoxinas longas de *Bungarus*, tal como a Cadoxina (CADO BUNCA). E é estreitamente relacionado com as  $\alpha$  - neurotoxinas longas. Assim podemos pensar que NXH8 nativa apresente um comportamento similar e que até mesmo tenha alta toxicidade.

Observando o alinhamento da FIGURA 07 notamos que a região menos similar de NXH8 corresponde à primeira alça, principalmente em relação às  $\alpha$  - neurotoxinas longas que apresentam diversas deleções nessa região. O modelo virtual de NXH8 também representa essa diferença. A ponte dissulfeto da primeira alça parece interromper a extensão das folhas  $\beta$  - pregueadas e um pequeno ângulo que expõe a ponta da primeira alça. As  $\alpha$  - neurotoxinas longas não tem folhas -  $\beta$  na primeira alça.

Caracteristicamente, NXH8 e os Homólogos de *Bungarus* do grupo 1 apresentam a inserção de dois aminoácidos nessa região que não estão presentes nas neurotoxinas fracas, nos homólogos de *Bungarus* do grupo 2 e nas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas ou longas. Por outro lado a região de mais alta similaridade corresponde àquela formada pela segunda e terceira alça. Neste aspecto, NXH8 é fortemente similar às  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas se for ignorada a cauda C-terminal destas últimas. Outra característica

apresentada por NXH8 em comum com as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e com as  $\kappa$  - neurotoxinas, é a inserção da seqüência de resíduos Ala-Ala-Thr entre as posições 47 e 51. As  $\alpha$  - neurotoxinas curtas apresentam glicina na posição 48, no lugar desse triplete. Encontra-se nas posições de 53 a 56 em NXH8 a seqüência Thr-Val-Lys-Pro que também é encontrada na imensa maioria das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas.

NXH8 é bastante diferente com relação a NXH1 a despeito de serem toxinas de mesmo padrão estrutural encontradas no mesmo veneno e de apresentarem imunorreatividade cruzada. Pesa aqui o fato de NXH1 apresentar inúmeras deleções principalmente na segunda alça. NXH1 tem apenas 57 resíduos sendo a menor seqüência alinhada. De qualquer forma, a similaridade é baixa (42%), sendo a região mais discordante a da primeira e segunda alça.

Com relação às seqüências com o mesmo padrão de cinco pontes dissulfeto, verifica-se nas FIGURAS 07 e 09 que NXH8 é muito similar aos Homólogos do veneno de serpentes do gênero *Bungarus* do grupo 1 e do grupo 2. Mas nestes últimos pode-se notar que a região da segunda alça é bastante diferente. A posição 31 do alinhamento destaca-se quando se comparam NXH8 e homólogos com as neurotoxinas fracas. Os primeiros apresentam um resíduo de triptofano nesta posição, enquanto as neurotoxinas fracas o apresentam substituído por outros resíduos aromáticos ou por glutamina. Todas as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas apresentam triptofano na posição 31. Por outro lado, TXWW NAJKA é a única neurotoxina fraca a apresentar um triptofano na região da segunda alça, mas na posição 41 (UTKIN et al., 2001a). Se desconsiderarmos as cisteínas conservadas, a similaridade de NXH8 com bucandina e TX64 é baixa (FIGURA 09). O mesmo acontece em relação às xenoninas da pele do sapo (KOLBE et al., 1993; MACLEOD et al., 1998) e em relação a CD59/Ly-6 (KIEFFER et al., 1994; GUMLEY et al., 1995), Lynx-1 (MIWA et al., 1999) e ODR-2 (CHOU et al., 2001) em que a similaridade fica abaixo de 35% (DADOS NÃO MOSTRADOS).

### **Aminoácidos Invariantes e Funcionais das $\alpha$ - Neurotoxinas**

RYDÉN et al., 1973 percebeu que alinhando as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas com outras toxinas de ações farmacológicas totalmente distintas, tal como as cardiotoxinas, é possível identificar uma série de resíduos invariantes tanto nas  $\alpha$  - neurotoxinas quanto nas citotoxinas. Esses resíduos compartilhados pelas citotoxinas e pelas  $\alpha$  - neurotoxinas provavelmente devem ser importantes para a estrutura em três dígitos. Por outro lado, outros resíduos somente estão conservados nas  $\alpha$  - neurotoxinas e não estão

presentes nas cardiotoxinas. Estes resíduos provavelmente desempenham papel funcional importante na afinidade pelo receptor de acetilcolina.

Os resíduos invariantes presentes tanto nas neurotoxinas quanto nas citotoxinas são: Ser/Thr – 10, Gly – 22, Tyr – 27, Gly – 46, Pro – 52, Leu/Ile/Val/Tyr – 59, Ser/Thr – 66, Asp/Asn/Glu – 68 e Asn/Asp – 71, além das cisteínas envolvidas nas quatro pontes dissulfeto do núcleo globular das toxinas: Cys – 03 e Cys – 26; Cys – 19 e Cys – 47; Cys – 51 e Cys – 63; Cys – 64 e Cys – 70. (FIGURA 07). NXH8 tem todos esses resíduos invariantes, o que representa 26% da similaridade total com as demais seqüências.

Já os resíduos caracteristicamente conservados apenas nas  $\alpha$  - neurotoxinas são: Lys – 29, Trp – 31, Asp – 33, His/Phe/Trp – 35, Arg/Lys – 39, Gly – 40, Glu/Asp – 44, Val/Ala – 54, Lys/Arg – 55 (ENDO & TAMIYA 1987 e 1991). NXH8 possui todos, exceto na posição 29 aonde se encontra uma treonina no lugar da lisina. Entretanto, NXH8 apresenta uma lisina na posição 28 que pode desempenhar o mesmo papel e na posição 33, NXH8 tem asparagina no lugar de aspartato. Fica evidente que NXH8 deve possuir um sítio de ligação ao nAChR similar às  $\alpha$  - neurotoxinas.

Verifica-se que os resíduos mais importantes capazes de “conferir o caráter de neurotoxicidade” à molécula estão localizados principalmente na segunda alça. Logo se percebeu uma certa analogia entre as drogas como o curare e as  $\alpha$  - neurotoxinas. Antagonistas do nAChR como a *d-Tubocurarina* e o *C - alcalóide - E* podem ter seus anéis aromáticos sobrepostos na mesma orientação das cadeias laterais dos aminoácidos presentes na ponta da segunda alça das  $\alpha$  - neurotoxinas (TAMIYA 1980; DUFTON & HIDER 1980). Uma glicoproteína do capsídeo de alguns vírus com neurotropismo, como o vírus da raiva e o HIV, também compartilham similaridades com esses aminoácidos importantes da ponta da segunda alça das  $\alpha$  - neurotoxinas das serpentes (LENTZ 1990; NERI et al., 1990). Também nas toxinas do molusco *Conus* que bloqueiam o nAChR, alguns dos resíduos “funcionais” são encontrados nas mesmas posições que nas  $\alpha$  - neurotoxinas das serpentes (ADAMS & OLIVERA 1994). Estes dados indicam que parte importante do sítio funcional de ligação ao nAChR situa-se na segunda alça da toxina. A região da segunda alça de NXH8 é pouco similar à segunda alça das neurotoxinas fracas. O mesmo ocorre, em relação às toxinas homólogas às neurotoxinas longas de *Bungarus* (veja a FIGURA 09).

## O Sítio Funcional da Erabutoxina $\alpha$ e da $\alpha$ -Cobratoxina em Comparação com NXH8

Esses resíduos ditos “funcionais” das  $\alpha$  - neurotoxinas estão todos voltados para o lado côncavo da toxina e perfazem uma superfície quase contígua de  $300 \text{ \AA}^2$  da molécula de erabutoxina  $\alpha$  (CORFIELD et al., 1989). Eles podem desempenhar papel duplo, interagindo diretamente com a superfície da subunidade  $\alpha$  do nAChR ou, sendo fundamentais para a estrutura da molécula ou para o posicionamento dos resíduos que realmente interagem com o receptor. Diversos desses resíduos tiveram seu papel funcional estudado por meio de modificações químicas das cadeias laterais (Revisto por ENDO & TAMIYA 1987 e 1991). A erabutoxina  $\alpha$  é uma  $\alpha$  - neurotoxina curta que teve seu sítio de ligação ao receptor muscular de acetilcolina totalmente delineado por mutagênese sítio dirigida (PILLET et al., 1993; TRÉMEAU et al., 1995).

Recentemente uma  $\alpha$  - neurotoxina longa ( $\alpha$  - cobratoxina) também teve o sítio funcional determinado pelo mesmo método (ANTIL et al., 1999). Os resíduos que compõem esse sítio cobrem uma área de  $880 \text{ \AA}^2$ . Como as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas bloqueiam o nAChR do *Torpedo* e do músculo de mamíferos é de se esperar que o sítio de ligação das duas toxinas compartilhem um conjunto similar de resíduos. No entanto, as  $\alpha$  - neurotoxinas longas também se ligam receptores neuronais tipo  $\alpha 7$ . Já se sabia que uma  $\alpha$  - neurotoxina longa atípica de apenas 69 resíduos e sem a ponte dissulfeto extra na ponta da segunda alça (LSIII do veneno de *Laticauda semifasciata*) liga-se apenas ao receptor muscular e não tem afinidade pelos receptores neuronais. Foi demonstrado por substituição por Alanina que as duas cisteínas, que formam a ponte dissulfeto localizada na ponta da segunda alça das  $\alpha$  - neurotoxinas longas, são as responsáveis pela capacidade de ligação aos receptores neuronais homopentaméricos (SERVENT et al., 1997; 1998). Estas cisteínas localizadas nas posições 32 e 36 estabilizam uma pequena alfa hélice essencial para a ligação ao receptor neuronal tipo  $\alpha 7$ . Os resíduos de aminoácidos importantes para a seletividade e afinidade pelos receptores tipo  $\alpha 7$  também foram elucidados por mutagênese sítio dirigida (ANTIL-DELBEKE et al., 2000).

De maneira geral, o sítio de ligação das  $\alpha$  - neurotoxinas longas por ambos os receptores se sobrepõem, compartilhando alguns aminoácidos em um núcleo comum, refletindo a semelhança que existe entre as subunidades que compõem os receptores neuronais e musculares (ANTIL-DELBEKE et al., 2000; SERVENT et al., 2000). Outros estudos de mutação sítio dirigida foram efetuados em uma  $\alpha$  - neurotoxina curta, a toxina  $\alpha$  de *Naja mossambica mossambica* (Nmm I - ACKERMANN & TAYLOR 1997;

ACKERMANN et al., 1998) e com a  $\alpha$  - neurotoxina longa,  $\alpha$  - bungarotoxina ( $\alpha$  - BGTx - ROSENTHAL et al., 1999).

Baseados nesses dados de mutação sítio dirigida, alinhamos na FIGURA 37, NXH8 com a erabutoxina a (Ea) e com a  $\alpha$  - cobratoxina ( $\alpha$ Cbt). Os resíduos “funcionais” que quando mutados causam um decréscimo na afinidade pelo receptor nicotínico muscular estão assinalados por uma escala de cores (calculada pela divisão das constantes de dissociação:  $K_d$  mutante/ $K_d$  nativo). Os resíduos que quando mutados baixam a afinidade mais de 100 vezes são indicados em vermelho. Os que reduzem a afinidade entre 10 e 100 vezes são indicados em laranja e aqueles que reduzem a afinidade entre 5 e 10 vezes são mostrados em amarelo. Alguns resíduos têm diferenças na afinidade pelos dois sítios ligantes no receptor, discriminando um sítio de alta afinidade e um sítio de baixa afinidade, respectivamente a  $\alpha\delta$  e  $\alpha\gamma$ . Todos os valores citados para os mutantes da erabutoxina a são baseados em PILLET et al. 1993 e TRÉMEAU et al., 1995, e os valores citados para os mutantes de  $\alpha$  - cobratoxina em relação ao receptor muscular e neuronal  $\alpha 7$  estão em ANTIL et al., 1999; ANTIL-DELBEKE et al., 2000 e SERVENT et al., 2000.

Os resíduos importantes são mostrados nos modelos tridimensionais de cristalografia das toxinas: erabutoxina a (Ea) e  $\alpha$  - cobratoxina ( $\alpha$ Cbt) nas figuras subsequentes. E podem ser comparados com os resíduos que são compartilhados no modelo virtual de NXH8 com ambas as moléculas. O posicionamento dos rotâmeros das cadeias lateral pode não representar o melhor ajuste, pois o modelo de NXH8 tem fins meramente ilustrativos. Analisamos cada posição no alinhamento, comparando os resíduos conservados entre Ea,  $\alpha$ Cbt e NXH8. Os mutantes apresentam indicado o número do resíduo na cadeia da toxina. Nas figuras esses números estão indicados e entre parênteses indica-se a posição absoluta no alinhamento, por nós utilizados (FIGURA 07 e/ou 37). Para efeito de comparação sempre usaremos as posições absolutas do alinhamento. Desta forma, será possível comparar com qualquer outra seqüência aqui alinhada. A seguir, detalhamos cada posição mutada na erabutoxina a e na  $\alpha$  - cobratoxina e comparamos com a mesma posição em NXH8. Esses dados devem ser acompanhados com a FIGURA 37.

### **A Primeira Alça.**

A posição 03 contém a cisteína conservada em todas as toxinas que faz ponte dissulfeto com a cisteína da posição 26. Na posição 04 encontra-se em 80% das  $\alpha$  - neurotoxinas Phe ou Tyr. NXH8 apresenta Lys nessa posição. Mutações dessa posição tanto em Ea quanto em  $\alpha$ Cbt não afetaram a afinidade pelo

receptor. A posição 06 é característica de NXH8, pois apresenta a cisteína que faz ponte dissulfeto com outra na posição 11. As  $\alpha$  - neurotoxinas típicas não apresentam essa ponte dissulfeto.

Na posição 07 é comum as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas apresentarem asparagina, tal como ocorre em NXH8. Mas mutações nessa posição em Ea também não afetaram a afinidade. A posição 08 é ocupada por fenilalanina em NXH8 e histidina em Ea. O mutante EaH06A causa um decréscimo de até seis vezes na afinidade pelo nAChR muscular. Essa redução talvez não seja devida a uma interação direta da posição 07 com a subunidade  $\alpha 1$  do receptor de acetilcolina, pois a cadeia lateral está voltada para o outro lado da molécula na Ea (FIGURA 38). Por essa razão esse resíduo é indicado em azul para NXH8 na FIGURA 37. Essa redução na afinidade pode ser devida à proximidade com resíduos muito mais importantes nessa região da alça das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, e que não estão presentes em NXH8 ou na  $\alpha$  - cobratoxina.

Na posição 09, o mutante EaQ07L tem uma afinidade pelo nAChR muscular 23 vezes menor. Na posição 10 a mutação conservativa EaS08T causa um decréscimo de 780 vezes na afinidade pelo AChR. Dependendo do sítio de ligação considerado,  $\alpha\gamma$  ou  $\alpha\delta$ , a queda na afinidade varia de 10 a 1190 vezes. Todas as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas conhecidas têm serina na posição 10. Já 80%  $\alpha$  - neurotoxinas longas apresentam Thr ou Ser na mesma posição. Tal como as  $\alpha$  - neurotoxinas longas, NXH8 apresenta uma treonina na posição 10. Entretanto, o mutante  $\alpha$ CbtT10A tem a mesma afinidade que a  $\alpha$ Cbt nativa pelo nAChR muscular. Dados de ressonância nuclear magnética indicam que a treonina da  $\alpha$  - bungarotoxina nessa mesma posição interage com o nAChR (BASUS et al., 1993). Portanto, é possível que essa treonina da posição 10 desempenhe algum papel na afinidade pelo nAChR muscular. Essa posição é indicada em azul para NXH8 na Figura 37 e em lilás no modelo da FIGURA 41.

A posição 11 é característica para NXH8 por estar presente a cisteína que faz ponte com a posição 06. A posição 12 é importante nas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, pois o mutante EaQ10A apresenta uma afinidade 210 vezes menor ao receptor. Aqui também existe seletividade por sítios de alta e baixa afinidade no nAChR (reduzindo a afinidade em 13 vezes em  $\alpha\gamma$  e 522 em  $\alpha\delta$ ). Nem NXH8 nem as  $\alpha$  - neurotoxinas longas têm resíduos equivalentes na posição 12.

Aparentemente a posição 10 é de extrema importância para as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, mas não o é para as longas. Entretanto, essa queda de 780 vezes da afinidade do mutante EaS08T tem de ser mais bem explicada uma vez que a cadeia lateral dessa serina aponta para o lado convexo da molécula e, portanto, não deve interagir com a superfície do nAChR muscular (Veja no modelo da FIGURA 38). A despeito de

serina e treonina apresentarem o mesmo grupo hidroxila, a mutação não pode ser considerada funcionalmente equivalente, uma vez que causa um decréscimo de 780 vezes na afinidade. Dados estruturais indicam que o mutante EaS08T não teve sua estrutura terciária modificada em relação à toxina nativa (TRÉMEAU et al., 1995). Na erabutoxina essa serina ocupa a posição  $i+1$  da folha  $\beta$ , ou seja, está entre as glutaminas que ocupam respectivamente, as posições  $i$  e  $i+3$  da folha  $\beta$ . Portanto, a razão dessa serina da posição 10 ser tão importante é estar entre as duas glutaminas da posição 09 e 12. Note ainda que esse resíduo não discrimina entre o sítio de alta afinidade e baixa afinidade, afetando de maneira global a afinidade da erabutoxina a pelo nAChR muscular, o que é mais um indicativo de que este resíduo não estabelece contatos com a cadeia do receptor. A treonina conservada na posição 10, presente nas  $\alpha$  - neurotoxinas longas e na NXH8 (indicado em lilás na FIGURA 41), não desempenha o mesmo papel, pois essas toxinas não apresentam as glutaminas tão importantes das posições 09 e 12.

Portanto, a Erabutoxina a mostrou de forma inusitada que seu sítio de ligação ao nAChR incluía três resíduos variantes que não eram compartilhados com as  $\alpha$  - neurotoxinas longas. Esses resíduos estão todos na primeira alça, nas posições 09, 10 e 12. Coincidentemente é a região aonde as  $\alpha$  - neurotoxinas longas exibem diversas deleções e onde NXH8 apresenta a sua ponte dissulfeto extra e duas inserções. De maneira geral, essa região tão importante para as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, não é importante para a ligação das  $\alpha$  - neurotoxinas longas ao nAChR muscular. Além disso, as  $\alpha$  - neurotoxinas longas não apresentam essa região tão ordenada quanto as curtas. Inclusive, não existe estrutura em folhas -  $\beta$  na primeira alça das neurotoxinas longas. O modelo virtual de NXH8 apresenta duas folhas  $\beta$  antiparalelas na primeira alça. Essas folhas -  $\beta$  são interrompidas pela ponte dissulfeto entre as posições 06 e 11. Desta forma, a extremidade da primeira alça de NXH8 parece ser menos ordenada e formar um ângulo em relação à direção tomada pela primeira alça das neurotoxinas curtas (FIGURAS 38, 39A e 41).

Na posição 17 encontramos resíduos carregados positivamente na maioria das  $\alpha$  - neurotoxinas. NXH8 apresenta uma arginina. Entretanto os mutantes EaK15A e  $\alpha$ CbtK12E não alteraram sua afinidade pelo receptor. A posição 19 é conservada em todas as toxinas, pois se encontra nesta posição, a cisteína que forma uma ponte dissulfeto com a cisteína 47. NXH8 e erabutoxina a tem um resíduo glutamato na posição 23, mas o mutante EaE21A não apresentou decréscimo na afinidade. Na posição 22 encontramos um resíduo de glicina invariante presente não só nas neurotoxinas como também nas citotoxinas. A posição 26 também é invariante por ser a posição da cisteína que faz ponte com a cisteína 03.

## A Segunda Alça

A posição 27 é ocupada por tirosina em NXH8 e em todas as toxinas da família. Este resíduo tem importância estrutural muito grande. O mutante  $\alpha$ CbtY21A acarreta a formação de uma proteína recombinante que não pode ser enovelada. Já o mutante conservativo  $\alpha$ CbtY21F não produz queda de afinidade pelo receptor. O mutante similar EaY25F tem 4 vezes menos afinidade pelo receptor. Dados anteriores (ENDO & TAMIYA 1991) mostravam que esta posição faz uma ponte de hidrogênio com um resíduo de Glu/Asp na posição 44 em todas as  $\alpha$  - neurotoxinas. Assim a conservação das posições 27 e 44 podem refletir um papel não somente estrutural, mas funcional, uma vez que a posição 44 só é conservada nas neurotoxinas. Assim a mutação de tirosina por fenilalanina impede a formação dessa ponte de hidrogênio entre as posições 27 e 44. Chama a atenção que este resíduo aromático é um dos que se justapõem aos anéis aromáticos da estrutura do curare. Portanto, não se descarta a hipótese de que pelo menos nas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, esse resíduo invariante também tenha um papel funcional interagindo com o nAChR muscular.

A posição 29 é ocupada por lisina em todas as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas e deve desempenhar importante papel funcional. O mutante EaK27E tem afinidade pelo receptor muscular 175 vezes menor. A afinidade pelo sítio  $\alpha\delta$  cai 350 vezes e por  $\alpha\gamma$ , 31 vezes. O mesmo tipo de mutante  $\alpha$ CbtK23E reduz a afinidade pelo receptor em 14 vezes (2 vezes pelo  $\alpha\gamma$  e 28 vezes pelo  $\alpha\delta$ ). A mesma lisina da posição 29 quando mutada para alanina em Nmm I ( $\alpha$  - neurotoxinas curta) provocou uma diminuição de 10 vezes na afinidade pelo nAChR do músculo de camundongo expresso transientemente em células HEK 293 (ACKERMANN & TAYLOR 1997) e, quando a carga é revertida pela mutação para glutamato, a constante de dissociação aumenta drasticamente (ACKERMANN & TAYLOR 1997). A mesma posição foi também mutada para alanina em  $\alpha$  - bungarotoxina. Essa mutação reduz 9 vezes a afinidade da  $\alpha$  - BGTx pelo receptor do *Torpedo* e 34 vezes a afinidade pelo receptor do músculo do camundongo, expresso em oócito (ROSENTHAL et al., 1999). Os dados de ACKERMANN et al., 1998 indicam que esta lisina da posição 29 interage com pelo menos três resíduos da subunidade  $\alpha$  do receptor de acetilcolina (Tyr190, Pro197 e Asp200) no sítio de alta afinidade  $\alpha\delta$ . NXH8 apresenta na posição 29 uma treonina, o que possivelmente deve afetar negativamente a afinidade pelo nAChR muscular. Entretanto, NXH8 também apresenta na posição 28 outra lisina (mostrado em azul na FIGURA 37). Pode ser que especialmente esta Lys28 desempenhe em NXH8 uma função análoga à Lys29 das  $\alpha$  - neurotoxinas. Este resíduo de lisina na posição 29 é o primeiro resíduo importante compartilhado pelas neurotoxinas curtas e longas. Entretanto, ele parece ter maior contribuição para a afinidade nas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas. Essas

diferenças na contribuição ao sítio de ligação também podem ser vistas observando a cor dos resíduos indicados nas FIGURAS 38 e 39A.

A posição 31 é ocupada caracteristicamente por triptofano. Todas as  $\alpha$  - neurotoxinas têm Trp31. O mutante EaW29H tem 8,6 vezes menos afinidade pelo receptor e o mutante EaW29F tem uma afinidade 67 vezes menor. Já o mutante  $\alpha$ CbtW25F tem afinidade 2,2 vezes menor e o mutante  $\alpha$ CbtW25H, 3,6 vezes menor. De modo diferente do que ocorre na erabutoxina, mutações conservativas não parecem afetar muito a afinidade da  $\alpha$  - cobratoxina pelo receptor. Entretanto, o mutante  $\alpha$ CbtW25A tem uma afinidade 11 vezes menor pelo nAChR muscular quando comparado com a toxina nativa. A mesma mutação também reduz em 6 vezes a afinidade pelo receptor neuronal tipo  $\alpha$ 7. Uma das principais diferenças entre as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e as toxinas neuronais ( $\kappa$  - neurotoxinas não se ligam ao nAChR muscular) é a presença de glutamato nessa posição. Quando a  $\kappa$  - bungarotoxina tem o glutamato dessa posição mutado para triptofano, a afinidade pelo nAChR do músculo aumenta 5 vezes (FIORDALISI et al., 1994). Na  $\alpha$ Cbt mutações conservativas da posição 31 em fenilalanina e histidina não alteram a afinidade pelo nAChR. Portanto, o papel funcional do Trp31 deve estar associado ao caráter aromático. Tanto nas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas quanto nas longas, esse resíduo aromático pode ser importante para o posicionamento dos resíduos das posições 33 e 39 quando a carga for oposta. NXH8 apresenta também triptofano na posição 31, mostrado em verde na FIGURA 37.

A posição 33 é outra das posições que apresenta um resíduo de aspartato conservado apenas nas  $\alpha$  - neurotoxinas. O mutante EaD31H tem 46 vezes menos afinidade pelo nAChR muscular (1,57 vezes menos pelo sítio  $\alpha\gamma$  e 284 vezes menos afinidade pelo  $\alpha\delta$ ). O mutante  $\alpha$ CbD27R tem 31 vezes menos afinidade pelo nAChR; já pelo receptor  $\alpha$ 7 a afinidade cai 50 vezes. Note que essa posição desempenha papéis diferentes na erabutoxina e na  $\alpha$  - cobratoxina no que diz respeito à seletividade pelo sítio de alta e baixa afinidade. Nas neurotoxinas longas o resíduo não discrimina os dois sítios. NXH8 apresenta uma asparagina nessa posição, mostrada em verde na FIGURA 37. As mutações conservativas substituindo aspartato por asparagina tanto na erabutoxina quanto na  $\alpha$  - cobratoxina não afetaram a afinidade pelo nAChR.

Na posição 35 as  $\alpha$  - neurotoxinas apresentam um resíduo aromático conservado (His, Phe ou Trp). Histidina é mais freqüente nas neurotoxinas curtas e fenilalanina nas longas. Entretanto, algumas poucas  $\alpha$  - neurotoxinas apresentam treonina nesta posição (MEBS & CLAUS, 1991). NXH8 apresenta uma histidina nessa posição, mostrada em verde na FIGURA 37. O mutante EAF32L tem uma afinidade

7 vezes menor pelo nAChR muscular e o mutante  $\alpha$ CbtF29L, uma afinidade 12 vezes menor. Já pelo receptor  $\alpha$ 7, o mutante  $\alpha$ CbtF29A apresenta uma afinidade 74 vezes menor.

A extremidade da segunda alça nas  $\alpha$  - neurotoxinas longas é peculiar devido a presença de duas cisteínas que fazem uma ponte dissulfeto entre as posições 32 e 36 (Veja a FIGURA 39B e 40). Esta ponte estabiliza uma pequena alfa – hélice na ponta da segunda alça das neurotoxinas longas que está implicada na seletividade e afinidade pelo receptor neuronal homopentamérico  $\alpha$ 7. As  $\alpha$  - neurotoxinas curtas não reconhecem esses receptores neuronais. Quando essa ponte é reduzida ou as cisteínas são mudadas para serinas, a afinidade pelo nAChR muscular não é alterada. Mas a afinidade pelo receptor neuronal tipo  $\alpha$ 7 cai 14 vezes. Ainda implicado na afinidade pelo  $\alpha$ 7 está uma alanina na posição 34. O mutante  $\alpha$ CbtA28G tem 6 vezes menos afinidade pelo receptor que a toxina nativa. Note-se que as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas tem uma deleção nessa posição, mas NXH8 apresenta uma treonina.

A posição 39 é ocupada por arginina nas  $\alpha$  - neurotoxinas, apenas uma neurotoxina longa apresenta uma lisina no lugar. NXH8, Ea e  $\alpha$ Cbt, apresentam arginina nesta posição. O mutante EaR33K tem 25 menos afinidade pelo nAChR muscular, o mutante EaR33E tem uma afinidade 318 vezes menor. A afinidade pelo sítio  $\alpha\gamma$  cai 11 vezes e a afinidade pelo  $\alpha\delta$  cai 690 vezes. O mutante EaR33Q tem uma afinidade 187 vezes menor. De maneira similar, esta posição é crítica para a Nmm I (ACKERMANN & TAYLOR 1997). A mesma posição, quando mutada na  $\alpha$  - bungarotoxina para alanina, causa um decréscimo na afinidade pelo nAChR do *Torpedo* de 90 vezes (ROSENTHAL et al., 1999). Na  $\alpha$  - cobratoxina esta posição parece ser fundamental. O mutante  $\alpha$ CbtR33E tem uma afinidade 767 vezes menor pelo nAChR e 339 vezes pelo  $\alpha$ 7. É digno de nota que quando a  $\kappa$  - bungarotoxina (toxina neuronal) tem essa arginina mutada para alanina, a capacidade de ligação ao receptor ganglionar do subtipo  $\alpha$ 3 $\beta$ 2 é perdida (FIORDALISI et al., 1994). Na Nmm I essa arginina, juntamente com a lisina da posição 29, interage com a valina-188 da subunidade  $\alpha$ 1 do receptor (ACKERMANN et al., 1998). A importância deste resíduo confirma a suposição de KARLSSON (1979) de que ela mimetize o amônio quaternário da acetilcolina, ocluindo o sítio de ligação da acetilcolina no receptor. A FIGURA 37 mostra esse resíduo em verde para NXH8.

A posição 40 é ocupada por uma glicina em todas as  $\alpha$  - neurotoxinas. Este resíduo, quando mutado na erabutoxina para uma serina, provoca uma queda de 7 vezes na afinidade pelo receptor. No entanto, esse mutante tinha grandes distorções conformacionais. O seu papel deve ser estrutural. A posição 41 não é importante para a ligação ao nAChR muscular, mas o mutante  $\alpha$ CbtK35A tem uma afinidade pelo

$\alpha 7$  11 vezes menor. Entretanto a cadeia lateral deste resíduo aponta para o lado convexo da molécula. (FIGURA 39B). NXH8 tem leucina nesta posição.

A posição 42 é ocupada arginina ou lisina em algumas  $\alpha$  - neurotoxinas. O resíduo é especialmente conservado nas neurotoxinas longas. NXH8 apresenta arginina nesta posição, assim como a  $\alpha$  - cobratoxina. Já a erabutoxina a, tal como muitas das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, apresenta uma isoleucina nesta posição. O mutante  $\alpha$ CbtR36A tem uma afinidade 7,5 vezes menor pelo AChR e 16 vezes menor pelo receptor neuronal  $\alpha 7$ . De forma interessante, o mutante Eal36R tem a afinidade pelo nAChR aumentada em 7 vezes. Esse resíduo que quando é mutado em arginina causa um incremento na afinidade, está indicado para a erabutoxina em lilás no alinhamento da FIGURA 37 e também no modelo da FIGURA 38. A posição está indicada em verde para NXH8 na FIGURA 37.

A posição 44 apresenta aspartato ou glutamato nas  $\alpha$  - neurotoxinas. NXH8 e  $\alpha$  - cobratoxina apresentam aspartato e a erabutoxina a apresenta glutamato. O mutante Eae38Q tem a mesma afinidade pelo receptor que a toxina nativa, indicando que a carga negativa não é essencial. Já o mutante Eae38L tem uma afinidade 25 vezes menor. Possivelmente, esta posição faz uma ponte de hidrogênio com a tirosina da posição 27 (ENDO & TAMIYA 1991). Entretanto, o mutante  $\alpha$ CbtD38L tem a afinidade reduzida em somente 2,6 vezes e o mutante  $\alpha$ CbtD38N não tem alteração na afinidade. Isto indica que a carga não é essencial. No caso da  $\alpha$  - bungarotoxina, quando o glutamato desta posição é mutado em alanina também não ocorrem alterações de afinidade pelo receptor (ROSENTHAL et al., 1994). Já o mutante  $\alpha$ CbtD38R, em que se introduz uma reversão da carga, tem um decréscimo importante de 35 vezes na afinidade. Isto parece indicar que a posição 44 tem alguma interação com o receptor, ainda que não se possa explicar como. Por essa razão, a importância do resíduo desta posição é indicada como duvidosa para  $\alpha$  - cobratoxina e mostrada em azul no alinhamento da FIGURA 37 e em lilás no modelo da FIGURA 39A. Para NXH8 este resíduo é indicado em verde na FIGURA 37.

A posição 46 é ocupada por uma glicina conservada em todas as toxinas da família é um resíduo invariante estrutural. A posição 47 também apresenta a cisteína que faz ponte com a posição 19. A região das posições de 48 a 50 distingue as  $\alpha$ - neurotoxinas curtas e longas. As curtas têm apenas um resíduo de glicina na posição 48 e as longas, o triploto Ala-Ala-Thr. Obviamente esta diferença não tem implicações na afinidade pelo receptor de acetilcolina.

### A Terceira Alça

A posição 51 é ocupada pela cisteína conservada em todas as toxinas e faz ponte dissulfeto com a posição 63. A posição 52 é ocupada por prolina na maioria das toxinas da família. O mutante EaP44V tem uma queda na afinidade pelo receptor de 3 vezes. Este resíduo não faz contato com o receptor, mas a mutação pode distorcer a estrutura da toxina. A posição 54 é especialmente conservada nas  $\alpha$  - neurotoxinas e muitas apresentam treonina e valina nas posições 53 e 54. Porém, mutações nessas posições não afetam a afinidade pelo nAChR muscular.

A posição 55 é ocupada por lisina ou raramente arginina nas  $\alpha$  - neurotoxinas. O mutante EaK47A teve a afinidade pelo receptor reduzida em 32 vezes. O mutante EaK47E teve um decréscimo na afinidade de 176 vezes. Esta posição também discrimina os dois sítios ligantes  $\alpha\gamma$  e  $\alpha\delta$ , a afinidade cai respectivamente 11 e 313 vezes. Da mesma maneira, este resíduo é importante na  $\alpha$  - neurotoxina Nmm I (ACKERMANN et al., 1998). Já na  $\alpha$  - cobratoxina, a mutação da lisina em glutamato reduz a afinidade em 29 vezes, sendo que a afinidade pelo sítio  $\alpha\gamma$  cai 3 vezes e pelo sítio  $\alpha\delta$  cai 52 vezes. Este resíduo, entretanto, não é importante para a ligação ao receptor  $\alpha 7$ . NXH8 também tem esta lisina na posição 55, que está indicada em verde na FIGURA 37. Este é o único resíduo importante, tanto para as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas, presente na terceira alça.

Os demais resíduos entre as posições 56 a 72, quando parecem ser conservados apenas nas  $\alpha$  - neurotoxinas, não mostram diferenças na afinidade pelo receptor quando mutados. Outros que são muito conservados, como Leu/Ile/Val/Thr59, Ser/Thr66, Asp/Asn/Glu68, têm papel eminentemente estrutural e não têm interação com o nAChR muscular. Mas quando mutados distorcem a conformação da molécula. Fazem parte dessa região a cisteína da posição 63 que faz ponte com a posição 51 e as cisteínas das posições 64 e 71, também envolvidas na formação de uma ponte dissulfeto.

### A Cauda C-terminal.

A posição 73 situada na cauda C-terminal das  $\alpha$  - neurotoxinas longas não tem correspondente em NXH8 e nas  $\alpha$  - neurotoxinas curtas. Entretanto, contribui para a ligação da  $\alpha$  - cobratoxina ao nAChR do músculo e ao neuronal  $\alpha 7$ . O mutante  $\alpha$ CbtF65A tem a afinidade reduzida cerca de 7 vezes pelo nAChR e 16 vezes pelo  $\alpha 7$ .

### Resíduos Importantes para Ligação ao nAChR Muscular.

Em resumo, levando em conta as posições absolutas do alinhamento, na erabutoxina a e provavelmente para as demais  $\alpha$  - neurotoxinas curtas, 10 aminoácidos são importantes para a afinidade ao receptor de acetilcolina do músculo ou do órgão elétrico do *Torpedo*. Pela ordem de importância essas posições são:

Ser10 > Arg39 > Gln12 > Lys29  $\geq$  Lys55 > Trp31 > Asp33 > Glu44  $\geq$  Gln09 > Phe35.

Entretanto, a posição 42 na erabutoxina pode ser mutada para arginina e aumentar a afinidade, razão pela qual é mostrada em lilás na FIGURA 38. Os resíduos aromáticos das posições 08 e 27 ainda que quando mutados causam reduções de 4 e 6 vezes na afinidade pelo receptor, não interagem diretamente com ele, pois suas cadeias laterais apontam para a face convexa da molécula. Entretanto, como seu papel foi discutido anteriormente, são mostrados em amarelo na FIGURA 38.

Oito resíduos são importantes para a ligação da  $\alpha$  - cobratoxina ao nAChR muscular. As posições, pela ordem de importância são:

Arg39 > Lys55 > Asp33  $\geq$  (Asp44) > Lys29 > Phe35  $\geq$  Trp31 > Arg42  $\geq$  Phe65.

A posição 44 é dúbia e parece ser mais importante para as curtas. Somente uma total reversão de carga é capaz de diminuir a afinidade pelo receptor, por isso está indicado em lilás na FIGURA 39A.

Portanto, as  $\alpha$  - neurotoxinas longas e curtas compartilham um núcleo comum de aminoácidos importantes para a ligação ao receptor muscular. As posições importantes são: Lys29; Asp33; Arg39; Lys55. Menos importantes são Trp31 e Phe35. As principais diferenças entre as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas é quanto à presença de uma arginina na posição 42, que parece não importar nas neurotoxinas curtas, mas tem implicações para as neurotoxinas longas. A presença de Asp/Glu na posição 44 parece ser mais importante para neurotoxinas curtas que para as longas. Mas a diferença fundamental diz respeito à primeira alça. Na  $\alpha$  - cobratoxina e provavelmente nas demais longas, a primeira alça é indiferente a mutação e não parece interagir com o receptor. Já para as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas a primeira alça é crítica. Em compensação a cauda C-terminal das  $\alpha$  - neurotoxinas longas parece ser importante para a ligação ao receptor.

## **NXH8 tem os Principais Resíduos do Sítio Funcional de Ligação das $\alpha$ - Neurotoxinas ao nAChR**

NXH8 tem todos os resíduos do núcleo principal para a ligação ao nAChR muscular, importantes tanto para as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas quanto para as  $\alpha$  - neurotoxinas longas. Essas posições são:

Lys28; Trp31; Asn33; His35; Arg39; Arg42; Asp44 e Lys55.

Esses resíduos são destacados em vermelho na FIGURA 41. Na primeira alça de NXH8 é indicado em lilás a treonina – 10, que está em posição análoga à das  $\alpha$  - neurotoxinas longas e pode interagir com o nAChR muscular (BASUS et al., 1993). As  $\alpha$  - neurotoxinas curtas têm serina nesta posição entre as glutaminas que são críticas para a ligação ao nAChR muscular. Entretanto, tal como as  $\alpha$  - neurotoxinas longas, NXH8 não apresenta os resíduos da primeira alça que são especificamente importantes para as curtas. Também não apresenta o resíduo específico da cauda C-terminal das  $\alpha$  - neurotoxinas longas. Por outro lado, NXH8 apresenta a arginina da posição 42, que aumenta a afinidade das curtas pelo receptor e está presente nas longas. Apresenta também aspartato na posição 44, que tem papel relevante nas curtas, mas não parece ser importante nas longas. Assim, NXH8 parece ter características compensatórias nessas posições. Na posição 33 mutações conservativas substituindo aspartato por asparagina não afetam a afinidade pelo nAChR. Se a lisina da posição 28 de NXH8 puder desempenhar o mesmo papel daquela presente na posição 29 das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas, teremos um total oito cadeias laterais similares às encontradas nas  $\alpha$  - neurotoxinas.

Estas evidências podem explicar porque o soro anti – rNXH8 é capaz de bloquear a ligação das  $\alpha$  - neurotoxinas do veneno de *M. corallinus* ao nAChR. Uma vez que o sítio funcional de ligação ao receptor é compartilhado por NXH8 e por outras  $\alpha$  - neurotoxinas, sejam elas longas ou curtas, é provável que existam nesse soro, anticorpos capazes de ligarem-se a esse epítipo composto principalmente por aminoácidos da segunda alça dessas toxinas. Esses anticorpos, ao se ligarem nessa região impedem a interação com o receptor de acetilcolina de maneira eficiente.

Pelas mesmas razões, é possível que a própria NXH8 se ligue ao nAChR muscular como fazem as outras  $\alpha$  - neurotoxinas. É possível também que NXH8 se ligue a receptores neuronais tipo  $\alpha 7$ . Ainda que faltem as características fundamentais da extremidade da segunda alça das  $\alpha$  - neurotoxinas longas que conferem a propriedade de ligação ao  $\alpha 7$ , boa parte do sítio funcional de ligação é comum a ambos os receptores (SERVENT et al., 2000). Isso é facilmente observado na FIGURA 40. Seis resíduos na  $\alpha$  -

coبراتoxina quando mutados causam sensível decréscimo na afinidade tanto pelo nAChR de *Torpedo* quanto pelo receptor neuronal homopentamérico tipo  $\alpha 7$ . Os resíduos que afetam a afinidade por ambos os receptores com igual potência estão nas posições Trp31; Asp33 e Arg39 no alinhamento e também estão presentes em NXH8. Estes resíduos são mostrados em vermelho no modelo da FIGURA 40. Os outros três resíduos afetam a afinidade pelo receptor  $\alpha 7$  com mais intensidade que no nAChR e são os das posições Phe35, Arg42 e Phe73, que estão mostrados em roxo no modelo. O último é um resíduo da cauda C-terminal e, portanto não está presente em NXH8. Dois resíduos da  $\alpha$  - cobratoxina discriminam dois sítios de alta e baixa afinidade pelo nAChR. Isto é uma evidência de que esses resíduos não estão implicados no reconhecimento de receptores neuronais formados por uma única subunidade, como é o caso do  $\alpha 7$ . Estes resíduos são as lisinas que ocupam as posições 29 e 55. Não afetam a ligação ao  $\alpha 7$  e são mostradas em amarelo no modelo da FIGURA 40. NXH8 também possui ambos os resíduos. Estes resíduos são importantes para que o sítio de baixa afinidade  $\alpha\gamma$  seja reconhecido. Os resíduos que estão envolvidos na seletividade pelo  $\alpha 7$  são mostrados em azul no modelo da FIGURA 40. Note que a lisina da posição 41 e as cisteínas envolvidas na ponte dissulfeto entre as posições 32 - 36 têm suas cadeias laterais apontando para a face convexa da toxina que não é considerada funcionalmente importante para a interação com o nAChR muscular (PILET et al., 1993; TRÉMEAU et al., 1995; ACKERMANN & TAYLOR, 1997; ANTIL et al., 1999). Esta é uma das principais diferenças entre as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas. NXH8 não apresenta essa pequena alfa – hélice, nem essa ponte dissulfeto e a leucina na posição 41. Entretanto, na posição 34, de modo diferente das  $\alpha$  - neurotoxinas curtas que tem uma deleção, NXH8 tem uma treonina no lugar da alanina presente nas  $\alpha$  - neurotoxinas longas. Portanto, um sítio funcional de ligação e seletividade por um receptor colinérgico pode ser bastante similar.

Recentemente, UTKIN et al., 2001 relataram que uma neurotoxina fraca (TXWW NAJKA “*Weak neurotoxin tryptofan-containing*” de *Naja kaouthia*) é um antagonista atóxico dos receptores neuronais  $\alpha 7$  e do nAChR muscular. Essa toxina fraca tem 300 vezes menos afinidade pelo nAChR muscular quando comparada com a neurotoxina longa  $\alpha$  - cobratoxina. O mesmo ocorre quando comparada com uma neurotoxina curta de *Naja oxiana* (neurotoxina Nox II). As  $\alpha$  - neurotoxinas competem com I<sup>125</sup> -  $\alpha$  - bungarotoxina pelo receptor em concentrações na ordem de nmol/L ( $10^{-9}$  mol/L). A TXWW NAJKA em concentrações da ordem de  $\mu$ .mol/L ( $10^{-6}$  mol/L). Entretanto, a toxina fraca foi capaz de se ligar a subunidade  $\alpha 7$  expressa em *E. coli* com afinidade comparável com a  $\alpha$  - cobratoxina, respectivamente 4,3 e 9,1  $\mu$ .mol/L. Já a neurotoxina curta Nox II não se liga ao receptor  $\alpha 7$  mesmo em concentrações superiores a 100  $\mu$ mol/L. Além disto, a TXWW NAJKA foi capaz de inibir os receptores musculares

nicotínicos de rato e  $\alpha 7$  humano expressos em oócitos de *Xenopus* na concentração de 8,3  $\mu\text{mol/L}$ . Com uma eficiência levemente maior inibiu os receptores tipo  $\alpha 7$  de rato. As neurotoxinas longas como  $\alpha$ -cobrotoxina e  $\alpha$ -bungarotoxina inibem esses receptores em concentrações de 10  $\text{nmol/L}$ . Mas a capacidade de inibição desses receptores por TXWW NAJKA é comparável à exibida pela toxina Iml do molusco *Conus imperialis*. Por outro lado, a ligação de Iml ao receptor  $\alpha 7$  é facilmente revertida, enquanto a ligação de TXWW NAJKA mantém o bloqueio por mais de 1 hora, de maneira similar às  $\alpha$ -neurotoxinas longas. Este dado parece implicar que a TXWW NAJKA tem heterogeneidade conformacional. Essa mudança na conformação de TXWW NAJKA pode ser induzida antes ou após a ligação ao receptor.

Verificou-se que essa toxina (TXWW NAJKA) interage com  $\alpha 7$  de maneira similar às  $\alpha$ -neurotoxinas longas, ainda que com afinidade 100 vezes menor. Entretanto, essa toxina não tem a quinta ponte dissulfeto que estabiliza a alfa – hélice da ponta da segunda alça, essencial para que as  $\alpha$ -neurotoxinas longas reconheçam o receptor  $\alpha 7$  (SERVENT et al., 1997) e para que as  $\kappa$ -neurotoxinas reconheçam o receptor  $\alpha 3\beta 2$  (GRANT et al., 1998). Não existe alfa hélice na estrutura cristalográfica da bucandina (KUHN et al., 2000) nem na estrutura dinâmica da candoxina (PARVARTHY et al., 2001). Entretanto, uma hélice está presente em CD59 só que na terceira alça. Lynx-1 tem uma pequena hélice na ponta da primeira alça, mas esse dado se baseia apenas em modelagem, já que não existem dados de ressonância ou cristalografia (MIWA et al., 1999).

Outra neurotoxina com o mesmo padrão estrutural (XXX9 NAJAT, NNA2 ou TA-NA9 de *Naja atra*) também foi funcionalmente caracterizada (CHANG et al., 2000a). Essa toxina mostrou-se efetiva em bloquear nAChRs musculares de sapo de maneira comparável com a  $\alpha$ -neurotoxina curta cobrotoxina de *Naja atra* (NXS1 NAJAT). A XXX9 NAJAT inibe os receptores e bloqueia a contração muscular em concentrações de 1  $\mu\text{mol/L}$ . A cobrotoxina faz o mesmo em concentrações de 0,7  $\mu\text{mol/L}$ . O modelo estrutural de XXX9 e os dados de dicróismo circular mostraram que a sua estrutura é menos rica em folhas  $\beta$ -pregueadas. A molécula é menos ordenada e deve apresentar heterogeneidade conformacional que pode ter implicações na sua atividade biológica.

A candoxina (CADO BUNCA) também parece se ligar aos nAChRs do músculo esquelético de galinhas e bloquear a transmissão do impulso colinérgico na junção neuromuscular (NIRTHANAN et al., 2001). Por outro lado, os mesmos autores reportam que a candoxina pode agir em sinergia com uma acetilcolinesterase.

Quando NXH8 é comparada com essas neurotoxinas fracas, verificamos que a principal diferença está na região da segunda alça. Enquanto NXH8 tem vários resíduos idênticos ou similares nas mesmas posições que os aminoácidos que desempenham papel funcional no sítio de ligação das  $\alpha$  - neurotoxinas pelo nAChR, essas neurotoxinas fracas não apresentam a maioria desses resíduos. A presença destes resíduos na seqüência de NXH8 a distingue das neurotoxinas fracas das *Najas* e dos demais homólogos de neurotoxinas longas encontrados nos venenos de serpentes do gênero *Bungarus*.

No mesmo veneno de *Naja atra* é encontrada uma seqüência homóloga com a qual, XXX9 NAJAT compartilha 66,2% de similaridade, mas cuja atividade neurotóxica desse homólogo é 4 vezes menos potente (4  $\mu$ mol/L). Tanto em XXX9 quanto TXWW as características das  $\alpha$  - neurotoxinas longas ou curtas estão faltando. As diferenças no que diz respeito principalmente à segunda alça são pronunciadas. Parece, portanto, que a especificidade e seletividade de uma toxina com estrutura em três dígitos não depende apenas da natureza química (carga e hidrofobicidade) e distribuição de grupos funcionais, mas depende também da conformação e da mobilidade conformacional das alças que compõem o padrão estrutural em três dígitos. Talvez esta estrutura menos ordenada sujeita a mudanças conformacionais seja importante para que uma gama maior de subtipos de receptores de acetilcolina possa ser reconhecida. Isto pode ter relação com o tipo de presa comum na dieta da serpente.

Chama a atenção o fato de que XXX9 seja capaz de bloquear o receptor do músculo do sapo tão bem quanto uma neurotoxina curta. A baixa toxicidade neste caso seria apenas em relação ao receptor muscular de mamíferos. Isto pode refletir uma seletividade pelo receptor de acetilcolina da presa, uma vez que os receptores musculares nicotínicos de acetilcolina entre as espécies, apesar de homólogos, não são totalmente similares quanto à seqüência de resíduos de aminoácidos. Com freqüência os ensaios toxinológicos são realizados em camundongos por serem animais fáceis de manter, apresentarem várias linhagens com fins diversos e porque muitas serpentes predam roedores. Entretanto, para serpentes de dieta especializada que predam anfíbios, peixes, aves, lagartos e outras serpentes, as características toxinológicas, farmacológicas ou fisiológicas de seus venenos podem ser obscurecidas ao fazerem-se ensaios em roedores que não são a presa habitual da dieta da serpente. Isto é particularmente verdade no caso de elapídeos. Algumas dessas serpentes podem ter dietas muito especializadas. Assim *Bungarus multicinctus* é uma cobra de hábitos semi - fossoriais que se alimenta exclusivamente de outras serpentes. *Naja naja* tem uma alimentação eclética constituída de roedores, lagartos, sapos, rãs e aves. Já *Naja sputatrix* se alimenta apenas de anfíbios e lagartos. *Laticauda semifasciata* alimenta-se exclusivamente de peixes (LIM & LEE 1989).

MARQUES & SAZIMA, 1997 relatam que a dieta de *M. corallinus* é especializada. 69,3 % da dieta é composta por Anfisbenídeos, principalmente o lagarto ápode *Leposternon microcephalum* (51,1%). Entretanto, *M. corallinus* também se alimenta de anfíbios gimnofionos do gênero *Caeciliidae* (9,6%), outros lagartos (12,6%) e serpentes (8,5%). É possível também que *M. corallinus* prede pequenos mamíferos neonatos que ainda não formaram completamente a sua estrutura óssea e por essa razão não existam registros desse conteúdo estomacal.

Recentemente, JORGE da SILVA & AIRD 2001 compararam a toxicidade dos venenos brutos de 15 espécies de corais. A toxicidade foi calculada para camundongos e para as presas mais comuns da dieta dessas serpentes. Os venenos mostraram-se mais tóxicos para as espécies de presas normalmente encontradas na dieta do que para outras espécies que não são as presas normais da dieta da cobra. Assim sendo, o veneno de *M. corallinus* tem para camundongos uma  $LD_{50} = 0,2 \mu\text{g/g}$  (i.m.) e  $0,04 \mu\text{g/g}$  (i.v.). Já para *Amphisbaena cunhai* a  $LD_{50} = 0,06 \mu\text{g/g}$  (i.m.) e  $0,04 \mu\text{g/g}$  (i.p.). De todas as espécies de *Micrurus* estudadas, o veneno de *M. corallinus* é o mais tóxico para camundongos, mas é 3 vezes mais potente para a presa natural da sua dieta, como é o caso dos anfisbenídeos (lagartos ápodes fósórios). O veneno de *M. corallinus* é 2,5 a 20 vezes mais tóxico para camundongos que os venenos das outras *Micrurus*. Para anfisbenídeos o veneno de *M. corallinus* é 5 a 10 vezes mais potente que os venenos das outras *Micrurus*. Caracteristicamente, *M. corallinus* é a única espécie de *Micrurus* que se alimenta de lagartos, anfíbios e serpentes. Portanto, seu veneno deve conter uma miscelânea de toxinas capazes de cobrir os receptores alvos em presas tão diversas. Talvez por essa razão seu veneno seja tão tóxico para mamíferos como camundongos, não porque estes sejam presas habituais, mas porque o veneno de *M. corallinus* é uma mistura de diversas toxinas. Com relação aos hábitos alimentares, toxicidades específicas para as presas e perfis enzimáticos, as espécies de *Micrurus* se dividem em 5 grupos principais. Segundo JORGE da SILVA & AIRD 2001, as corais aquáticas que se alimentam de peixes como *M. surinamensis* formam um grupo em separado. Seis populações de *M. lemniscatus* também formam um grupo em separado que se subdividem em corais que predam outras serpentes e anfisbenas e aquelas que se alimentam de anfisbenas e peixes. O terceiro grupo, o qual é relacionado ao veneno de *Naja naja*, é formado pelas serpentes que se alimentam de anfisbenídeos e serpentes (é formado por diversas populações de *M. pyrrhocryptus*, *M. brasiliensis*, *M. frontalis*). Outro grupo é aliado ao veneno de *Bungarus multicinctus* e é composto pelas espécies de *Micrurus* que se alimentam apenas de serpentes (*M. ibiboboca*, *M. spixii*, *M. altirostris*, *M. nigrocinctus* e *M. baliocoryphus*). O quinto grupo é composto de serpentes cujos venenos que se mostram muito peculiares e não podem ser ajustados a nenhum outro. Este inclui *M. fulvius* (EUA), *M. albicinctus* e *M. corallinus*. Estes dados também confirmam que o veneno de *M. corallinus* tem características únicas que não são compartilhadas com as outras serpentes do gênero.

É possível que NXH8 seja capaz de reconhecer e bloquear com alta seletividade e afinidade algum subtipo de receptor específico da ordem *Squamata* e/ou da ordem *Anura*. Entretanto, ainda que baseado em modelo, a estrutura de NXH8 parece ser bastante ordenada e rica em pontes  $\beta$  - pregueadas de maneira bastante similar às  $\alpha$  - neurotoxinas curtas. Portanto, não deve ter a heterogeneidade conformacional observada nas duas neurotoxinas fracas analisadas (XXX9 e TXWW). O modelo de NXH8 sugere uma estrutura rica em folhas  $\beta$  - pregueadas que fixam e orientam o posicionamento de diversos resíduos responsáveis por interações proteína / proteína e, portanto, deve ser seletivo para um alvo específico. Ainda que não existam evidências, é possível também que NXH8 forme até mesmo dímeros funcionais orientados em sentidos opostos pela folha  $\beta$  longa que se estende na terceira alça. O fato de que NXH8 possui os mais importantes resíduos funcionais do sítio de ligação das  $\alpha$  - neurotoxinas ao nAChR muscular é uma forte evidência que atue em um receptor de acetilcolina. As evidências do ensaio de ligação do veneno com o soro anti - rNXH8, demonstram claramente que NXH8 elicit a formação de anticorpos que reconhecem e neutralizam as  $\alpha$  - neurotoxinas do veneno de *M. corallinus* que bloqueiam o nAChR muscular em mamíferos. Possivelmente, NXH8 deve se ligar ao nAChR do músculo esquelético de mamíferos com maior seletividade e afinidade que as neurotoxinas fracas. Isso não impede que NXH8 seja capaz de reconhecer outro alvo específico, principalmente em outras espécies de presas.

Nosso trabalho mostra, que o uso de técnicas de biologia molecular para a caracterização bioquímica de venenos é uma abordagem promissora, principalmente quando o componente tóxico nunca foi isolado no veneno. Inúmeros dados podem ser obtidos já da seqüência primária de uma espécie molecular. A função de uma toxina desconhecida pode ser predita alinhando essa seqüência com outras que estão bioquimicamente caracterizadas. A divisão de uma família em subtipos pode ser acompanhada por uma análise filogenética baseada nas propriedades físico – químicas dos aminoácidos. Em geral, os subtipos funcionais correlacionam com os ramos dessa árvore. Isto é particularmente verdade quando diversos aminoácidos bem conhecidos conferem especificidade funcional, enquanto os resíduos estruturais são muito conservados. Essa abordagem pode refletir apuradamente a função dos subtipos em um grupo. E predizer assim a potencial caracterização funcional de toxinas desconhecidas norteando futuros ensaios experimentais.

As técnicas de biologia molecular também permitem que se possa produzir produtos em quantidade que antes eram difíceis de ser trabalhados devido às escassas quantidades de material bruto. Possibilitam também a manipulação da seqüência introduzindo deleções, inserções ou a substituição de qualquer resíduo específico na toxina a fim de criar novos variantes com nova seletividade e propriedades. Pode

inclusive, transformar toxinas em ferramentas úteis de laboratório para serem utilizadas em neurologia, fisiologia e até mesmo em processos biotecnológicos. Devido à alta seletividade e afinidade pelos seus alvos as toxinas podem ser usadas para localizar e discriminar esses alvos. Acopladas a proteínas diversas em forma de fusão, podem adquirir propriedades úteis e atuar como moléculas – repórteres, capazes de serem usadas em diversos ensaios de ligação e reconhecimento de outras espécies moleculares e até mesmo substituir ensaios radiativos (GILLET et al., 1992).

Além disso, a caracterização molecular das toxinas é importante para entendermos seus mecanismos de ação e pode ainda contribuir para gerar um soro contra o veneno de *M. corallinus* de melhor qualidade e especificidade. O atual soro policlonal contém anticorpos dirigidos contra todos os componentes do veneno, sejam eles tóxicos ou não. Soros mais específicos tem maior potência, reduzindo os efeitos colaterais associados com a soroterapia (MÉNEZ, 1991). Podemos verificar que é possível usar produtos recombinantes para produzir anticorpos neutralizantes específicos para os constituintes tóxicos do veneno. Conhecer quais são esses constituintes e quais suas funções no veneno é importante para planejar quais antígenos devem ser usados para produzir soros neutralizantes eficientes. A biologia molecular das toxinas permite ainda atenuar os efeitos tóxicos sem que se percam as propriedades imunogênicas, transformando toxinas em toxóides (FROMEN-ROMANO et al., 1997) que são mais facilmente manipulados e aumentam a vida útil dos animais imunizados para a produção de soro.

Este parece ser o caso da proteína NXH8 recombinante expresso como toxóide pela construção pRSETC-nxh8M. Representa um resultado importante deste trabalho, do ponto de vista biotecnológico, para o Instituto Butantan.

No caso específico de NXH8 e toxinas similares como NXH1, importa elucidar suas funções biológicas. Em geral os alvos fisiológicos das toxinas carecem de antagonistas seletivos e de alta afinidade capazes de distinguirem novos subtipos de receptores. Caracterizar novas toxinas pode trazer avanços importantes e insuspeitados nos mais diversos campos. Isto é particularmente real no caso das toxinas em forma de três dígitos, que mostra ser um padrão estrutural apto a suportar as mais diversas variações nas atividades funcionais.

Este padrão estrutural revela-se parte de uma abrangente família não apenas de toxinas de serpentes, mas também de diversos receptores celulares como o CD59 que se liga a proteínas do complemento inibindo o complexo lítico (FLETCHER et al., 1994), ou o receptor para o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (PLOUG & ELLIS, 1994) ou, ainda, a classe de antígenos Ly-6, que são expressos em muitas células do sistema imune e participam de inúmeros processos de adesão e reconhecimento,

ativação de linfócitos e migração de leucócitos (GUMLEY et al., 1995; HANNINEN et al., 1997). Portanto, novas funções com importantes implicações fisiológicas podem ser reveladas. É o caso do peptídeo neuromodulador Lynx-1 (MIWA et al., 1999) ou da proteína de olfação ODR-2 (CHOU et al., 2001).

Tais moléculas com estrutura em três dígitos podem revelar novos subtipos de receptores, tal como vem acontecendo com as toxinas muscarínicas (BRADLEY, 2000; JERUSALINSKY et al., 2000). Novas atividades até então inauditas podem surgir como a atividade pré – sináptica de bucandina (KUHN et al., 2000). O sistema colinérgico está implicado em importantes funções, incluindo memória, atenção, aprendizado, ciclos de vigília e sono (CHANGEUX et al., 1998), perda da função colinérgica central desempenha papel importante no declínio cognitivo associado à idade e a doenças degenerativas com o Alzheimer (GEULA, 1998). Assim, a descoberta de novas toxinas com afinidade por novos receptores de acetilcolina sempre terá alto impacto, o que torna excitante e recompensador trabalhar em um campo com tão vastos horizontes.



## CONCLUSÕES

1. A proteína NXH8 pode ser expressa apenas na forma madura em *E. coli* e pode ser purificada usando-se cromatografia em Ni<sup>2+</sup> – Sepharose.
2. NXH8 é uma toxina da Família de Três Dígitos expressa na glândula de veneno *M. corallinus* reconhecida pelo soro anti – elapídico do Instituto Butantan.
3. rNXH8 pode ser utilizada como antígeno em camundongos produzindo anticorpos que reconhecem NXH8 e que tem reatividade cruzada com rNXH1 e vice versa em ELISA e Western Blot.
4. O soro anti – rNXH8 contém anticorpos que reconhecem uma proteína no veneno de *M. corallinus*, *M. frontalis altirostris*, *Dendroaspis angusticeps* e *Bungarus multicinctus*. Em contraposição, o soro anti - rNXH1 é específico para o veneno de *M. corallinus*.
5. NXH8 tem toxinas similares presentes nesses venenos ou compartilha epítomos estruturais com outras toxinas presentes nesses venenos.
6. O veneno de *M. corallinus* tem componentes e características específicas em comparação aos venenos das outras *Micrurus*.
7. O veneno de *M. corallinus* tem componentes que apresentam afinidade pelo nAChR do músculo.
8. O soro feito em camundongos anti – rNXH8 impede a ligação dos componentes pós – sinápticos do veneno de *M. corallinus* ao nAChR da membrana do músculo esquelético. Em contraposição o soro anti – rNXH1 não neutraliza esses componentes.
9. NXH8 pode ligar-se ao próprio nAChR ou compartilha um epítomo funcional com as  $\alpha$  - neurotoxinas do veneno de *M. corallinus*. Dessa maneira, o soro produzido contra NXH8 seria capaz de neutralizar essas  $\alpha$  - neurotoxinas.
10. NXH8 possui os principais aminoácidos que compõem o sítio funcional de uma  $\alpha$  - neurotoxina.
11. Não se exclui que NXH8 possa ter outro alvo receptor ainda não definido.
12. NXH8 recombinante não apresenta atividade tóxica ou foi expresso na forma de um toxóide.

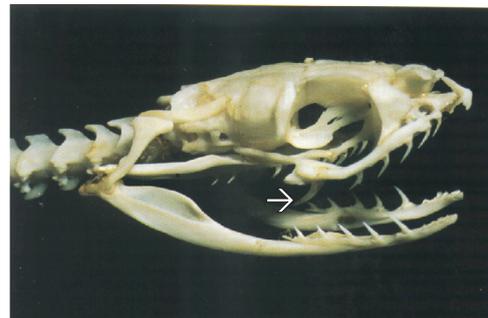




FIGURA 01: *Micrurus corallinus*. Foto: M. Freiberg.



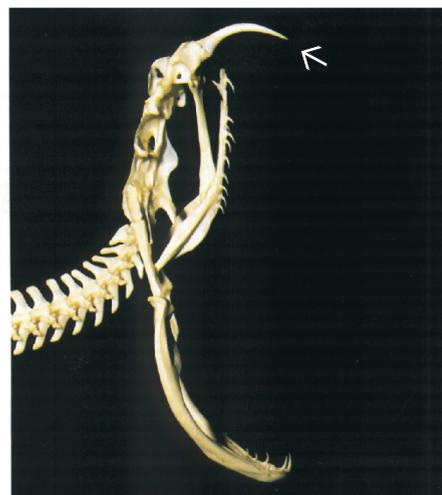
A: Dentição áglifa (*Boa constrictor*).



B: Dentição opistóglifa (*Philodrias olfersii*).

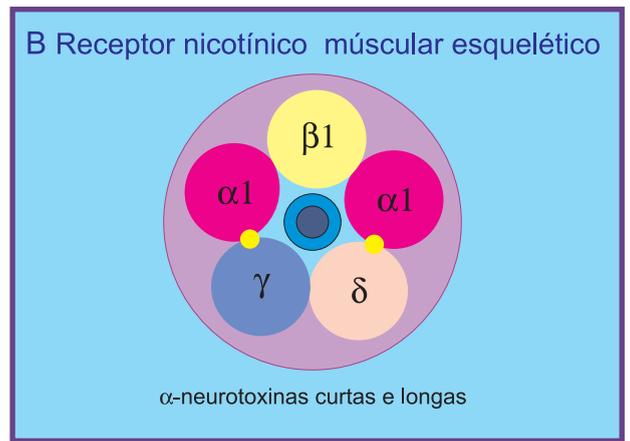
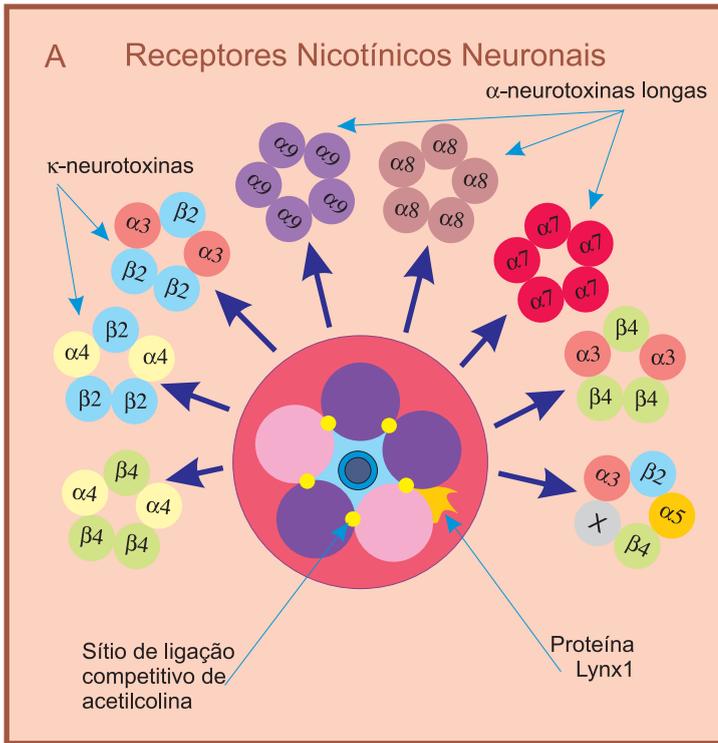


C: Dentição proteróglifa (*Micrurus frontalis*).



D: Dentição solenóglifa (*Bothrops jararaca*).

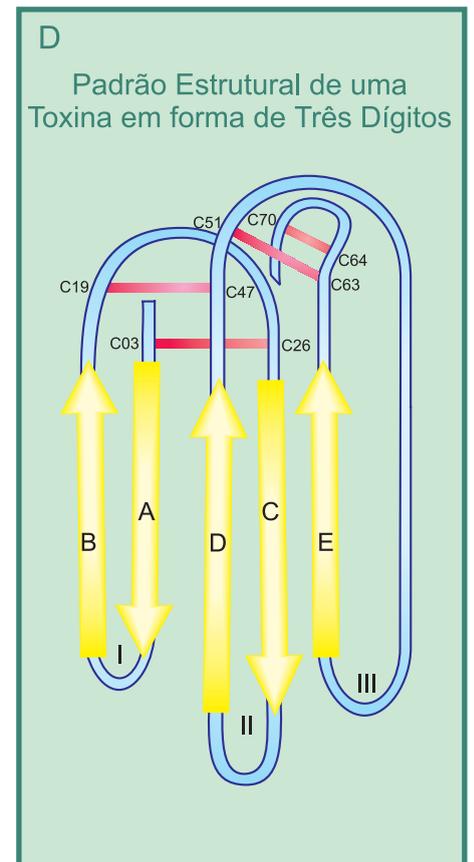
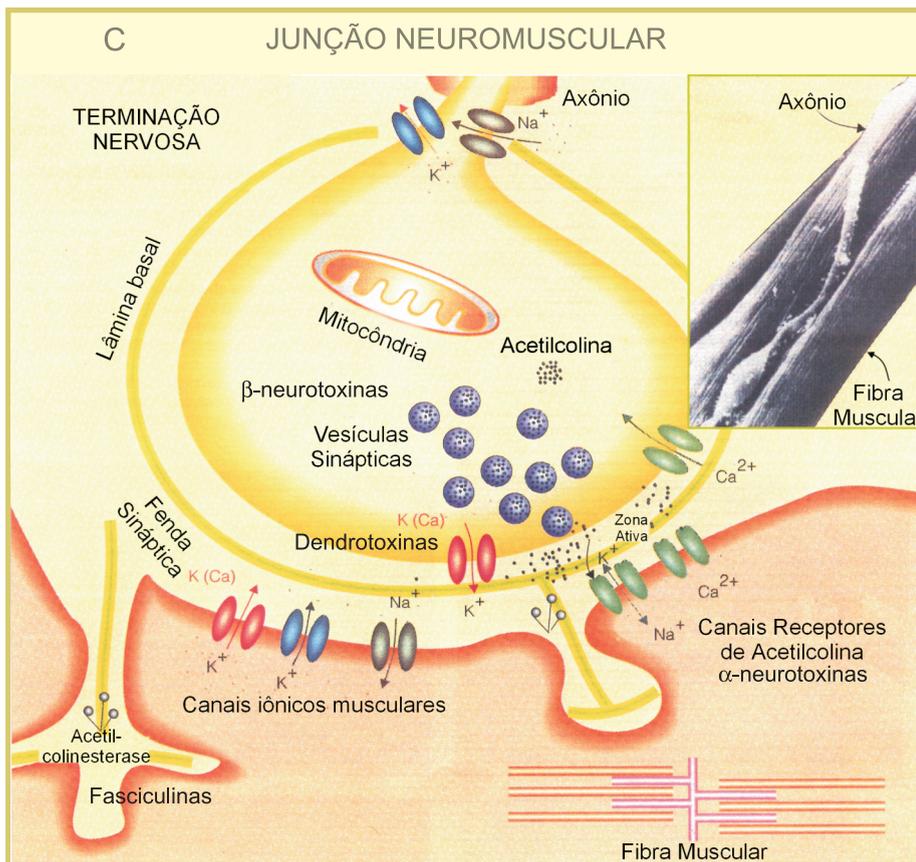
FIGURA 02: Dentição das Serpentes.  
 Observar em 2C a dentição das corais.  
 Adaptado de Marques et al., 2001.



Receptores baseados em:  
Lloyd, K. and Williams, M. "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors as Novel Drug Targets." J. Pharmacol. Exper. Therapeutics 292(2):461-467, 2000.

Junção neuromuscular baseada em:  
Ménez, A. "Les structures des toxines des animaux venimeux" Por la Science 190: 34-40, 1993.

Estrutura da toxina baseada em:  
Drenth J, Low BW, Richardson J, Wright CS. "The toxin-Agglutinin Fold: A new group of small protein structures organized around a four-dissulfide core." J Biol Chem. 255(7):2652-2655, 1980.

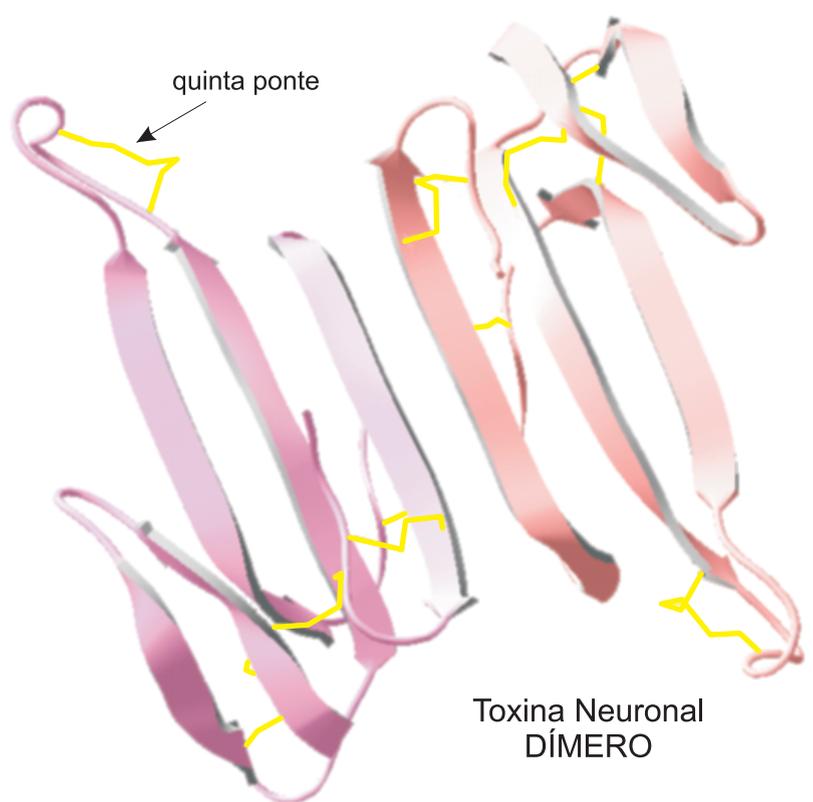
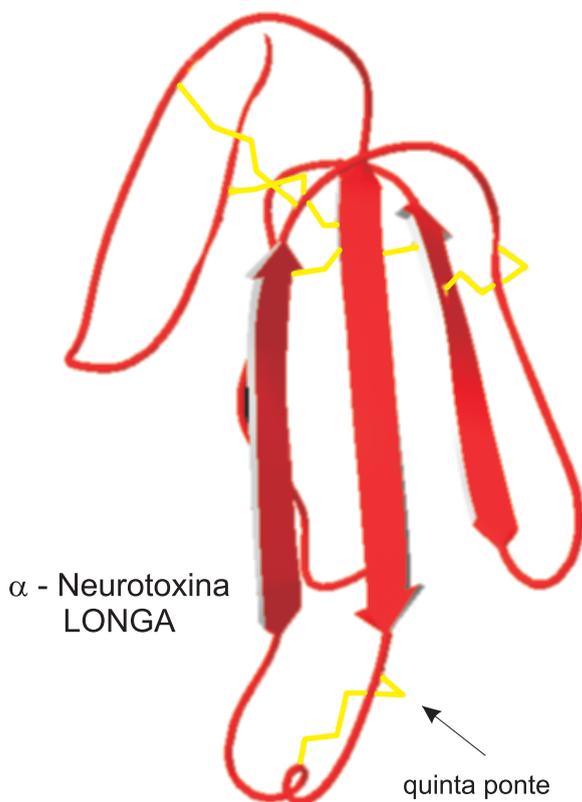
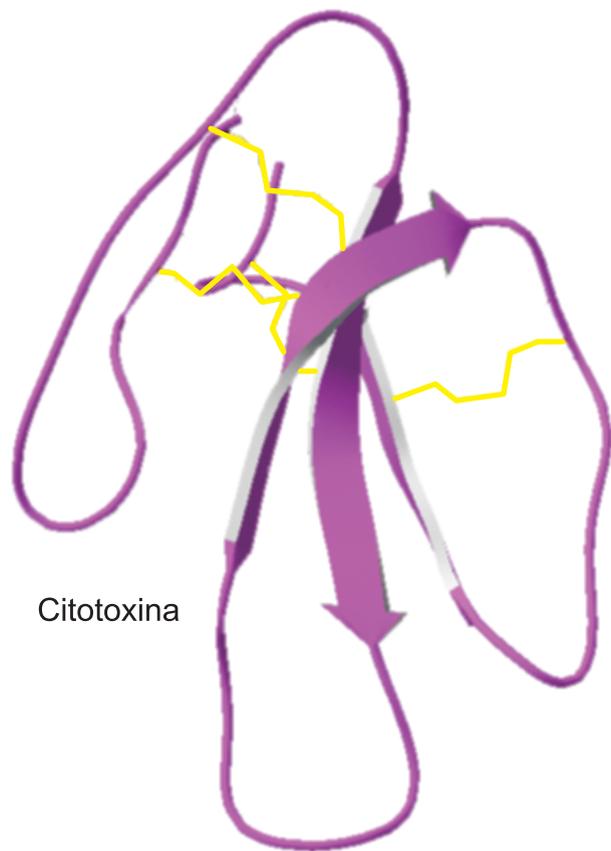


**FIGURA 03: Toxinas de serpente com estrutura em três dígitos e seus alvos.**

A classe de toxinas de serpentes com estrutura em três dígitos, são pequenas proteínas de 60 a 70 aminoácidos organizadas em três alças ricas em folhas  $\beta$ -pregueadas, que emergem de um núcleo formado por 4 pontes dissulfeto. Apesar desse padrão estrutural muito conservado, essas toxinas têm diversos alvos específicos causando diferentes ações farmacológicas. As  $\alpha$ -neurotoxinas atuam na junção neuromuscular bloqueando os receptores musculares de acetilcolina. Outras são específicas para certos receptores neuronais. Algumas atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase. Outras têm afinidade por certos tecidos, causando dano tecidual e despolarização das membranas, tal como as cardiotoxinas.

Erabutoxina a de *Laticauda semifasciata*

Cardiotoxina IV de *Naja n. atra*



$\alpha$  - Cobratoxina de *Naja n. kaouthia*

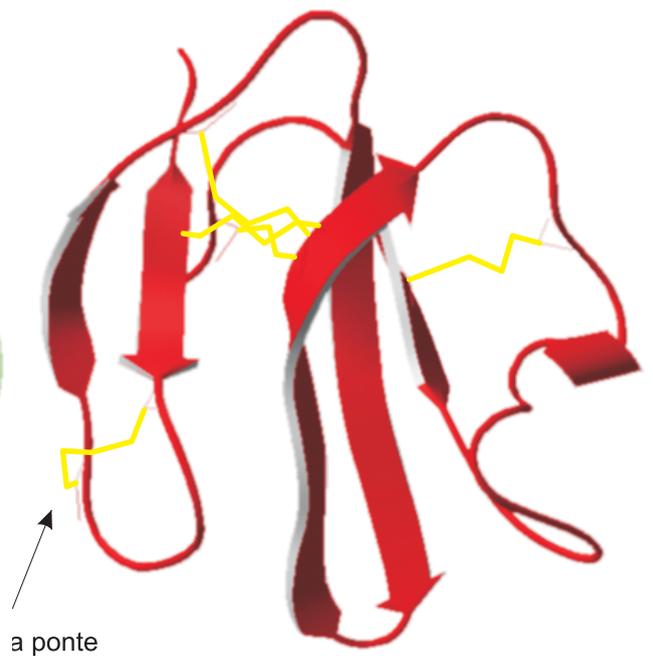
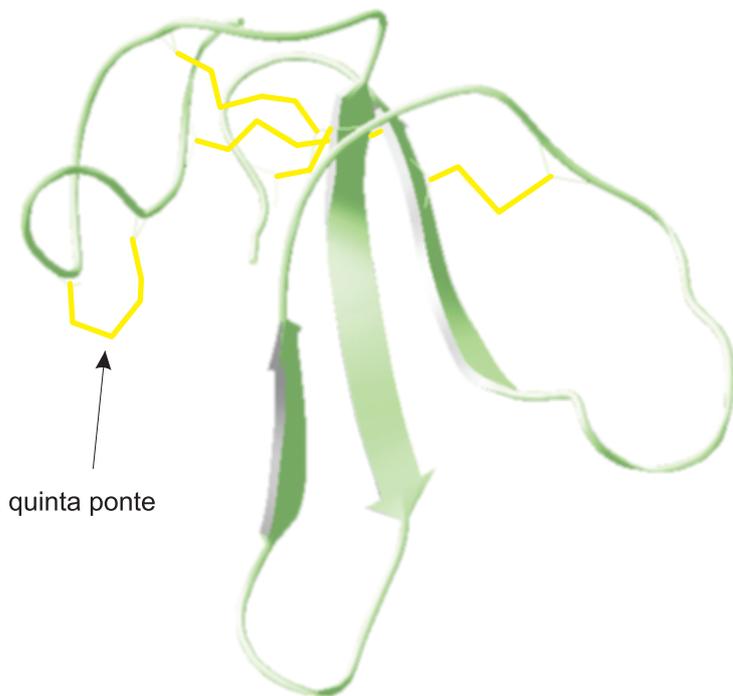
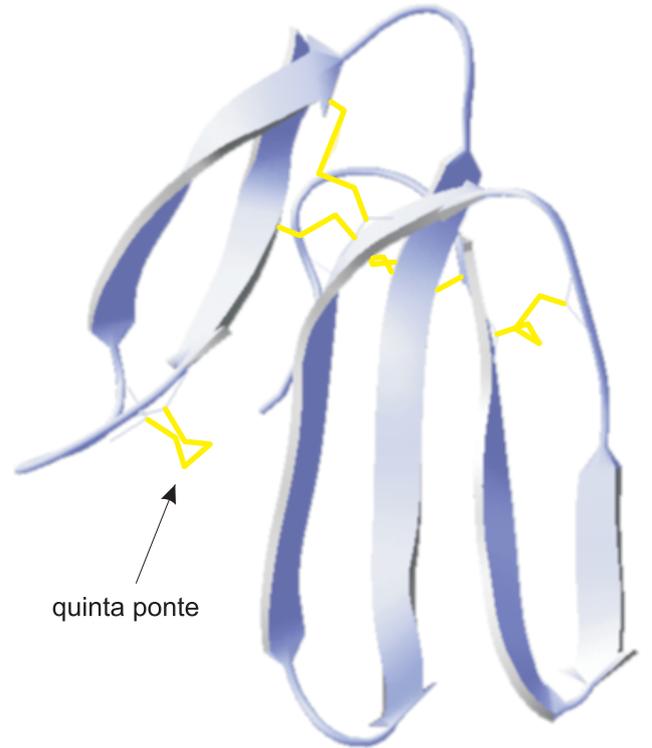
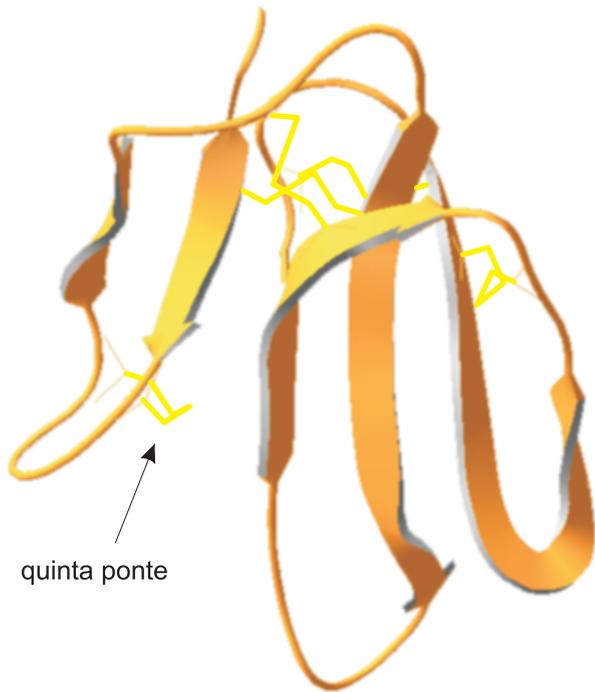
$\kappa$  - Bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*

FIGURA 04A: Modelos estruturais de algumas proteínas em forma de três dígitos.

Os modelos representam toxinas de serpentes elapídicas expressas nas glândulas de veneno. Em amarelo são mostradas as pontes dissulfeto.

NXH8 de *Micrurus corallinus*

Bucandina de *Bungarus multicinctus*



Lynx1 de *Mus musculus*

CD59 de *Homo sapiens*

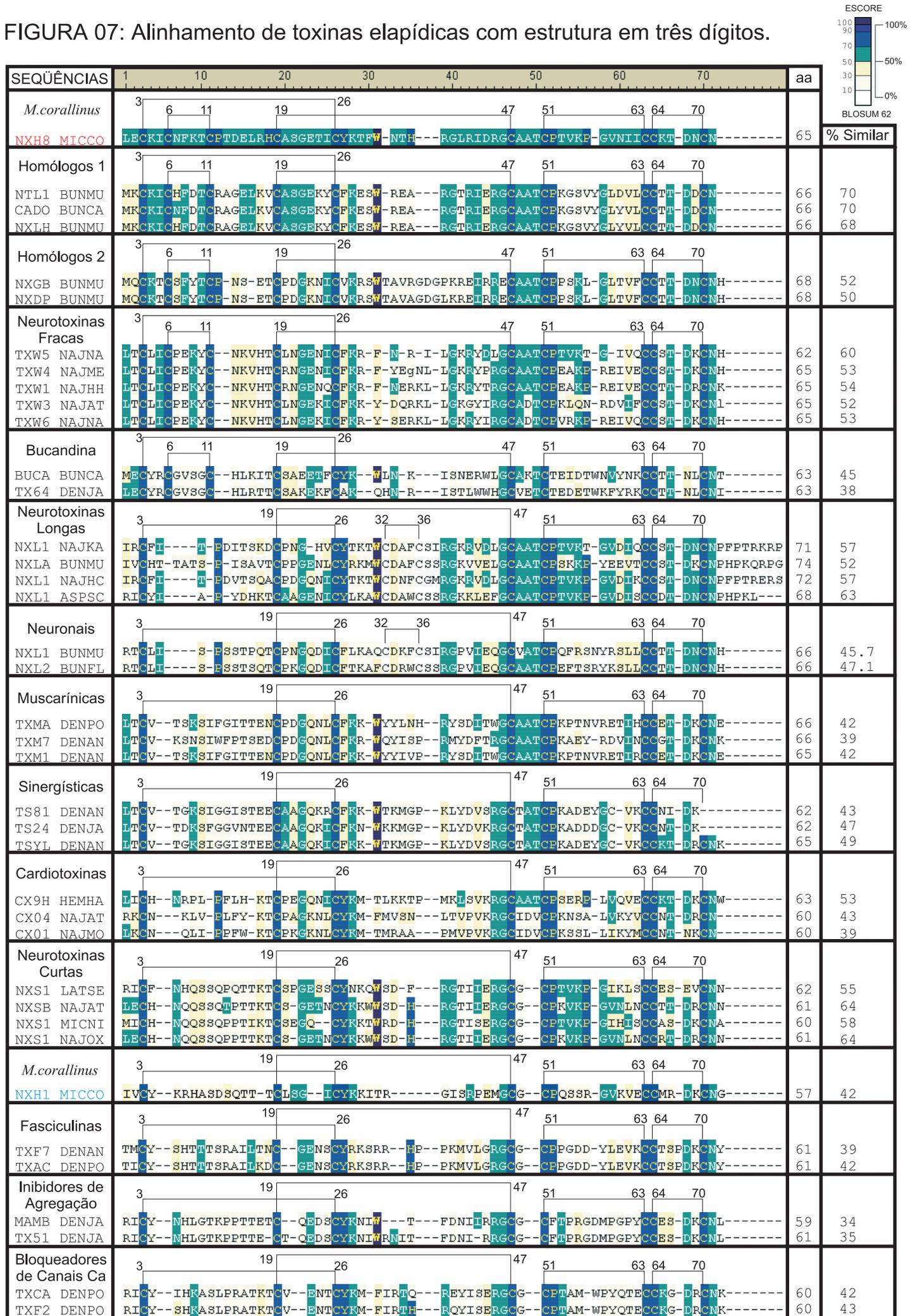
FIGURA 04B: Modelos estruturais de algumas proteínas em forma de três dígitos com quinta ponte dissulfeto na primeira alça.

Os dois modelos na parte superior, são toxinas de serpentes elapídicas expressas nas glândulas de veneno. Os dois modelos inferiores são os domínios extracelulares de proteínas de mamífero ligadas às membranas celulares por uma âncora GPI. Lynx1 é expresso no cérebro e CD59 em linfócitos. Em amarelo são mostradas as pontes dissulfeto.





FIGURA 07: Alinhamento de toxinas elapídicas com estrutura em três dígitos.



## Legendas das FIGURAS 07 e 08: Seqüências utilizadas no alinhamento e no dendrograma

**NXH8 MICCO** - peptídeo maduro de “Neurotoxin Homolog 8”, *Micrurus corallinus*. (AJ344067)

Homólogos 1 de  $\alpha$  - Neurotoxinas Longas:

**NTL1 BUNMU** – peptídeo maduro de “Neurotoxin-like protein” *Bungarus multicinctus* (Q9YG19). **CADO**

**BUNCA** – “Candoxin” *B. candidus* (P81783) **NXLH BUNMU** – peptídeo maduro de “Long Neurotoxin Homolog” *B. multicinctus* (P15818).

Homólogos 2 de  $\alpha$  - Neurotoxinas Longas:

**NXGB BUNMU** – “ $\gamma$ - Bungarotoxin” *B. multicinctus* (Q9W796). **NXDP BUNMU** - peptídeo maduro de “ $\delta$ -protein toxin” *B. multicinctus* (O12963).

Neurotoxinas Fracas:

**TXW5 NAJNA** – “Weak Neurotoxin 5” *Naja naja* (P29179). **TXW4 NAJME** – “Weak Toxin S4C11” *N. melanoleuca* (P01400). **TXW1 NAJHH** – “Weak Toxin CM-11” *N. haje haje* (P01401). **TXW3 NAJAT** - peptídeo maduro de “Probable Weak Neurotoxin NNAM3” *N. atra* (Q9YGI1). **TXW6 NAJNA** – “Weak neurotoxin 6” *N. naja*. (P29180).

Bucandina:

**BUCA BUNCA** – “Bucandin” *B. candidus* (P81782). **TX64 DENJA** – “Toxin S6C4” *D. jamesoni kaimosae* (P25882).

$\alpha$  - Neurotoxinas Longas:

**NXL1 NAJKA** – “Alpha-Cobratoin” *N. naja kaouthia*. (P01391). **NXLA BUNMU** – “Alpha-Bungarotoxin”, *B. multicinctus* (P01378). **NXL1 NAJHC** – “Long Neurotoxin III” *N. haje anchietae* (P01389). **NXL1 ASPSC** – “Toxin S4C6” *Aspidelaps scutatus* (P25670).

Toxinas Neurônais:

**NXL1 BUNMU** – “ $\kappa$  - Bungarotoxin” *B. multicinctus*. (P01398). **NXL2 BUNFL** – “ $\kappa$  - Flavitoxin” *B. flaviceps flaviceps* (P15815).

## Toxinas Muscarínicas:

**TXMA DENPO** – “Muscarinic Toxin -  $\alpha$ ”, *D. polylepis polylepis* (P80494). **TXM7 DENAN** – “Muscarinic Toxin 7” *D. angusticeps* (P80970). **TXM1 DENAN** – “Muscarinic Toxin 1” *D. angusticeps* (P81030).

## Toxinas Sinérgicas:

**TS81 DENAN** – “Protein C8S2 Chain 1” *D. angusticeps* (P01410). **TS24 DENJA** – “Toxin S2C4 chain 1” *D. jamesoni kaimosae* (P01407). **TSYL DENAN** – peptídeo maduro de “Synergistic-Like Venom Protein” *D. angusticeps* (P17696).

## Cardiotoxinas:

**CX9H HEMHA** – “Cytotoxin Homolog 9B” *Hemachatus haemachatus* (P24778). **CX04 NAJAT** – “Cardiotoxin IV” *N. naja atra* (P01443). **CX01 NAJMO** – “Cardiotoxin XIIB” *N. mossambica mossambica* (P01467).

 $\alpha$  - Neurotoxinas Curtas:

**NXS1 LATSE** – “Erabutoxin A”, *Laticauda semifasciata* (P01435). **NXSB NAJAT** – “Cobrotoxin B” *N. naja atra* (P80958). **NXS1 NAJOX** – “Oxiana alpha neurotoxin” *N. oxiana* (P01427). **NXS1 MICNI** – “Short neurotoxin alpha” *Micrurus nigrocinctus* (P80548).

**NXH1 MICCO** – peptídeo maduro de “Alpha Neurotoxin Homolog 1” *Micrurus corallinus* (Q9PUB7).

## Fasciculinas:

**TXF7 DENAN** – “Acetylcholinesterase Toxin F-VII” *D. angusticeps* (P01403). **TXAC DENPO** – “Acetylcholinesterase Toxin C” *D. polylepis polylepis* (P25681).

## Inibidores de agregação plaquetária:

**MAMB DENJA** – “Mambin”, *D. jamesoni kaimosae* (P28375). **TX51 DENJA** – “Toxin S5C1” *D. jamesoni kaimosae* (P01413).

## Bloqueadores de canais de cálcio tipo - L:

**TXCA DENPO** – “Calciseptine” *D. polylepis polylepis*. (P22947). **TXF2 DENPO** – “Toxin FS-2” *D. polylepis polylepis* (P01414).

## Grupo externo:

**LYNX MOUSE** – peptídeo maduro de “lynx1” *Mus musculus* (Q9WVC2).

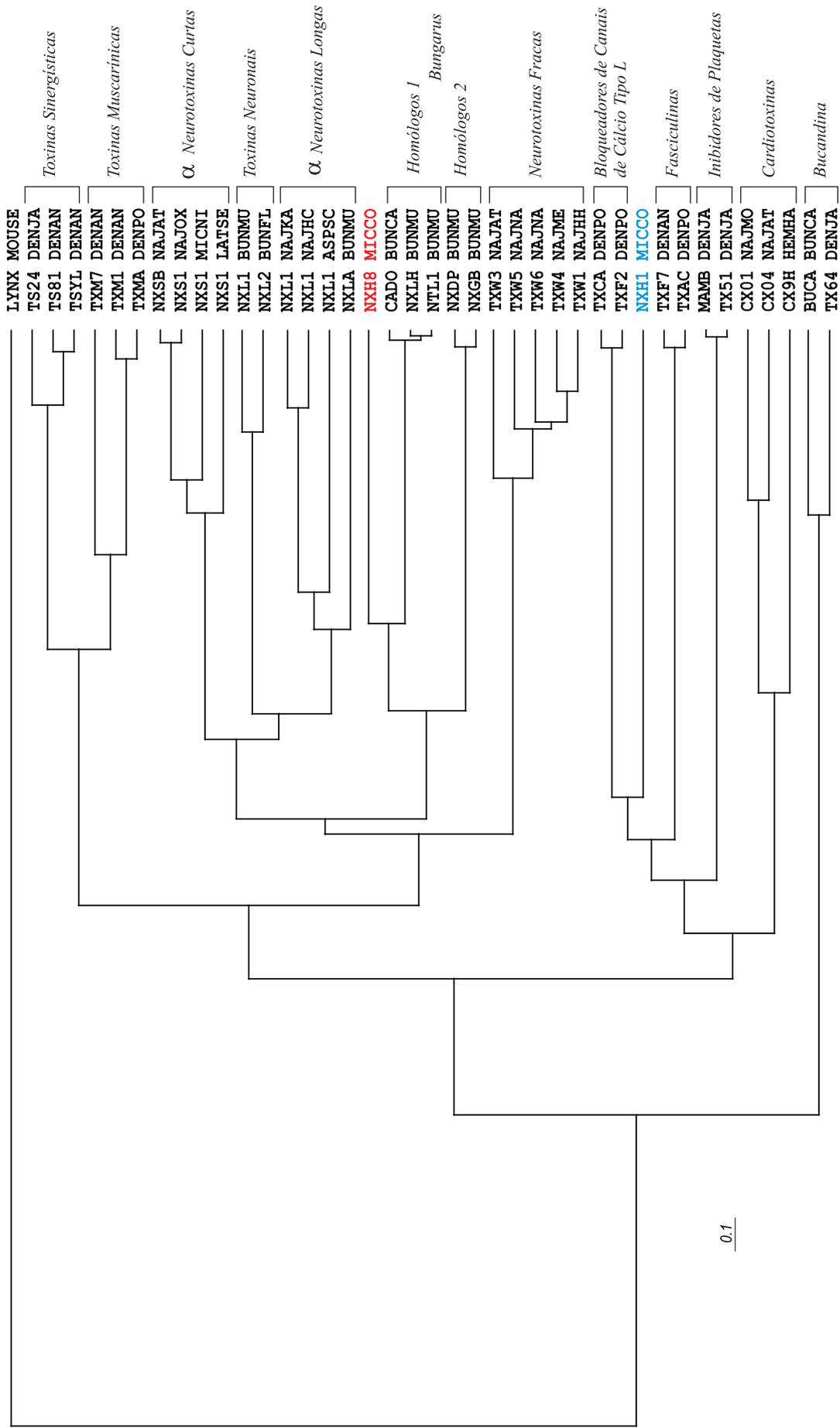


Figura 08: Dendrograma da família das toxinas elapídicas com estrutura em três dígitos.

Foi utilizado como grupo externo a seqüência da proteína Lynx1 (LYNX MOUSE).  
 As toxinas de *Micrurus corallinus* estão indicadas: em vermelho NXH8 e em azul NXH1.

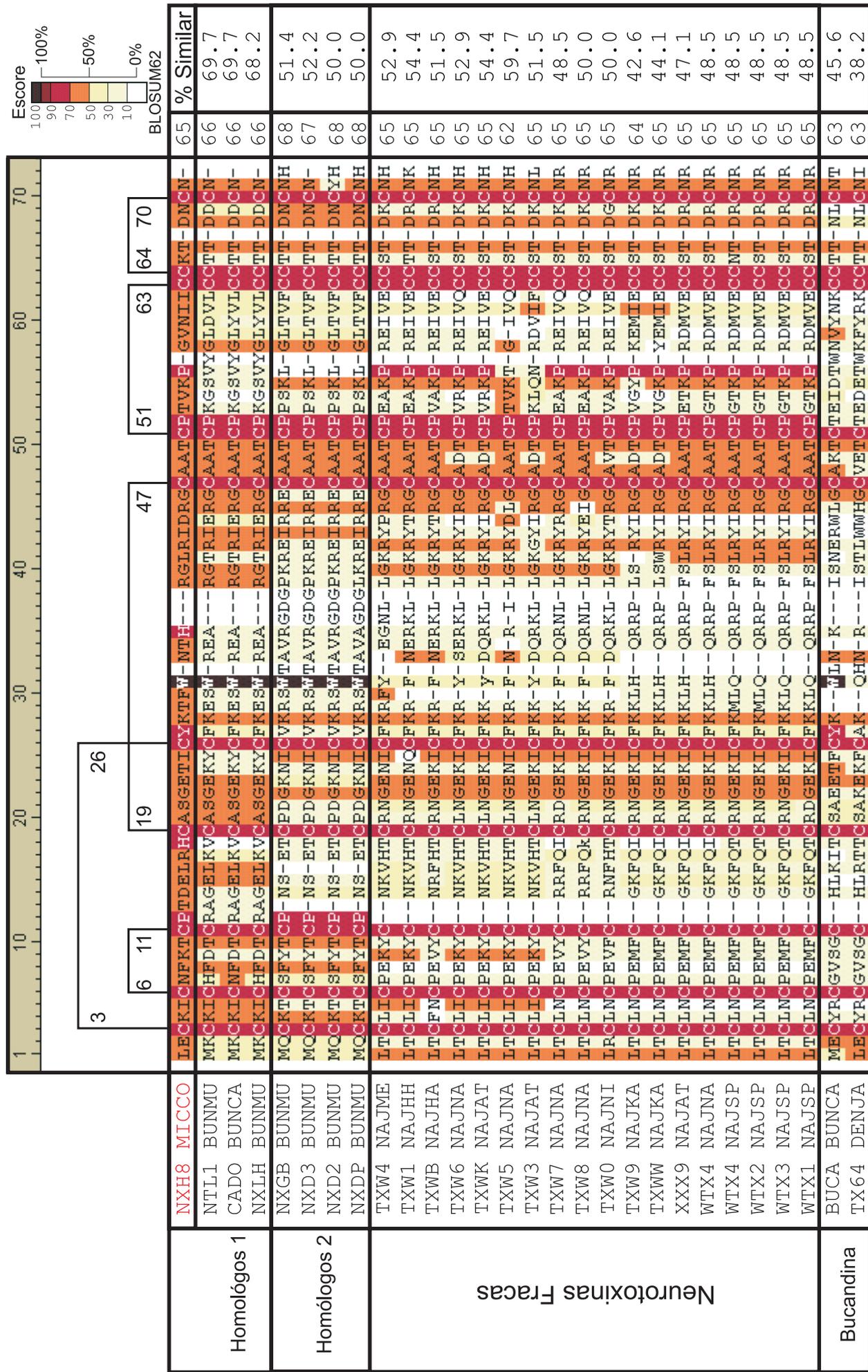


FIGURA 09: Alinhamento de seqüências de toxinas com a quinta ponte dissulfeto na primeira alça.

## Legendas das FIGURAS 09 e 10: Seqüências utilizadas no alinhamento e no dendrograma.

Quando conhecidas, as LD<sub>(50)</sub> para camundongos das toxinas estão indicadas.

Bucandina:

**BUCA BUNCA:** “Bucandin” de *Bungarus candidus* (P81782). **TX64 DENJA:** “Toxin S6C4” de *Dendroaspis jamesoni kaimosae* LD<sub>(50)</sub> = 10 mg/kg IV. (P25682).

α - Neurotoxina curta:

**NXS1 LATSE:** “Short Neurotoxin 1 - Erabutoxin a” de *Laticauda semifasciata*, LD<sub>(50)</sub> = 0,15 mg/kg I. M. (P01435).

Neurotoxinas fracas:

**TXW3 NAJAT:** Peptídeo maduro de “Weak neurotoxin 3” NNA3 de *Naja atra* (Q9YGI1). **TXW5 NAJNA:** “Weak Neurotoxin 5” de *Naja naja* (P29179). **TXWB NAJHA:** “Weak Toxin CM-13B” de *Naja haje annulifera* LD<sub>(50)</sub> = 4,86 mg/kg (P01399). **TXW4 NAJME:** “Weak Toxin S4C11” de *Naja melanoleuca* LD<sub>(50)</sub> > 20 mg/kg I. V. (P01400). **TXW1 NAJHH:** “Weak Toxin CM-11” *Naja haje haje* LD<sub>(50)</sub> = 13,4 mg/kg SC. (P01401). **TXW6 NAJNA:** “Weak Neurotoxin 6” de *Naja naja* (P29180). **TXWK NAJAT:** Peptídeo maduro de “κ - Cobrotoxin Weak toxin Precursor” de *Naja atra* (O93422). **TXW0 NAJNI:** “Weak Toxin CM-10 de *Naja nivea* LD<sub>(50)</sub> = 16 mg/kg I. V. (P25680). **TXW7 NAJNA:** “Weak neurotoxin 7” *Naja naja*, (P29181). **TXW8 NAJNA:** “Weak neurotoxin 8” de *Naja naja* (P29182). **TXWW NAJKA:** “Weak Tryptophan-Containing Neurotoxin” de *Naja naja kaouthia* (P82935). **TXW9 NAJKA:** “Weak Toxin CM-9A” de *Naja naja kaouthia*, LD<sub>(50)</sub> = 82 mg/kg (P25679). **WTX1 NAJSP:** peptídeo maduro de “Weak Neurotoxin Isoform 1” de *Naja sputatrix* (O42256). **WTX3 NAJSP:** Peptídeo maduro de “Weak Neurotoxin Isoform 3” de *Naja sputatrix* (O42255). **WTX2 NAJSP:** Peptídeo maduro de “Weak Neurotoxin Precursor” de *Naja sputatrix* (Q9W714). **WTX4 NAJSP:** Peptídeo maduro de “Weak neurotoxin 9 Isoform” de *Naja sputatrix* (Q9W713). **WTX4 NAJNA:** Peptídeo maduro de “Neurotoxin NNA4” de *Naja naja* (Q9YGI7). **XXX9 NAJAT:** Peptídeo maduro de “Weak neurotoxin TA-N9” (NNA2) de *Naja atra* (Q9YGI4).

$\alpha$  – neurotoxinas longas:

**NXL1 NAJKA**: “Long neurotoxin 1 -  $\alpha$  Cobratoxin” de *Naja naja kaouthia* LD<sub>(50)</sub> = 0.1 mg/kg S. C. (P01391). **NXLA BUNMU**: “ alpha neurotoxin 1 -  $\alpha$  Bungarotoxin” de *Bungarus multicinctus* LD<sub>(50)</sub> = 0,3 mg/kg S. C. (P01378).

Homólogos de neurotoxinas longas 2:

**NXDP BUNMU**: Peptídeo maduro de “ $\delta$  - Neurotoxin Precursor” de *B. multicinctus* (O12963). **NXD2 BUNMU**: peptídeo maduro de “Neurotoxin-Like Protein Precursor” de *B. multicinctus* (Q9YGH9). **NXGB BUNMU**: Peptídeo maduro de “ $\gamma$  - Bungarotoxin Precursor” de *B. multicinctus* LD<sub>(50)</sub> = 0,15 mg/kg (Q9W796).

**NXH8 MICCO**: Peptídeo maduro de “Neurotoxin Homologue 8 precursor” de *Micrurus corallinus*. (AJ344067)

Homólogos de neurotoxinas 1:

**CADO BUNCA**: “Candoxin” de *Bungarus candidus* (P81783). **NXLH BUNMU**: Peptídeo maduro de “Long Neurotoxin Homolog Precursor” de *Bungarus multicinctus* (P15818). **NTL1 BUNMU**: Peptídeo maduro de “Neurotoxin-like protein 1” de *Bungarus multicinctus* (Q9YGI9).



FIGURA 10: Dendrograma das seqüências de toxinas com a quinta ponte dissulfeto na primeira alça e sua relação com as  $\alpha$  - neurotoxinas curtas e longas.

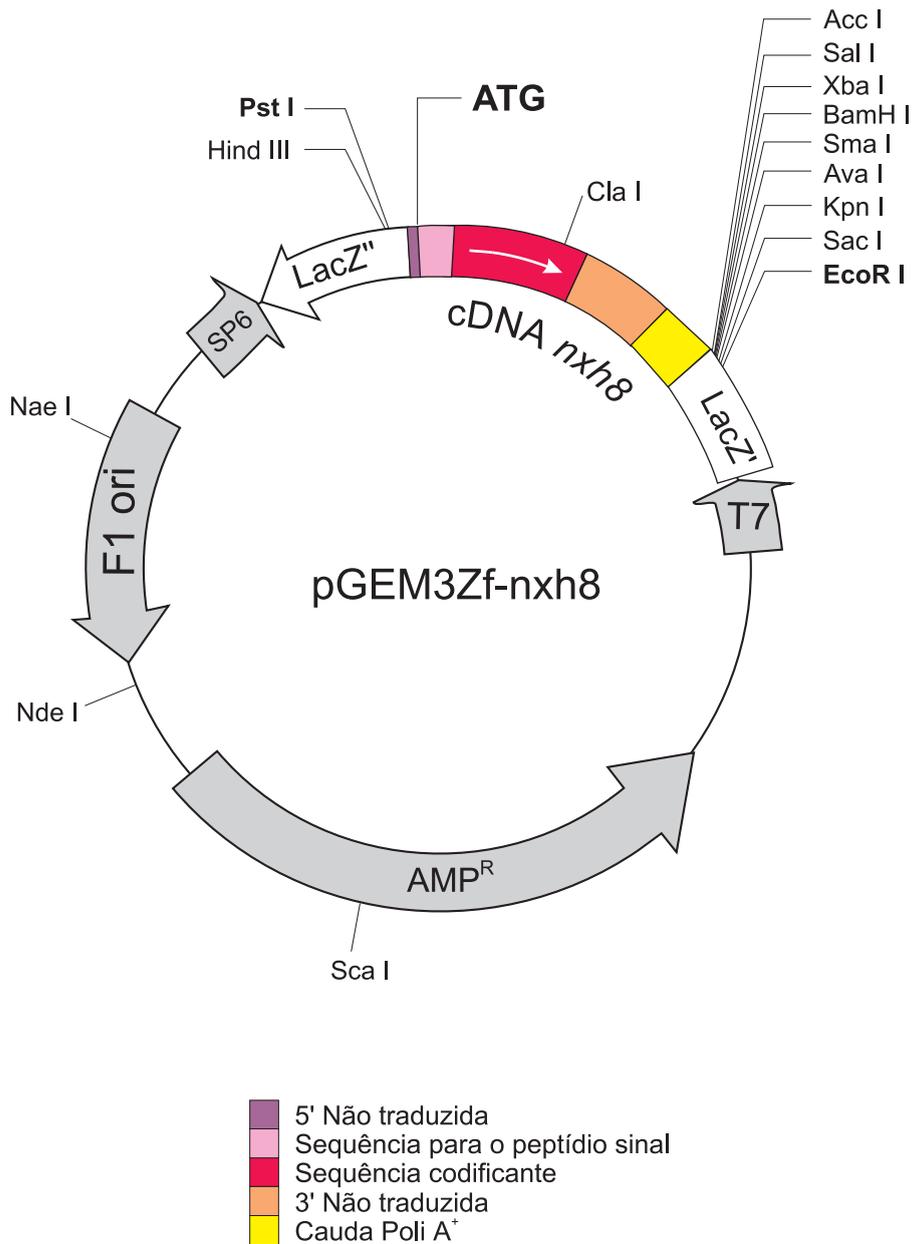


FIGURA 11: Clone *nxh8* no vetor pGEM3Zf(+).

A seqüência de cDNA *nxh8* foi clonada na orientação reversa em relação ao promotor T7 do vetor pGEM3Zf(+) no sítio de Hinc II. O plasmídeo pGEM3Zf - *nxh8* foi utilizado para gerar os demais vetores de expressão, contendo a seqüência *nxh8*.

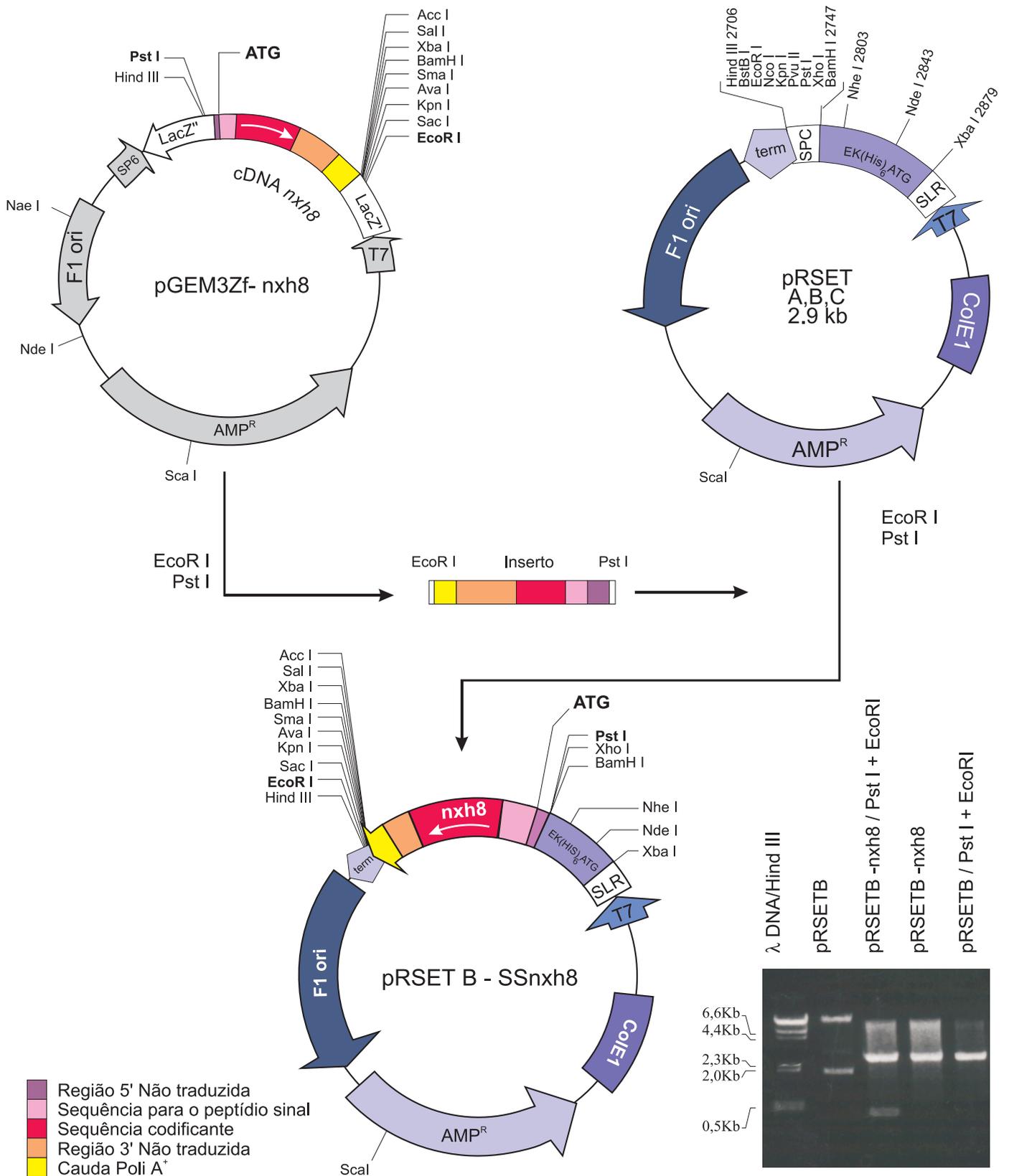


FIGURA 12: O vetor pRSET B - SSnxh8

O plasmídio pGEM3Zf - nxh8 foi digerido com EcoRI e Pst I e a seqüência de *nxh8* foi clonada em pRSET B nos mesmos sítios, gerando o vetor de expressão pRSETB - SSnxh8. Este plasmídio pode expressar a seqüência inteira do precursor de NXH8 incluindo a seqüência sinal (SSnxh8). O vetores recombinantes foram selecionados por análise de restrição com dupla digestão EcoRI e Pst I. SPC: Sítio policlonal. SRL: Sítio de ligação ao ribossomo.

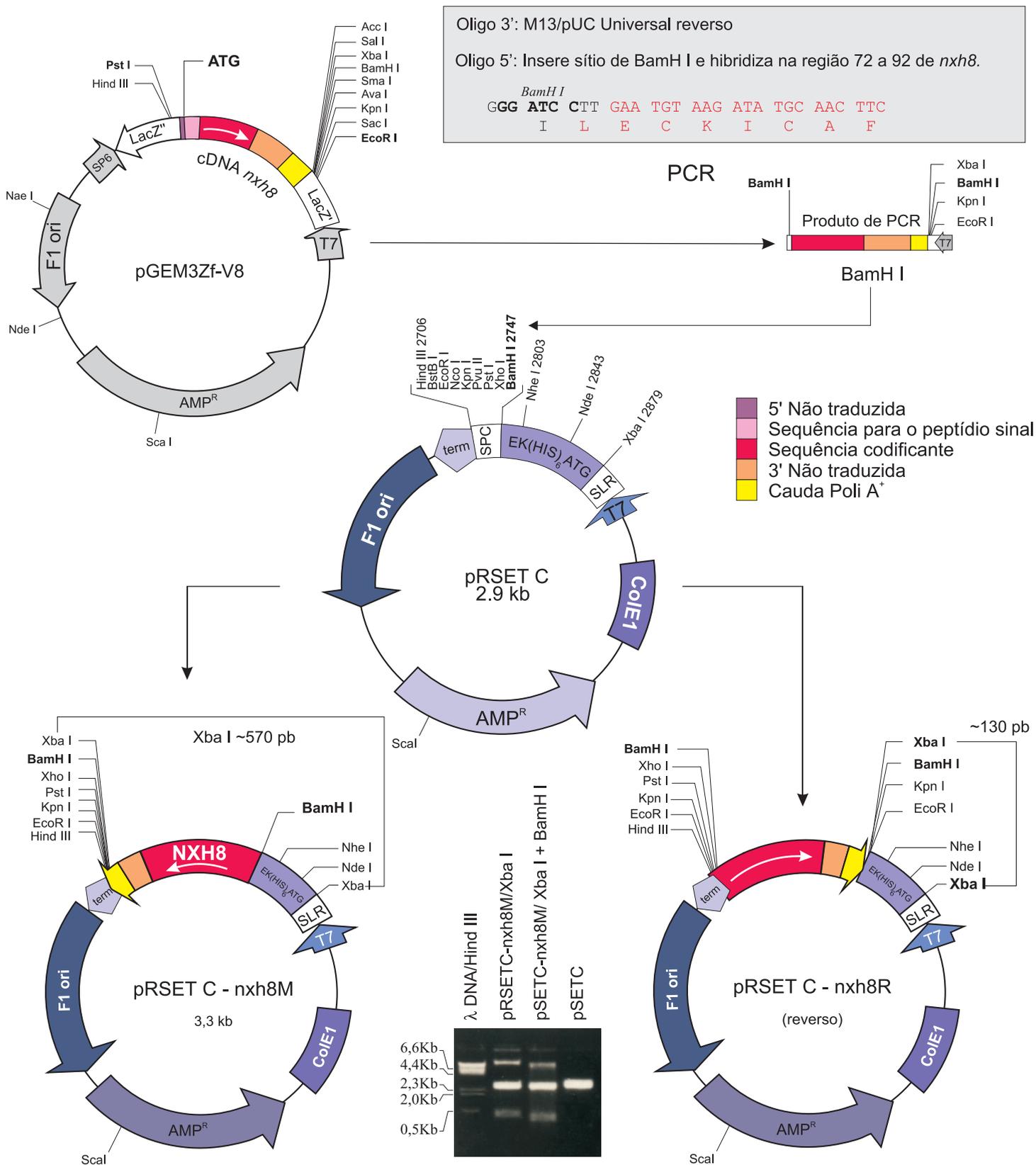


FIGURA 13: O vetor pRSET C - nxh8M.

O plasmídeo pGEM3Zf - *nxh8* foi utilizado como molde para PCR. Utilizou-se um primer que insere um sítio de BamH I e hibridiza com a região 72-92 (em vermelho) do clone *nxh8* e o primer pUC/M13 reverso que hibridiza no vetor (T7/LacZ'). É amplificada apenas a sequência que codifica para o peptídeo maduro de NXH8 em diante. O produto de PCR digerido com BamH I foi clonado em pRSETC no mesmo sítio. O vetor recombinante foi selecionado por digestão com Xba I. O vetor de expressão pRSETC - *nxh8M* expressa o peptídeo maduro de NXH8 com uma cauda de Histidinas N-terminal.

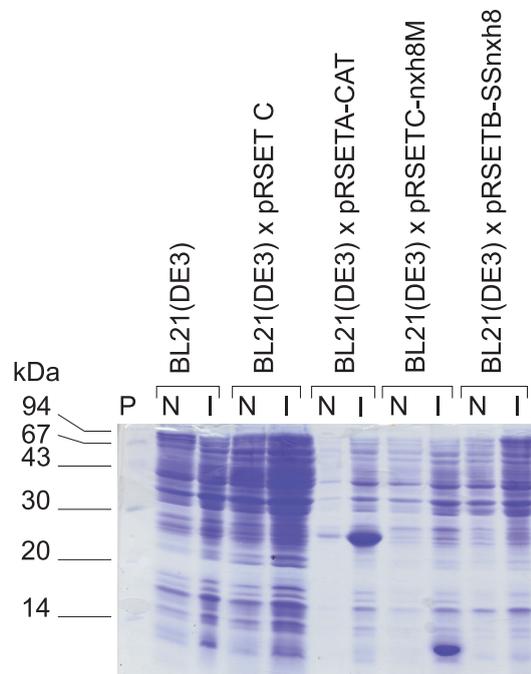


Figura 14: Expressão de pRSETC-nxh8M e pRSETB-SSnxh8 em *E. coli* BL21(DE3).

SDS PAGE a 15%, corado com Comassie Blue R250 com amostras de extrato total de cultura de células bacterianas *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os plasmídios indicados. Culturas de bactéria não transformadas e transformadas pelos vetores pRSET C e pRSET-CAT (cloranfenicol acetiltransferase) foram utilizadas como controles da expressão, realizada por 1 hora a 37°C com 1 mM IPTG. N - Não induzido. I - Induzido. P - Padrão de proteínas (Pharmacia).

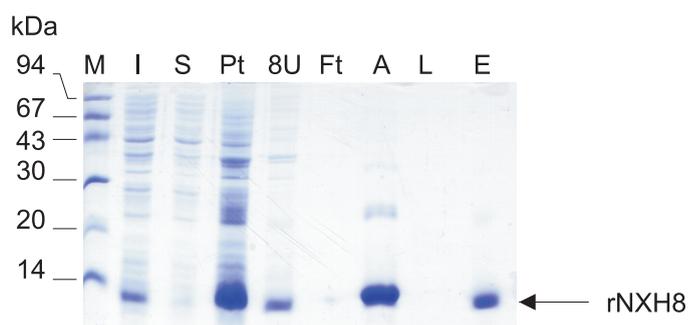


FIGURA 15: Purificação por afinidade metálica da proteína recombinante expressa pelo vetor pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3).

SDS-PAGE a 15%, corado com Comassie Blue R250. P- Padrão de proteínas (Pharmacia). I- Cultura de *E. coli* BL21(DE3) transformada por pRSETC-nxh8M induzida com 1 mM IPTG. S - Sobrenadante da centrifugação a 12 000 rpm do lisado celular em prensa hidráulica. Pt- Precipitado após centrifugação a 12 000 rpm do lisado do french press. 8U - Material solúvel em tampão com 8 mol/L Uréia; 50 mM Tris HCl pH8,0; 300 mmol/L NaCl. Ft - Lavagem do material não adsorvido à resina (Flow Thru). A - material adsorvido à resina (beads). L - Lavagem da coluna de cromatografia com tampão 8 mol/L Uréia; 50 mmol/L Tris HCl pH8,0; 300 mmol/L NaCl; 5 mmol/L Imidazol. E - Eluição com tampão 8 mol/L Uréia; 50 mmol/L TrisHCl pH8,0; 100 mmol/L NaCl; 250 mmol/L Imidazol. A posição da proteína recombinante (rNXH8) está indicada pela seta.

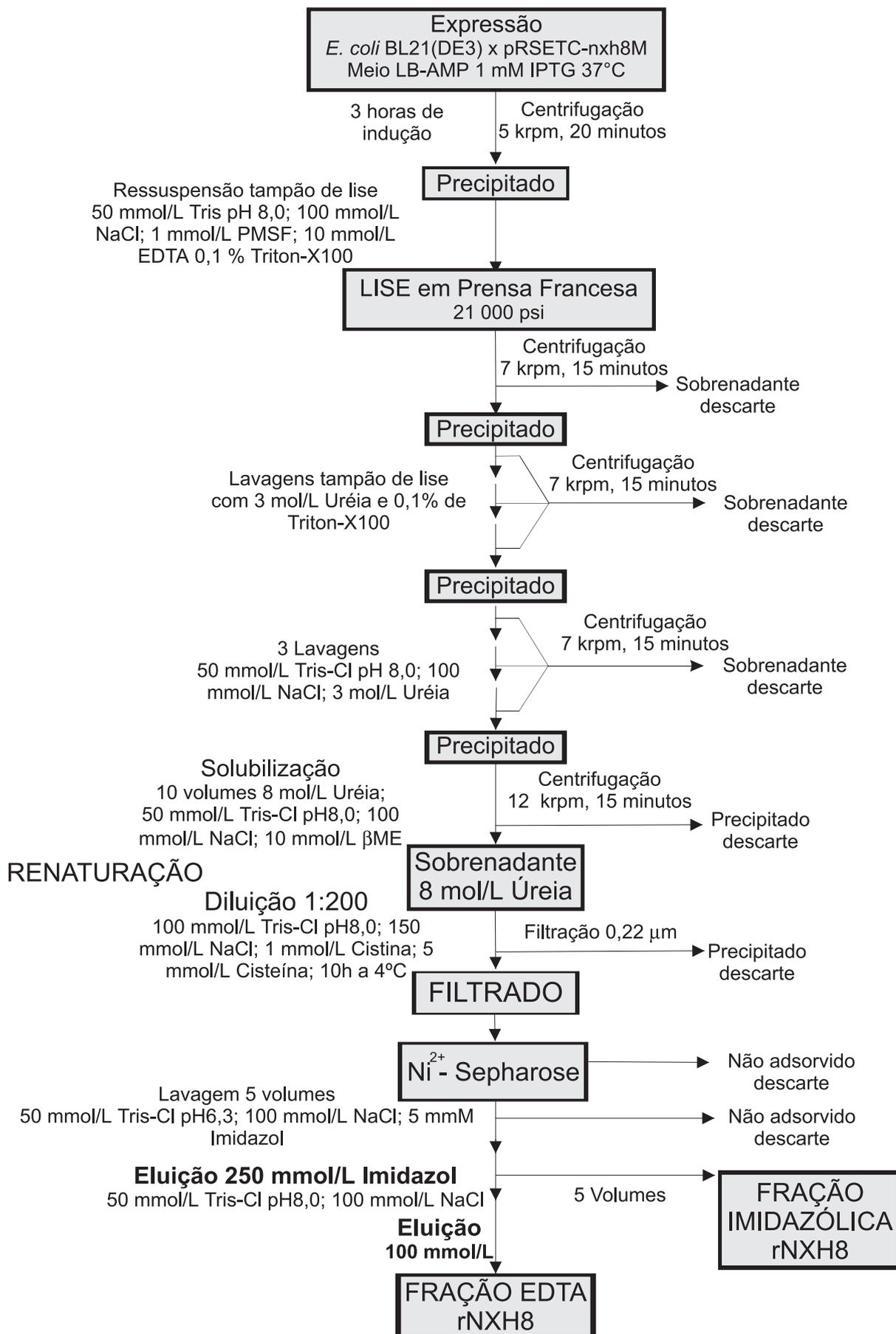


FIGURA 16: Protocolo de Renaturação e Purificação da proteína recombinante rNXH8 expressa pelo vetor pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3) em cromatografia de afinidade metálica por Níquel-Sepharose.

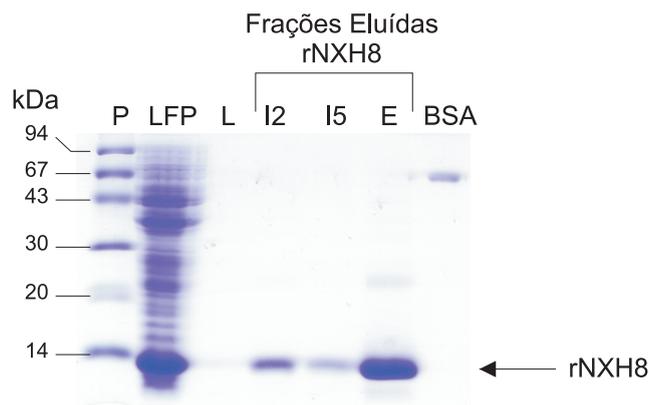


Figura 17: Purificação da proteína recombinante rNXH8 expressa por pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3) após protocolo de renaturação.

SDS-PAGE 15% corado por Comassie Blue R250 das frações purificadas após o protocolo de renaturação e purificação indicado na figura anterior. P - Padrão de proteínas (Pharmacia); LFP - Lisado da prensa hidráulica francesa; L - Lavagem 5 mmol/L Imidazol pH 6,3; I2 - Segundo volume de eluição da fração imidazólica; I5 - quinto volume de eluição da fração imidazólica; E - Eluição da fração EDTA; BSA - 2 µg de BSA (Bovine Serum Albumin). A proteína recombinante purificada rNXH8 está indicada pela seta.

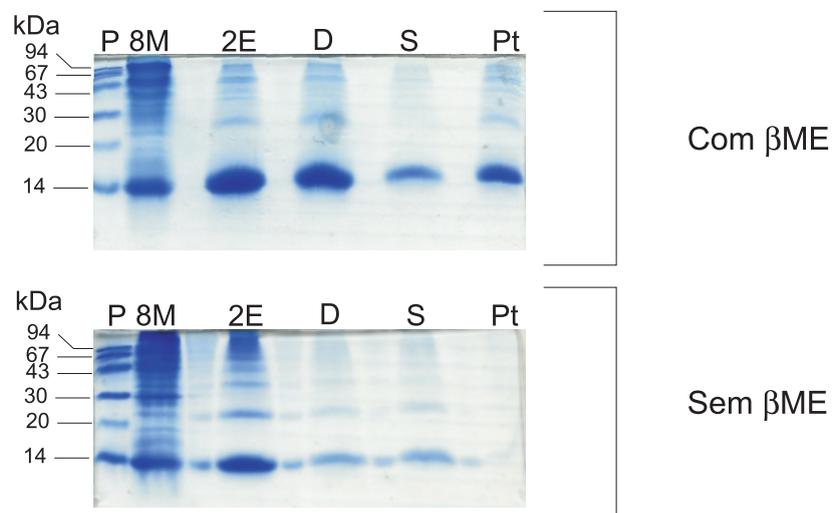


FIGURA 18: Formação de agregados na diálise de rNXH8 expresso por pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3).

SDS-PAGE 15% em condições redutoras (com  $\beta$ ME) e em condições não redutoras (sem  $\beta$ ME), corado por Comassie Blue R250. P - Padrão de proteínas (Pharmacia); 8M - Precipitado do lisado da prensa francesa ressuspensão em tampão com 8 mol/L Uréia; 2E - Amostra eluída em 2 mol/L Uréia e 250 mmol/L Imidazol; D - Diálise; S - Sobrenadante da diálise; Pt - Precipitado da diálise.

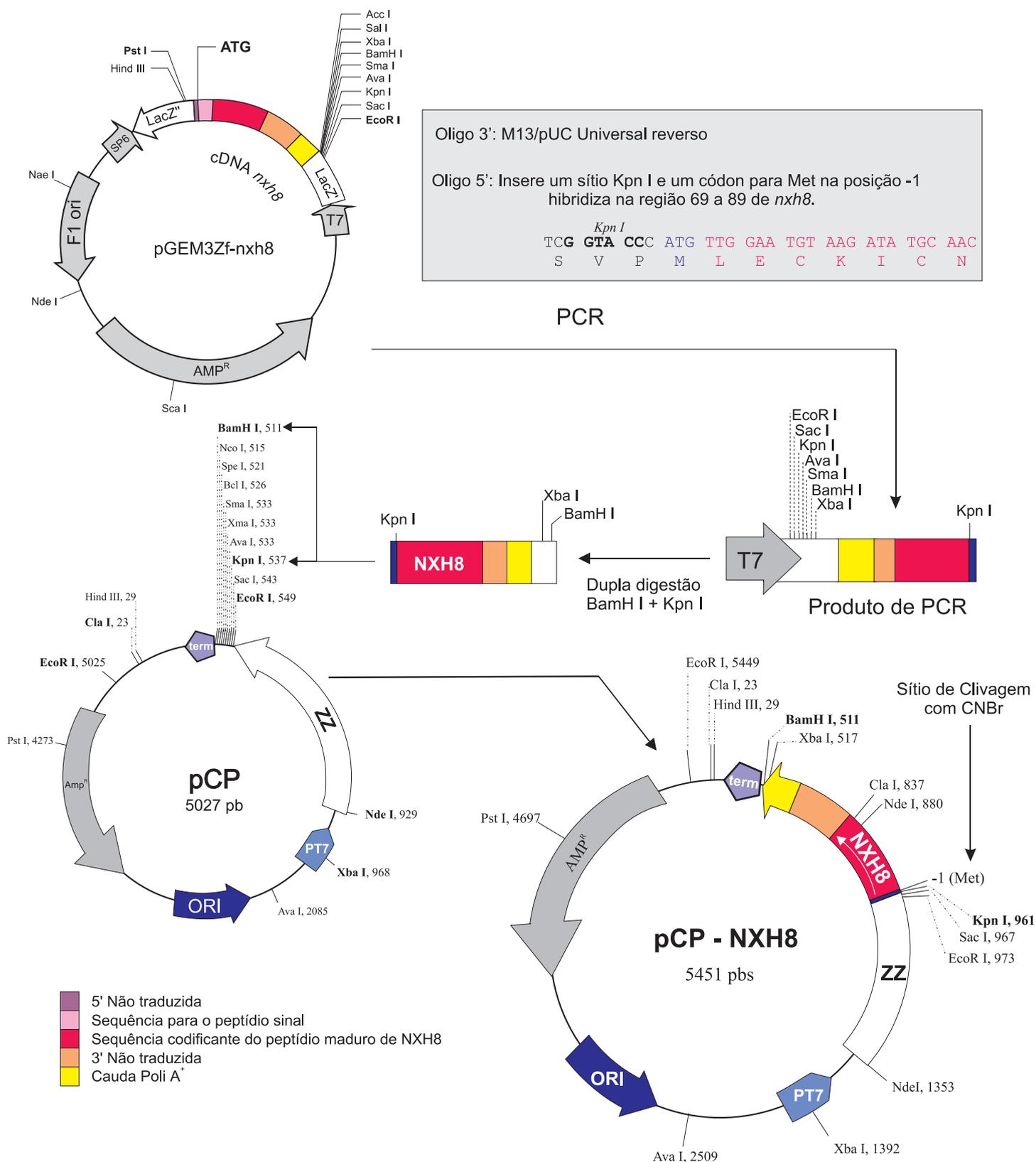
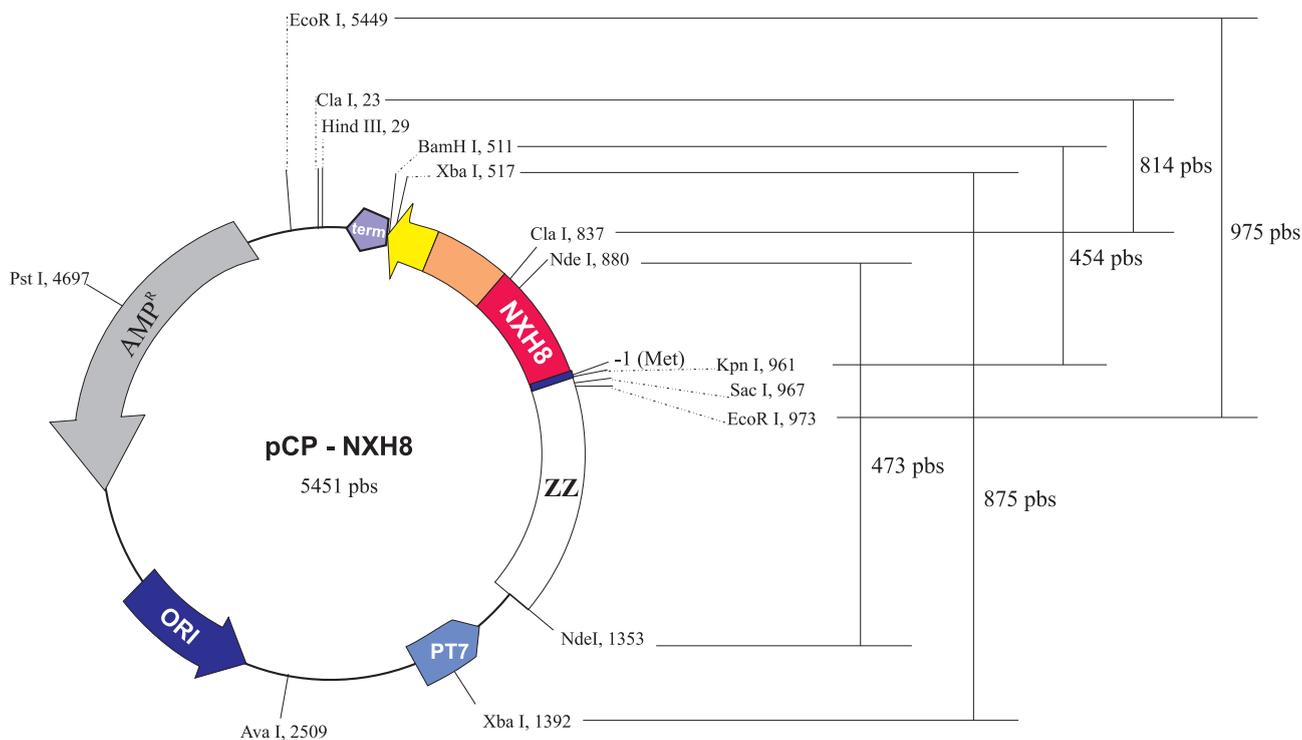


FIGURA 19: O Vetor pCP - NXH8

Usando o vetor pGEM3Zf - *nxh8* como molde para PCR. A região codificante para o peptídeo maduro em diante do clone *nxh8* foi amplificada. Usou-se um oligo que hibridiza para a região 69 a 89 do clone *nxh8* (vermelho), introduz um sítio para Kpn I na extremidade 5' e um códon para Metionina (azul) na posição -1 e um oligo reverso pUC/M13, que hibridiza no vetor. O produto de PCR foi digerido com Kpn I e EcoR I e clonado nos mesmos sítios do vetor pCP. O vetor recombinante de expressão pCP - NXH8 expressa a toxina em fusão com dois domínios sintéticos (ZZ) da proteína A. A fusão ZZ - NXH8 pode ser clivada na Metionina (-1) utilizando-se CNBr.



Mapa de restrição do vetor pCP - NXH8

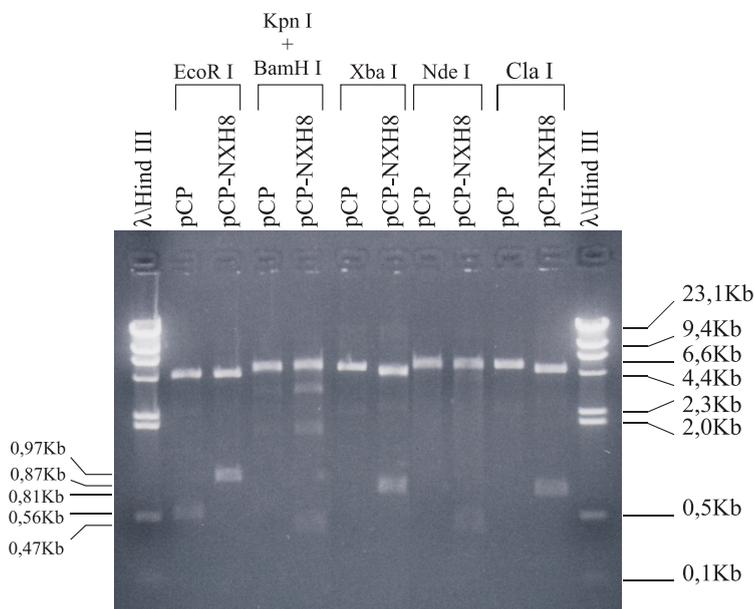


FIGURA 20: Análise de restrição do vetor pCP - NXH8

Foi realizada uma análise de restrição dos vetores pCP e pCP-NXH8, utilizando as enzimas de restrição EcoR I; Kpn I + BamH I; Xba I; Nde I e Cla I. Os tamanhos dos fragmentos obtidos correspondem ao esperado para o vetor contendo o inserto codificando para a fusão ZZNXH8.

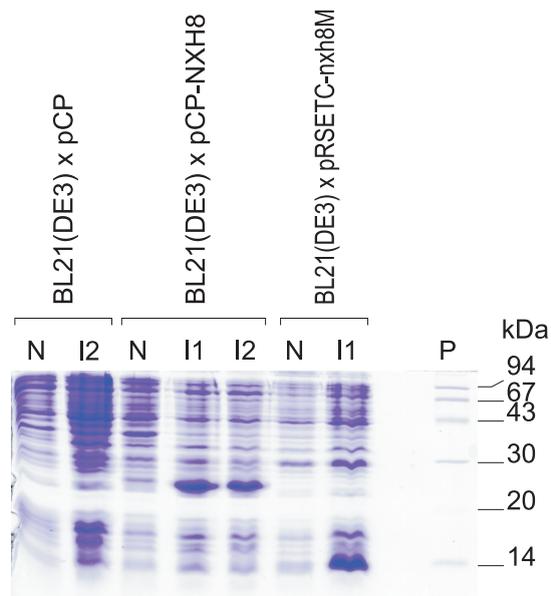


FIGURA 21: Expressão de pCP-NXH8 em *E. coli* BL21(DE3).

SDS-PAGE a 15% corado por Comassie Blue R250 com amostras de extrato total de cultura de células bacterianas *E. coli* BL21(DE3) transformadas ou não com os plasmídios indicados. Indução realizada por 1 - 2 horas a 37°C com 1 mmol/L IPTG. Os vetores pCP e pRSETC-nxh8M foram utilizados como controles. N - Não Induzido; I1 - Induzido 1 hora; I2 - Induzido 2 horas; P - Padrão de proteínas (Pharmacia).

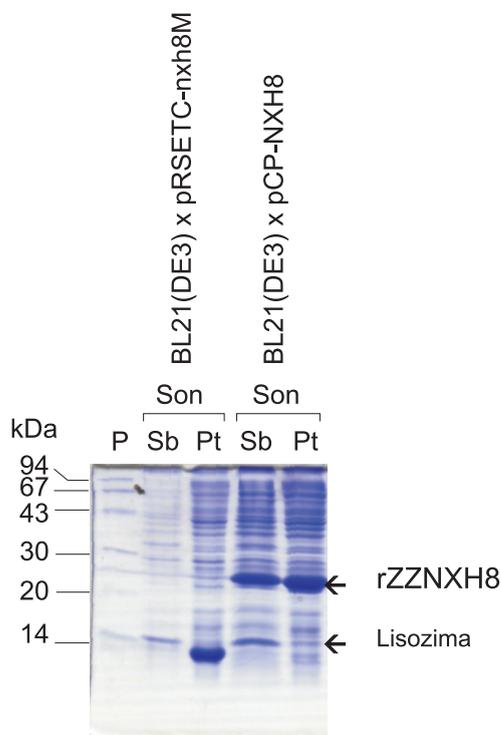


FIGURA 22: Localização e solubilidade da proteína de fusão ZZNXH8 expressa por pCP-NXH8 e de rNXH8 expressa por pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3).

SDS-PAGE a 15% corado por Comassie Blue R250 com lisados de culturas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os vetores indicados e induzidas por 1 hora a 37°C com 1mmol/L IPTG. As culturas bacterianas foram incubadas com Lisozima e lisadas por sonicação. As frações solúveis e insolúveis foram obtidas por centrifugação a 15 000 rpm. Sb - Sobrenadante Solúvel; Pt - Precipitado; Son - Sonicado; P - Padrão de proteínas (Pharmacia).

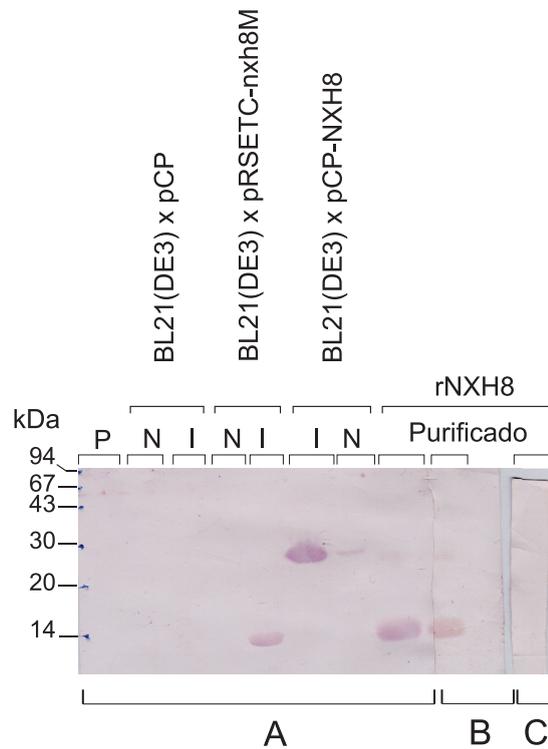


Figura 23: Western Blot com soro anti - elapídico do Instituto Butantan e soro de camundongo anti - rNXH8.

Membranas de nitrocelulose com extratos de cultura induzidas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os plasmídios indicados e proteína rNXH8 purificada em Ni<sup>2+</sup>-Sephrose. P - Padrão de proteínas (Pharmacia); I - Extrato total de cultura bacteriana induzida; N - extrato total de cultura bacteriana não induzida; rNXH8 - Proteína expressa por pRSETC-nxh8M em *E. coli* BL21(DE3) purificada em resina de Ni<sup>2+</sup>-Sephrose.

A - Filtro incubado com anticorpo primário: soro eqüino anti-elapídico. O anticorpo secundário foi: IgG caprina biotinizada anti - IgG eqüina (Sigma). B - Filtro incubado com soro murino anti-proteína recombinante rNXH8, anticorpo secundário: IgG caprina biotinizada anti - IgG murina (ImmunoSelect, GIBCO, BRL). C - Filtro em que o anticorpo primário foi omitido, anticorpo secundário: IgG caprina biotinizada anti - IgG murina (Sigma). O Western blot foi revelado com PALP-Estreptoavidina/BCIP e NBT. Os soros primários foram utilizados na diluição 1:1000.

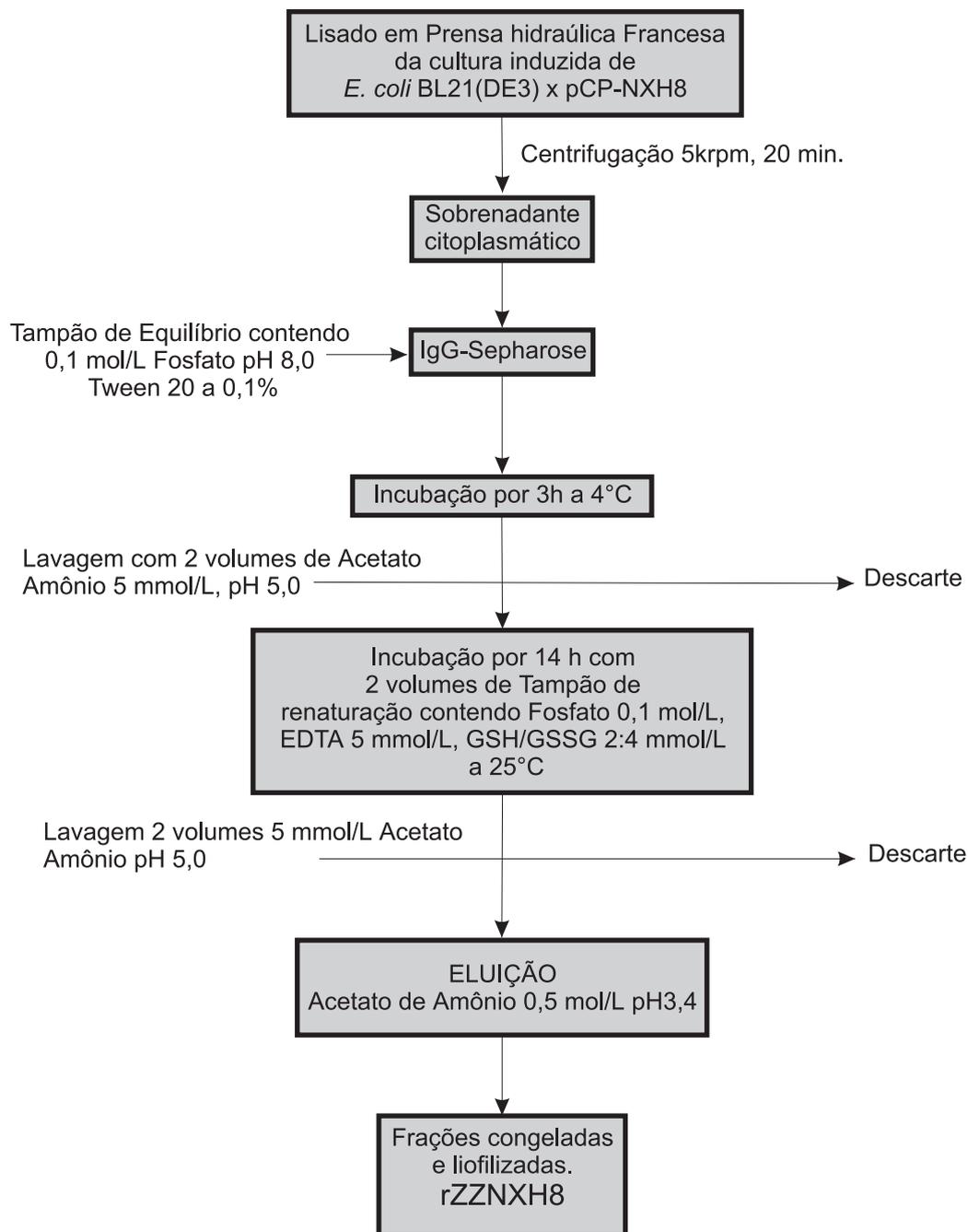


FIGURA 24: Protocolo de Renaturação e Purificação da proteína de fusão recombinante rZZNXH8 expressa pelo vetor pCP-NXH8 em *E. coli* BL(DE3) por cromatografia de imunoafinidade IgG-Sepharose (DREVET et al., 1997).

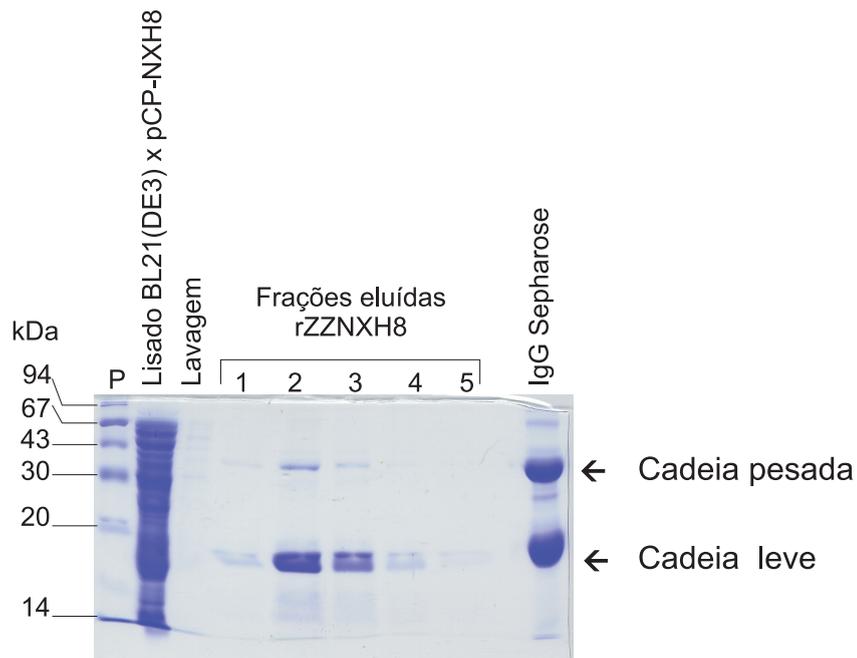


FIGURA 25: Purificação da proteína recombinante renaturada rZZNXH8 expressa por pCP-NXH8 em *E. coli* BL21(DE3) em cromatografia de imunoafinidade por IgG-Sepharose.

SDS-PAGE a 12% corado por Comassie Blue R250. P - Padrão de proteínas (Pharmacia). As amostras eluídas da coluna a pH3,4 foram neutralizadas com Tris 250 mmol/L pH9,5. IgG Sepharose - resina de cromatografia. As cadeias leve e pesada da IgG estão indicadas.



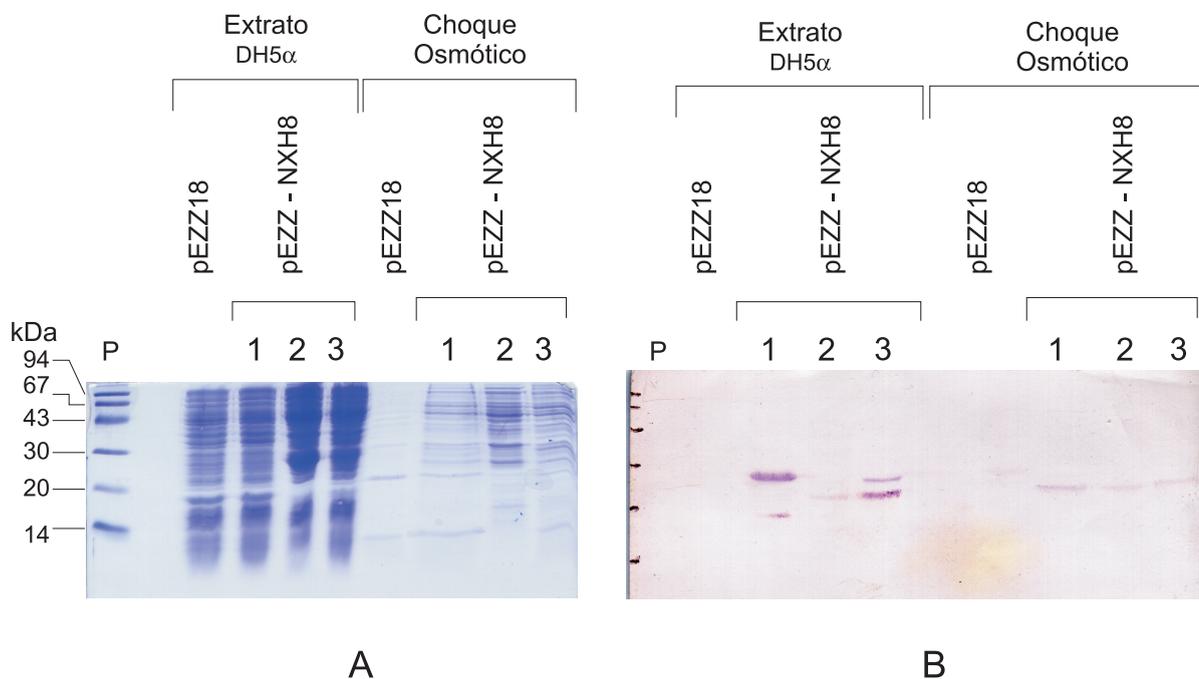


FIGURA 27: Expressão e Western blot da proteína recombinante expressa por pEZZ-NXH8 em *E. coli* DH5 $\alpha$ .

A) SDS-PAGE a 15% corado com Comassie Blue R250: Extratos totais de cultura bacteriana induzida com IPTG 1mmol/L transformada com os plasmídios indicados e os respectivos fluídos obtidos por choque osmótico. P - Padrão de proteínas (Pharmacia); 1 - Indução por 1 hora; 2 - Indução por 2 horas; 3 - Indução por 3 horas.

B) Western blot: membrana de nitrocelulose com os mesmos extratos totais e fluídos osmóticos do SDS-PAGE. Primeiro anticorpo: soro eqüino anti - elapídico do Instituto Butantan. Segundo anticorpo: IgG caprina biotinilada anti - IgG eqüina (Sigma). O Western blot foi revelado com PALP-Estreptoavidina/BCIP e NBT. Os anticorpos primários foram utilizados na diluição 1:1000 em tampão de bloqueio.

Oligo direto: Hibridiza em pCPZZ - NXH8 na região 1353 -1370

*BamH I*                      *Nde I*  
 G ACG GAT CCG CAT ATG GCG CAA CAC GAT GAA CC

Oligo reverso: Hibridiza a partir do sinal de poli A<sup>+</sup> na região 3' não traduzida de nxh8 (460- 420)

*Xho I*  
 CCG GAA TTC TCG AGG ATC CCG TTT ATT CGA TTC TCA AAC T  
*EcoR I*                      *BamH I*

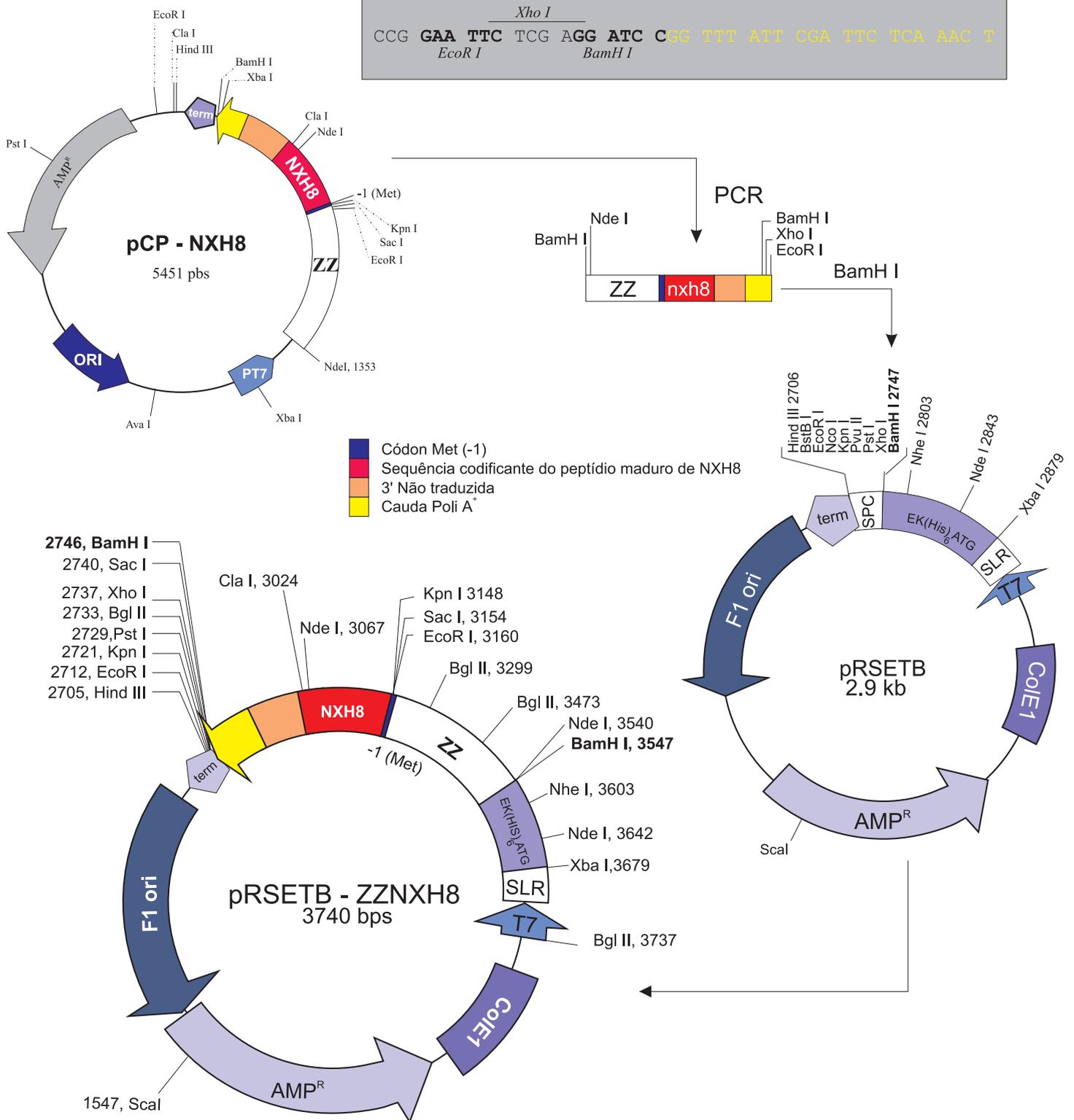


FIGURA 28: O vetor pRSET B - ZZNxH8

O vetor pCP - NXH8 foi utilizado como molde para PCR utilizando dois oligos que amplificam a seqüência codificante para a fusão ZZ-NXH8. O produto digerido com BamH I foi clonado no vetor pRSET B no sítio BamH I. O vetor recombinante pRSET-ZZNxH8 expressa a fusão ZZNxH8 com uma cauda de Histinas N-terminais na forma solúvel.

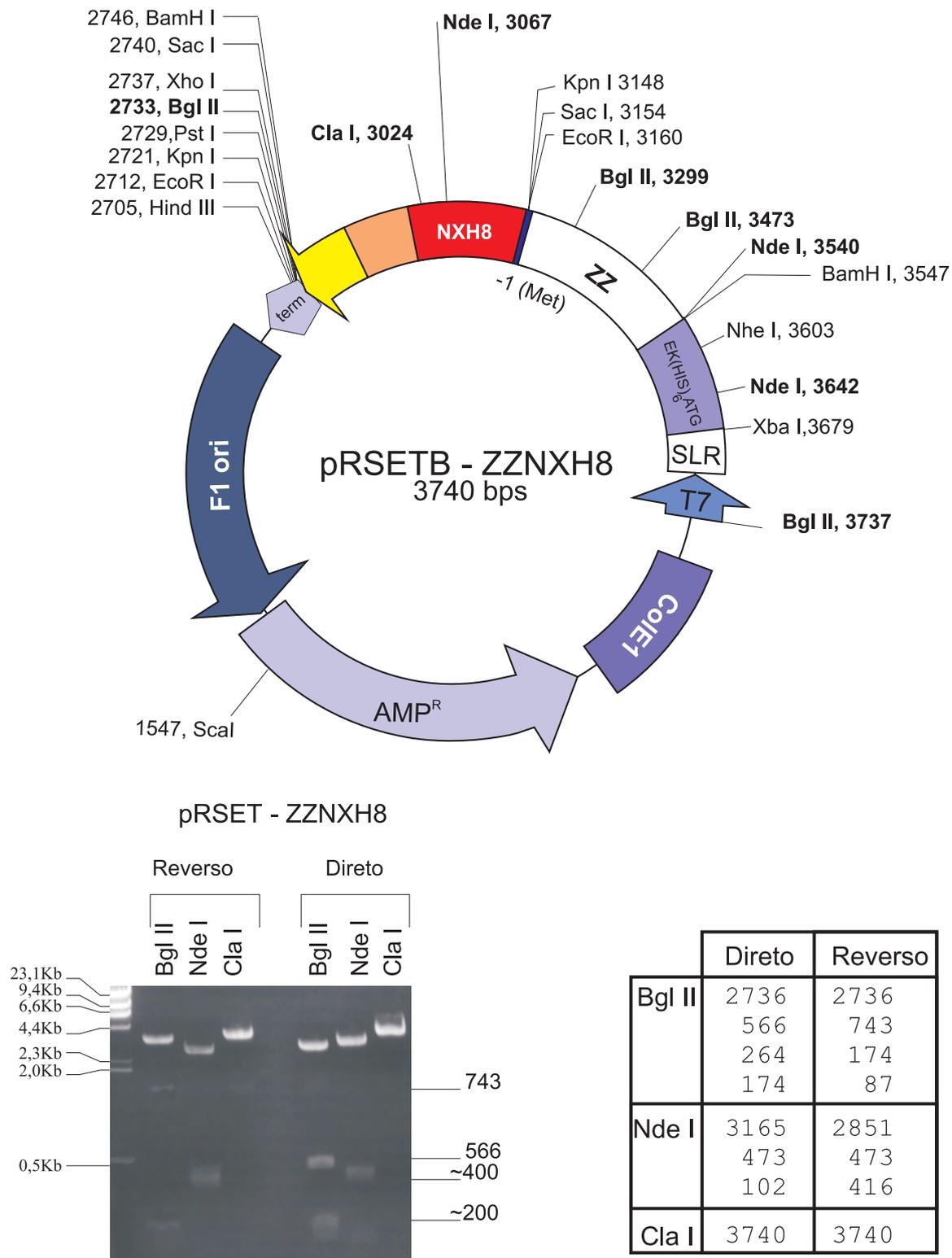


FIGURA 29: Análise de restrição do vetor pRSETB-ZZNXH8

O produto de PCR foi clonado em BamH I no vetor pRSETB originando plasmídios recombinantes com o inserto em ambas as orientações em relação ao promotor de T7. O vetor recombinante direto, com o inserto codificante para a fusão ZZNXH8, foi selecionado por análise de restrição usando as enzimas Bgl II e Nde I, baseado na correspondência dos tamanhos dos fragmentos esperados. O sítio para Cla I está presente apenas na seqüência codificante para NXH8.

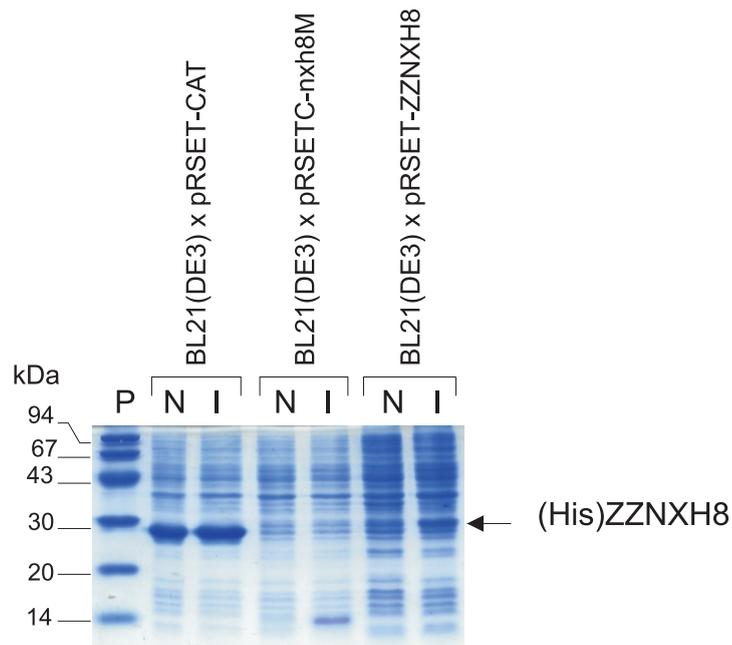


FIGURA 30: Expressão de pRSETB-ZZNXH8 em *E. coli* BL21(DE3).

SDS-PAGE a 15% corado com Comassie Blue R250 com extratos totais de culturas bacterianas transformadas com os plasmídios indicados. Indução por 1 hora com IPTG 1 mmol/L a 37°C. Os vetores pRSET-CAT e pRSETC-nxh8M foram utilizados como controles da expressão. P - Padrão de proteínas (Pharmacia); N - Não induzido; I - Induzido. A localização provável da proteína recombinante (His)ZZNXH8 expressa por pRSETB-ZZNXH8 em BL21(DE3) está indicada pela seta.

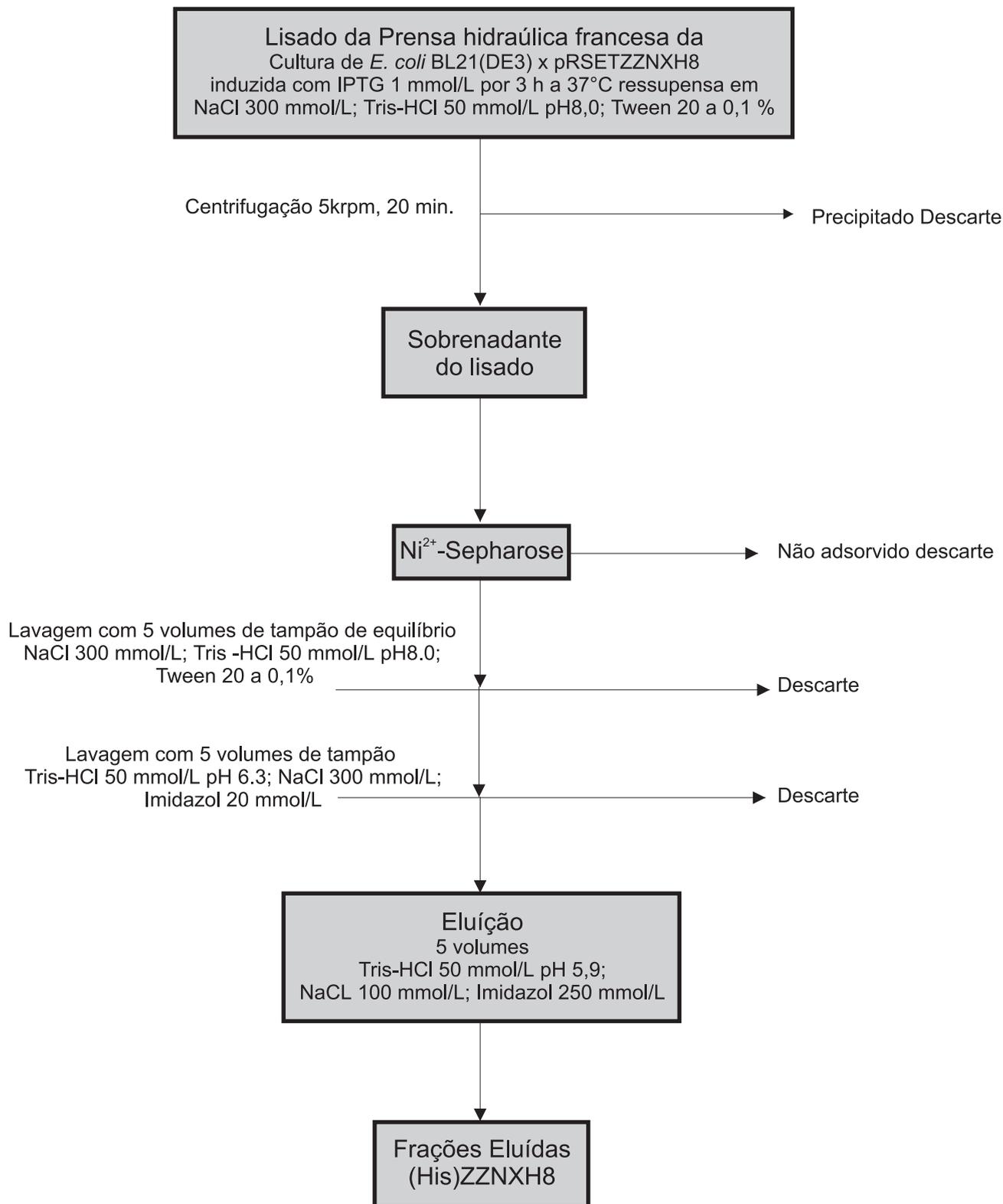


FIGURA 31: Protocolo de purificação da proteína de fusão recombinante (His)ZZNXH8 expressa pelo vetor pRSETB-ZZNXH8 em *E. coli* BL21(DE3) por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup>-Sepharose.

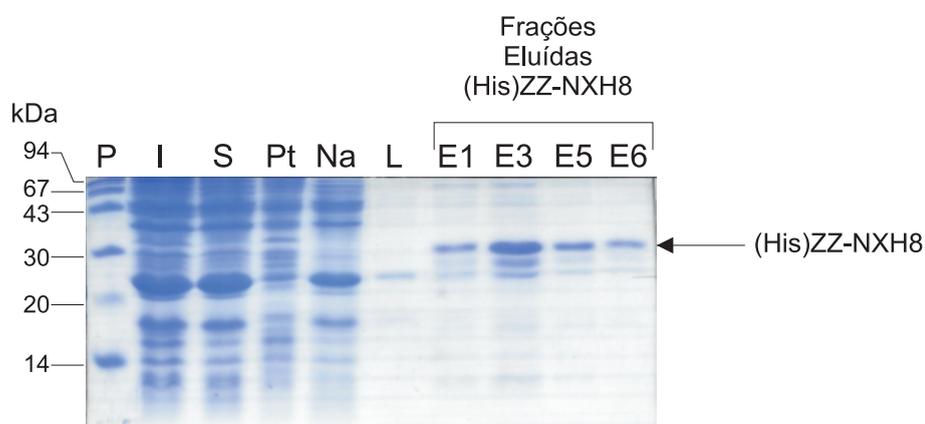


FIGURA 32: Purificação da proteína de fusão recombinante (His)ZZ-NXH8 expressa por pRSET-ZZNXH8 em *E. coli* BL21(DE3) por cromatografia de afinidade em Ni<sup>+2</sup>-Sephrose.

SDS-PAGE a 15% corado por Comassie Blue R250 com frações resultantes do protocolo de purificação da figura anterior. P- Padrão de proteínas (Pharmacia); I -Extrato total da cultura bacteria *E. coli* BL21(DE3) x pRSET ZZ-NXH8 induzida; S - Sobrenadante do lisado em french press; Pt - Precipitado do lisado; Na - Material não adsorvido (Flow thru); L - Lavagem com tampão pH6.3; E1; E3; E5; E6 - Frações eluídas de (His)ZZ-NXH8 purificada.

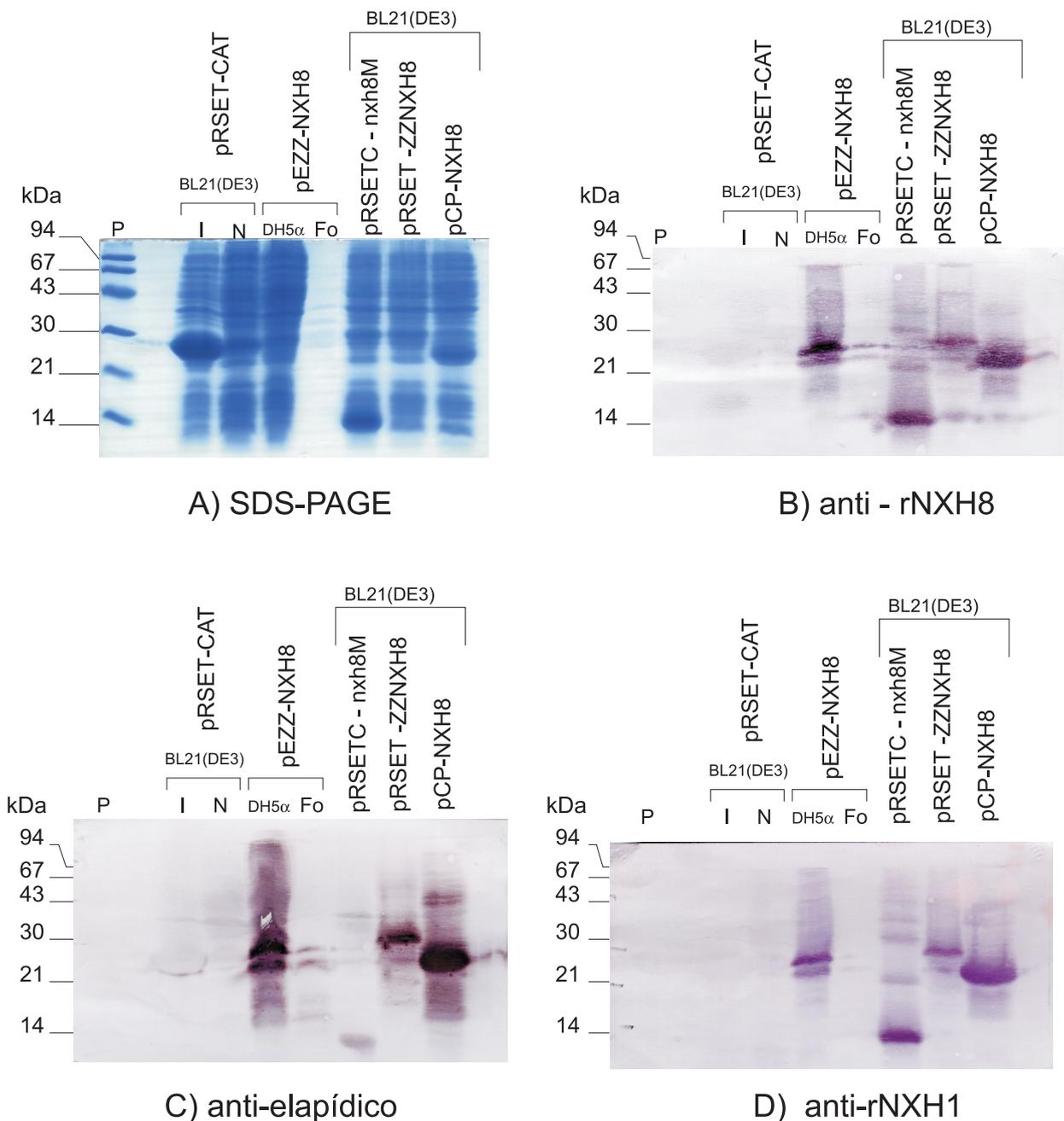
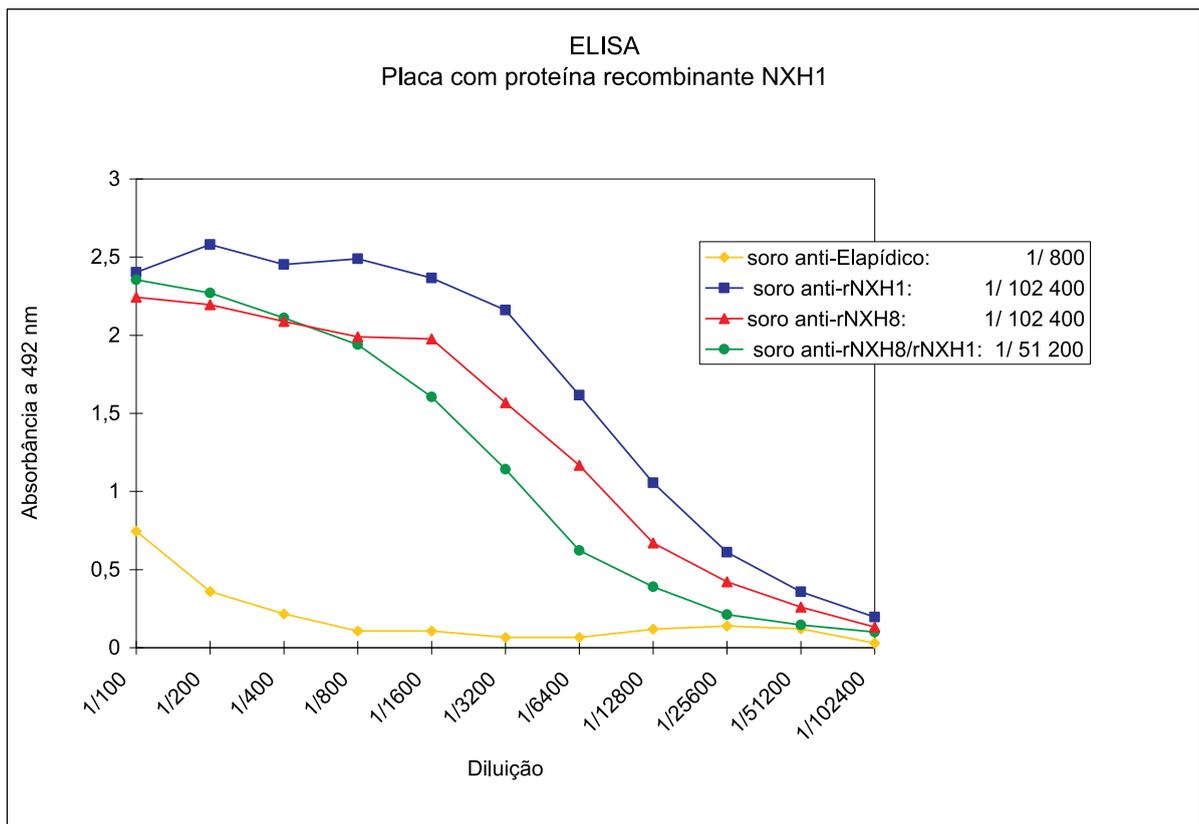
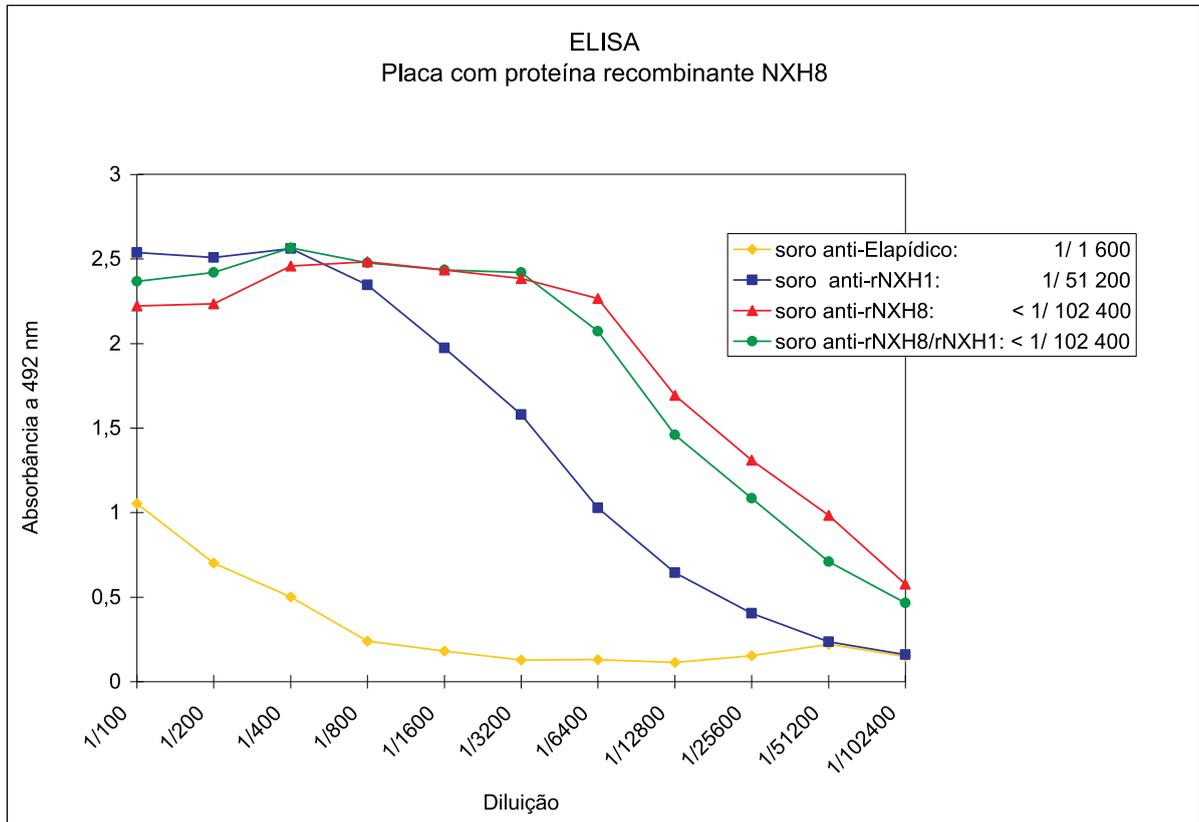


FIGURA 33: Imunorreatividade do soro anti-elapídico e anticorpos de camundongo anti-toxinas recombinantes em Western blots contendo extratos de *E. coli* transformadas com os sistemas de expressão de NXH8.

A) SDS-PAGE a 15% corado por Coomassie Blue R250 contendo extratos totais de BL21(DE3) ou DH5α. Fo - Fluido obtido por choque osmótico de DH5α. P - Padrão de proteínas (Pharmacia). B) Western blot com o anticorpo primário soro murino anti - rNXH8 e anticorpo secundário IgG caprina biotinizada anti - IgG murina. C) Western blot com anticorpo primário soro eqüino anti - elapídico e o anticorpo secundário IgG caprina biotinizada anti - IgG eqüina. D) Western blot com o anticorpo primário soro murino anti - rNXH1 e anticorpo secundário IgG caprina biotinizada anti - IgG murina. Os anticorpos primários foram utilizados na diluição 1:500 na solução de bloqueio. Os Westerns blots foram revelados com PALP-Estreptoavidina/BCIP e NBT usando imunoconjugados da Sigma.



**FIGURA 34:** Resultados do ELISA para determinação dos títulos dos soros.

As reações de ELISA foram feitas em placas sensibilizadas com as proteínas recombinantes rNXH8 e rNXH1 purificadas em Ni<sup>2+</sup>-Sepharose, como indicado nos gráficos. Os títulos para os soros anti-elapídico, anti-rNXH1, anti-rNXH8 e anti-rNXH8/rNXH1 estão indicados na legenda.

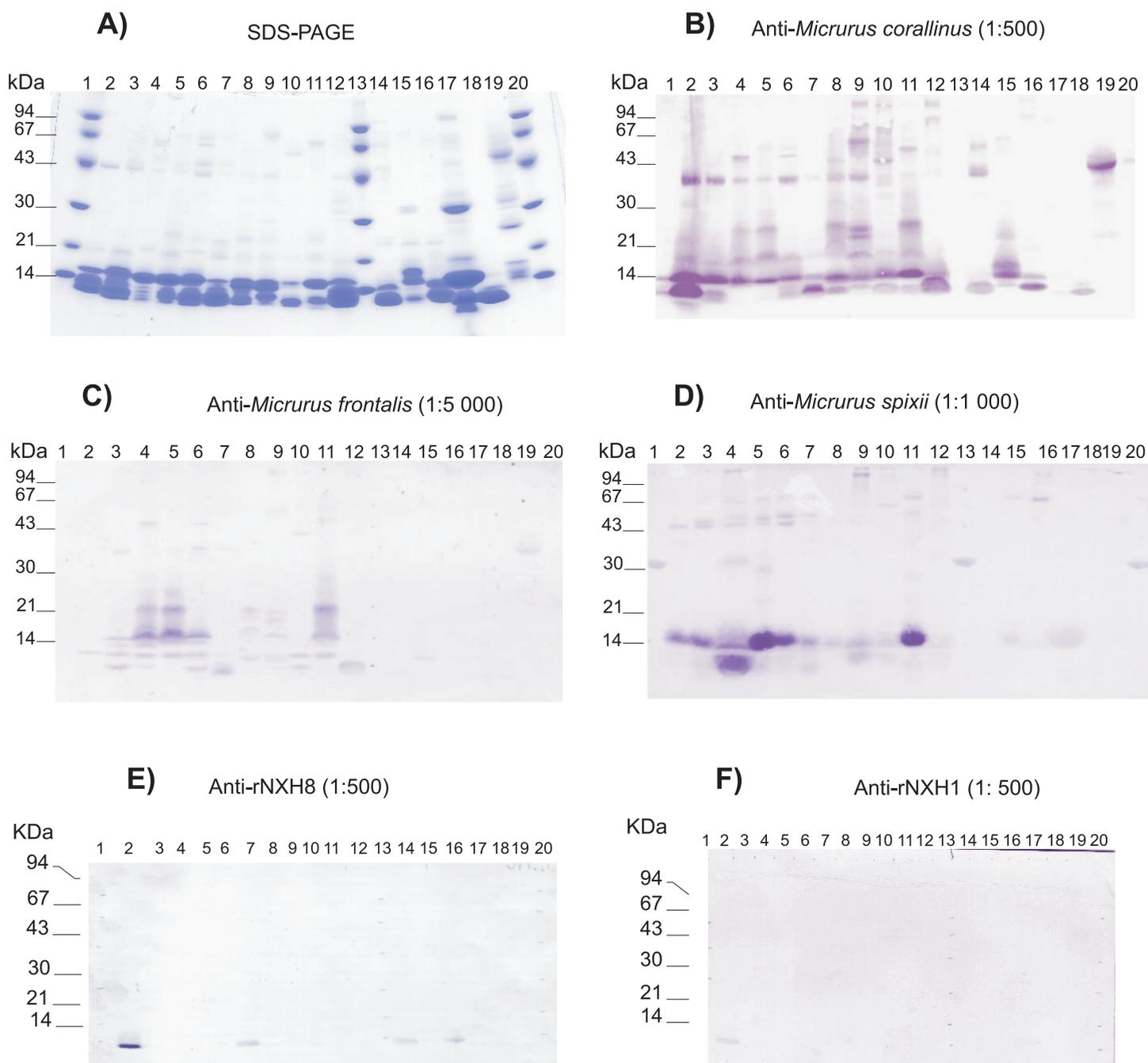


FIGURA 35: Imunorreatividade dos soros contra as proteínas recombinantes rNXH8 e rNXH1 e de alguns soros produzidos contra venenos de serpentes do gênero *Micrurus* frente a diversos venenos homólogos e heterólogos.

A) SDS-PAGE Gradiente 10 - 20%, corado por Comassie Blue R250; B) Western Blot com soro anti - *Micrurus corallinus*; C) Western Blot com soro anti - *M. frontalis*; D) Western Blot com soro anti - *M. spixii*; E) Western Blot soro com anti - rNXH8; F) Western Blot com soro anti-rNXH1

01, 13 e 20) Padrão de proteínas. Venenos de: 02) *M. corallinus*; 03) *M. ibiboboca*; 04) *M. lemniscatus*; 05) *M. spixii*; 06) *M. frontalis*; 07) *M. frontalis altirostris*; 08) *M. surinamensis*; 09) *M. carinicauda dumerilli*; 10) *M. hemprichii*; 11) *M. spixii martiusii*; 12) *M. decoratus*; 14) *Dendroapis angusticeps*; 15) *Notechis scutatus scutatus*; 16) *Bungarus multicinctus*; 17) *Crotalus durissus terrificus*; 18) Cardiotoxina de *Naja naja kaouthia*; 19) *Bothrops jararaca*.

## Ligação de $I^{125}$ - $\alpha$ - Bungarotoxina

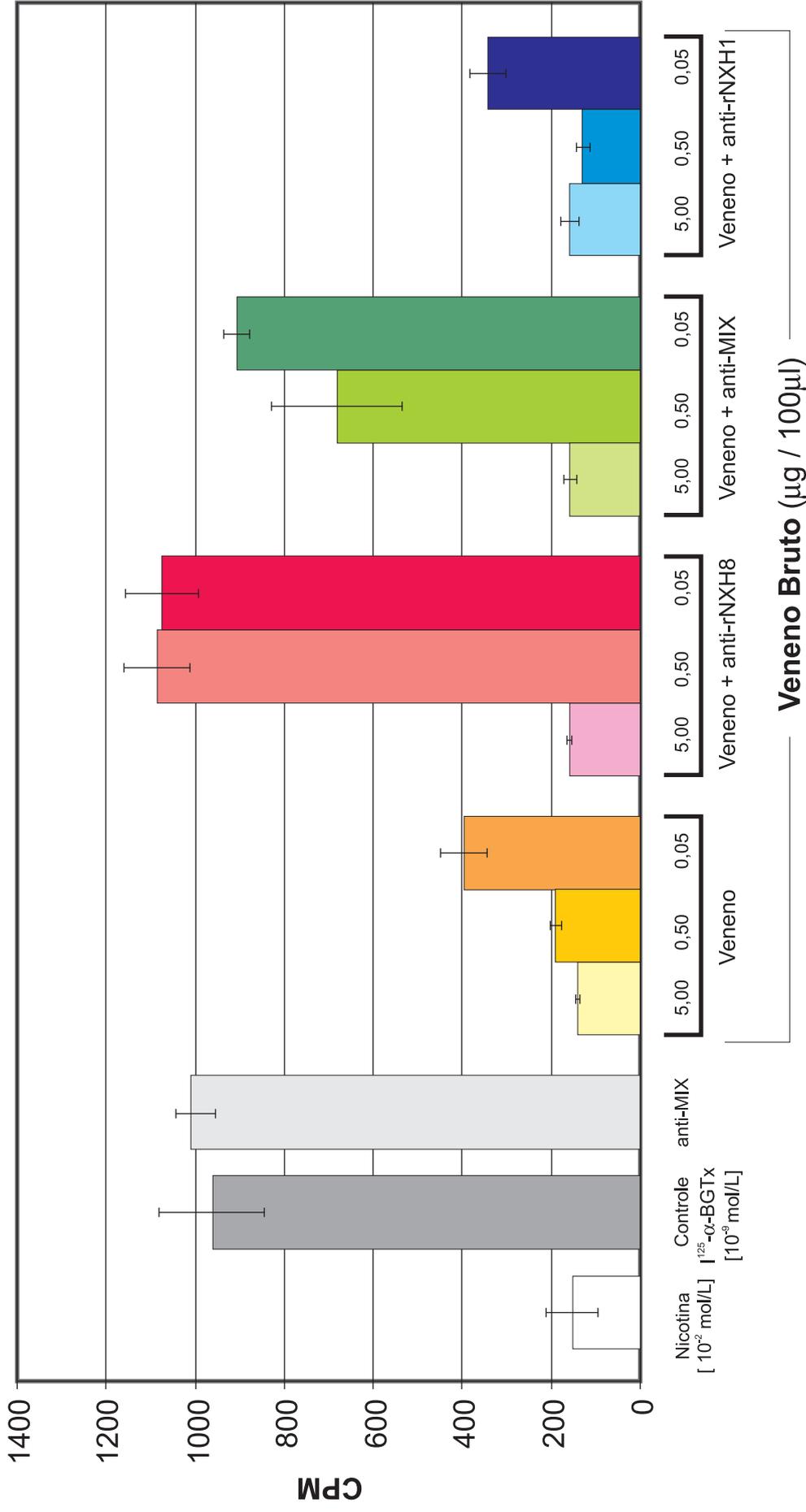


FIGURA 36: Ensaio de inibição por competição do veneno de *M. corallinus* com  $I^{125}$ - $\alpha$ -Bungarotoxina pelo receptor nicotínico de acetilcolina do músculo esquelético de ratos neonatos e neutralização por anticorpos.

Testou-se a competição do veneno bruto de *M. corallinus* contra  $I^{125}$ - $\alpha$ -BGTx pelo nAChR e a inibição da ligação do veneno bruto quando incubado com os soros produzidos contra as proteínas recombinantes rNXH1 e rNXH8. Controles: Nicotina;  $I^{125}$ - $\alpha$ -BGTx;  $I^{125}$ - $\alpha$ -Bungarotoxina; anti-MIX: soro anti-rNXH8/rNXH1.

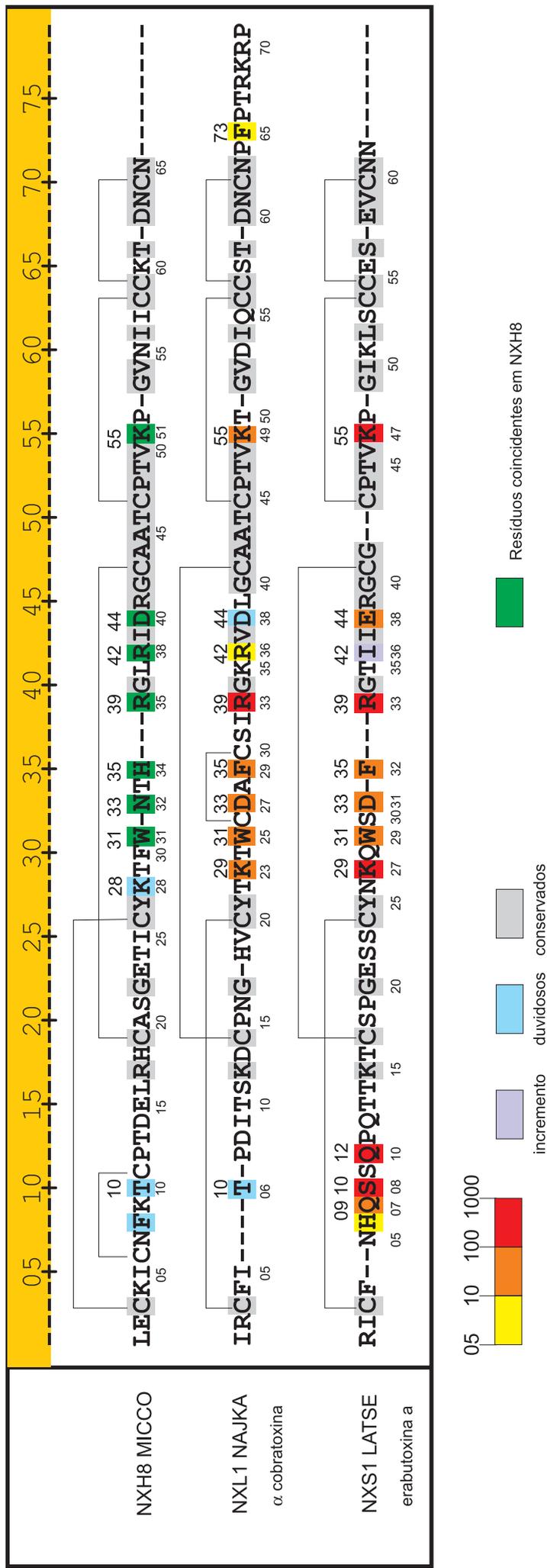


FIGURA 37: Aminoácidos responsáveis pelo sítio de ligação das  $\alpha$ -neurotoxinas ao receptor nicotínico de acetilcolina do músculo esquelético.

**NXH8 MICCO**: Sequência do peptídeo maduro do clone *nxh8* de *Micrurus corallinus*. Em verde são mostrados os resíduos de aminoácidos de NXH8 que são compartilhados com o provável sítio de afinidade e seletividade pelo AChR das  $\alpha$ -neurotoxinas curtas e longas. **NXL1 NAJKA**: Neurotoxina longa 1 de *Naja kaouthia* ( $\alpha$ -cobrattoxina). **NXS1 LATSE**: Neurotoxina curta 1 de *Laticauda semifasciata* (erabutoxina a). Em amarelo estão indicados os resíduos funcionais, que quando mutados causam um decréscimo de 5 a 10 vezes na afinidade pelo receptor. Em laranja aqueles que reduzem a afinidade entre 10 a 100 vezes. E em vermelho aqueles que causam uma redução da afinidade superior a 100 vezes. Em cinza estão indicados os aminoácidos conservados que desempenham um possível papel estrutural. Em azul são indicados resíduos duvidosos de NXH8 que podem desempenhar papel funcional similar a outros presentes nas neurotoxinas. São mostrados também em azul, resíduos duvidosos da  $\alpha$ -cobrattoxina que alteram pouco a afinidade pelo receptor quando mutados, mas que em outras neurotoxinas longas podem ser funcionalmente implicados na ligação. Em roxo é indicado um resíduo de erabutoxina que se mutado para Lys ou Arg aumenta a afinidade pelo receptor. Os números superiores indicam a posição no alinhamento da família de toxinas em três dígitos, os inferiores a posição real na cadeia da toxina.

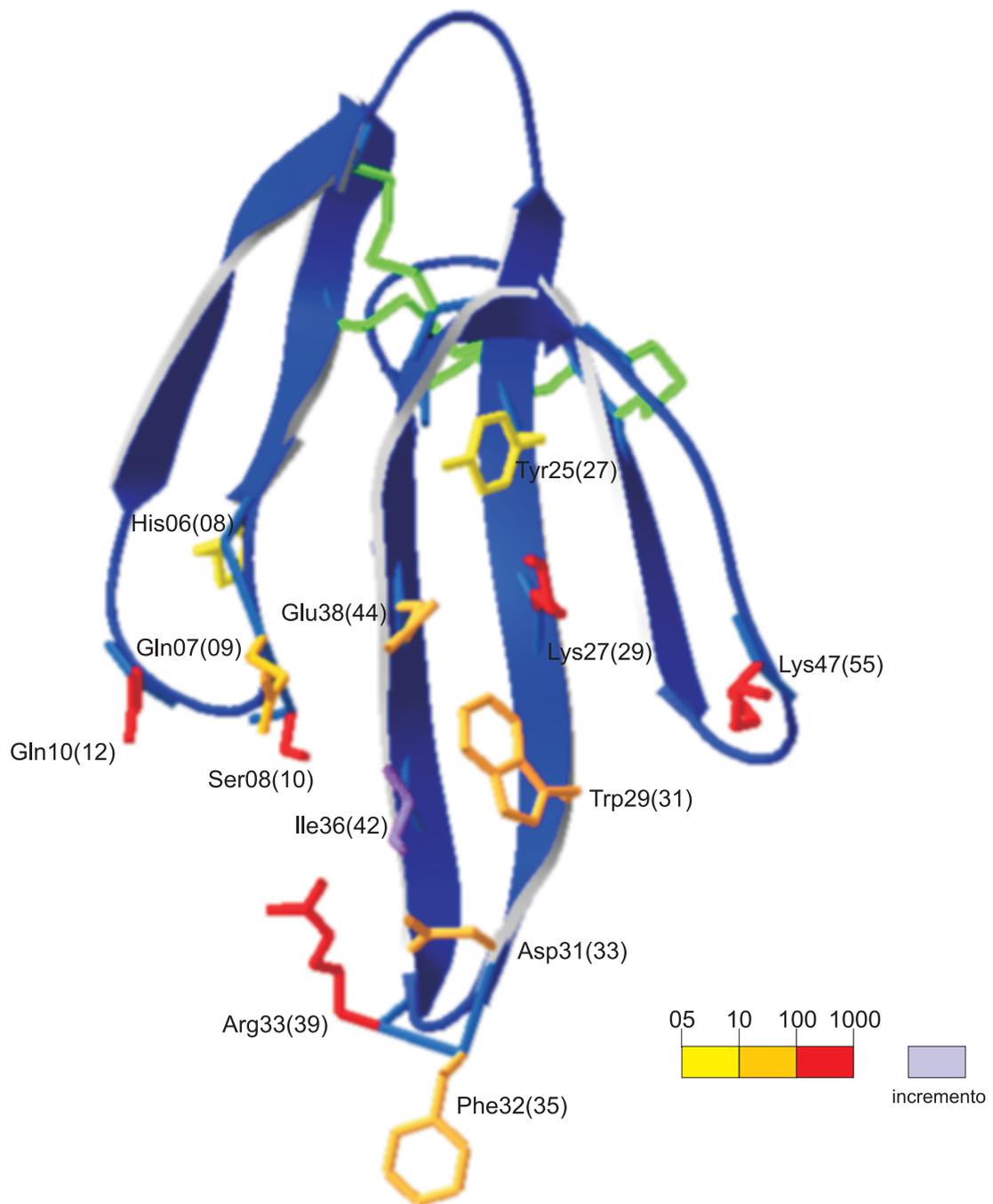
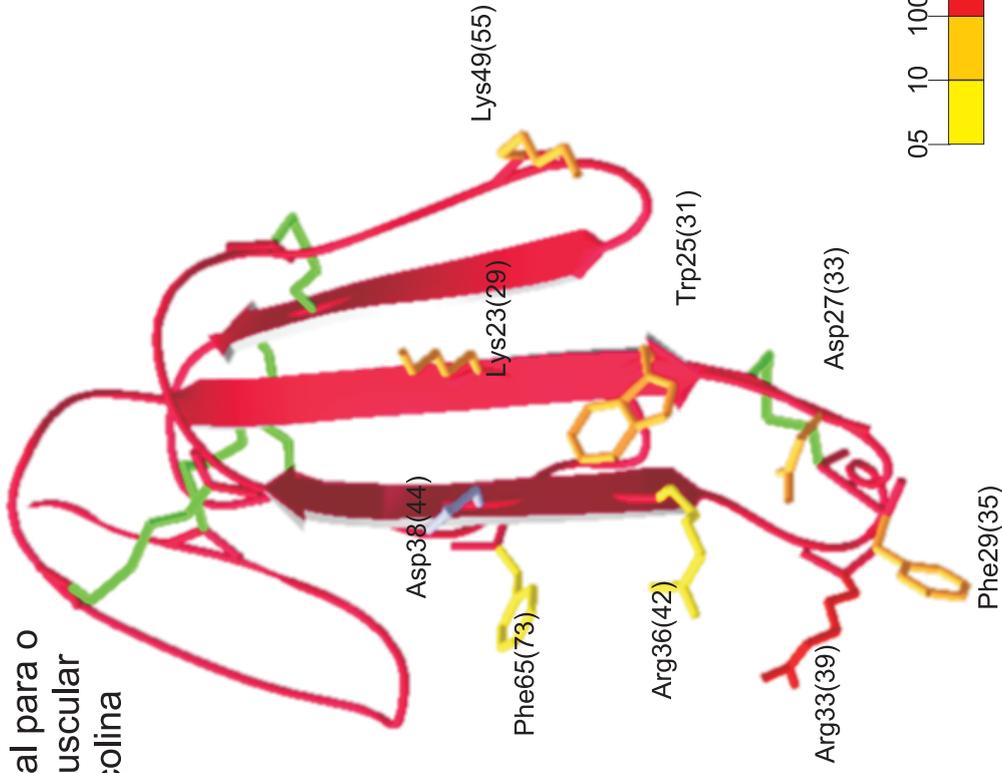


FIGURA 38: Modelo estrutural da erabutoxina a mostrando seu sítio funcional.

Em verde são mostradas as pontes dissulfeto. Em amarelo as cadeias laterais dos resíduos que quando mutados causam um decréscimo na afinidade pelo nAChR de 05 a 10 vezes. Em laranja as cadeias laterais dos resíduos que causam um decréscimo na afinidade entre 10 a 100 vezes. Em vermelho são mostrados os resíduos que quando mutados causam um decréscimo de mais de 100 vezes. Em lilás é mostrado um resíduo que se mutado para arginina pode aumentar a afinidade pelo receptor. O número indica a posição do resíduo na cadeia e o número entre parenteses indica a posição no alinhamento.

**A**

Sítio Funcional para o Receptor Muscular de Acetilcolina

**B**

Sítio Funcional para o Receptor Neuronal  $\alpha 7$

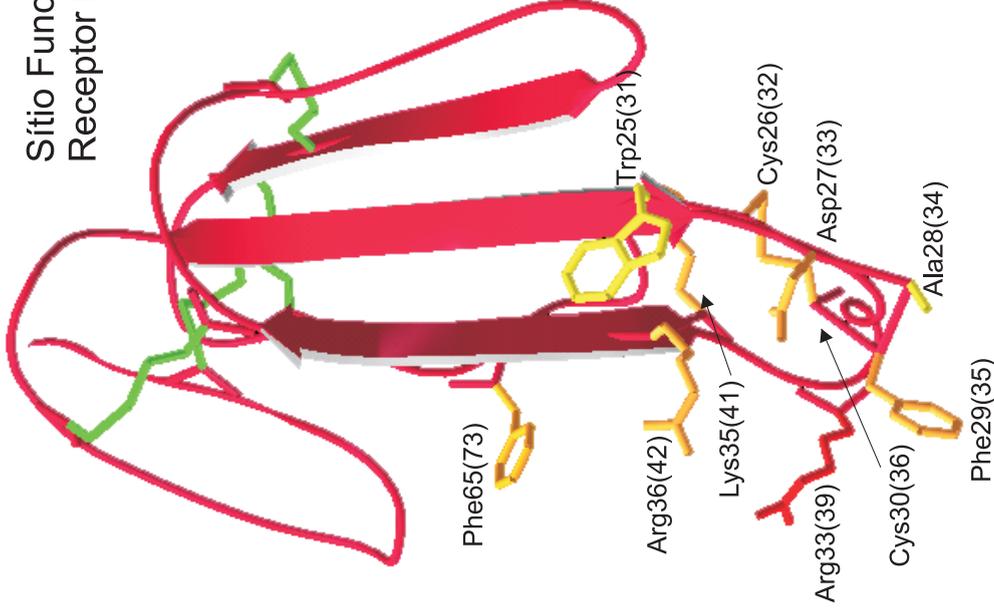


FIGURA 39: Modelo estrutural da  $\alpha$ -cobrotóxina mostrando sítios funcionais para dois tipos de receptores de acetilcolina.

Em verde são mostradas as pontes dissulfeto. Note que a ponte dissulfeto da ponta da segunda alça desempenha papel funcional na seletividade pelo receptor neuronal de acetilcolina do tipo  $\alpha 7$ . Em amarelo são mostradas as cadeias laterais de resíduos, que quando mutados causam um decréscimo na afinidade pelo receptor entre 05 a 10 vezes. Em laranja são mostrados aqueles resíduos, que quando mutados causam redução na afinidade entre 10 e 100 vezes e em vermelho aqueles que são responsáveis por decréscimos na afinidade superiores a 100 vezes. Em itálico é mostrado o aminoácido Asp38(44) de papel duvidoso. O número indica a posição do aminoácido na cadeia da toxina. O número entre parênteses indica a posição no alinhamento.

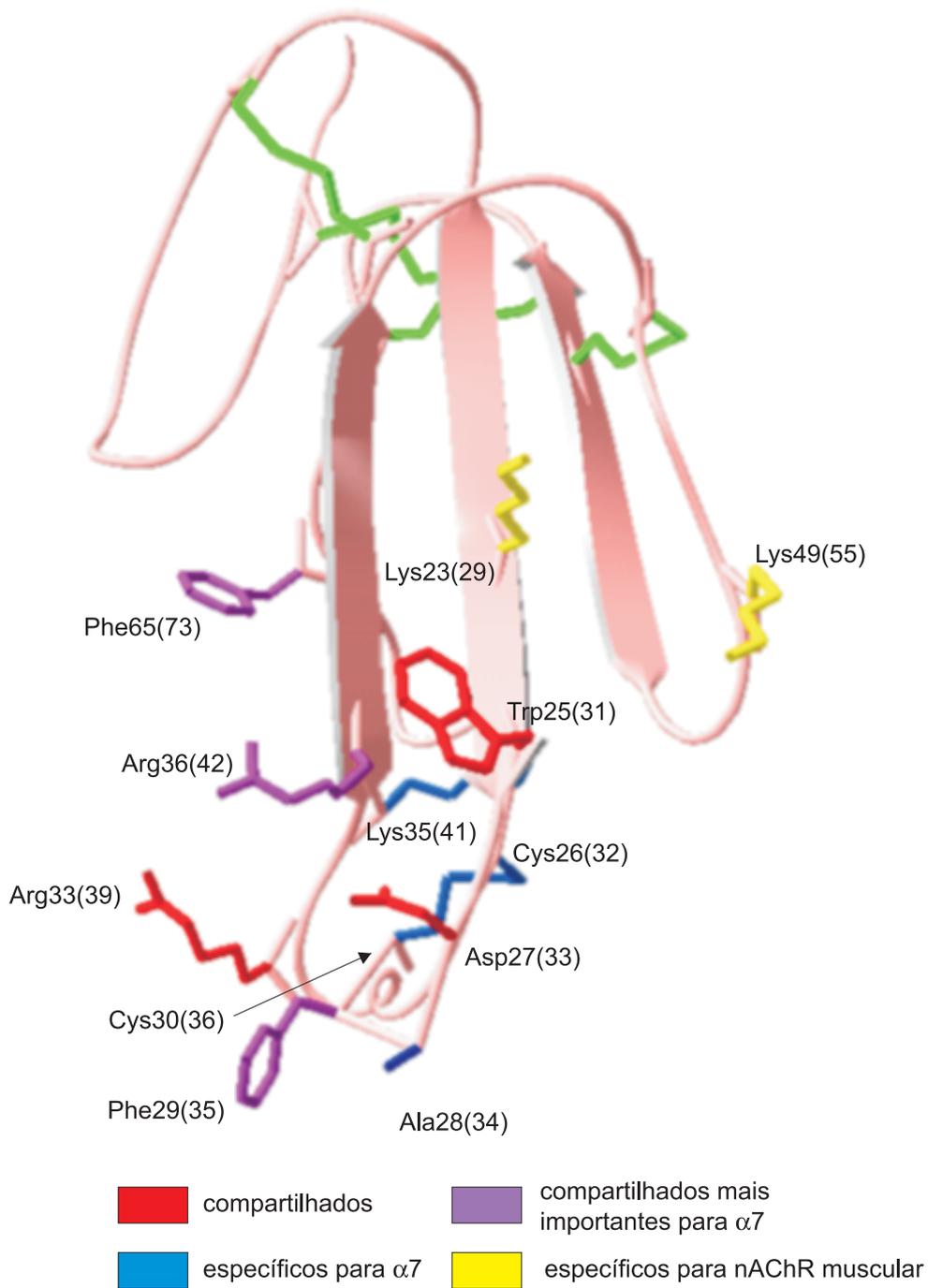


FIGURA 40: Sobreposição dos sítios funcionais da  $\alpha$ -Cobrotoxina que interagem com os subtipos de receptor de acetilcolina muscular e  $\alpha 7$ -neuronal.

Resíduos cuja mutação causa decréscimo significativo e similar na afinidade por ambos os receptores, são mostrados em vermelho. Em roxo são mostrados aqueles que quando mutados, causam um decréscimo na afinidade maior pelo  $\alpha 7$  do que pelo nAChR muscular. Em amarelo estão os resíduos envolvidos especificamente na ligação pelo nAChR muscular. Em azul, são mostrados aqueles específicos para a ligação pelo subtipo neuronal  $\alpha 7$ .

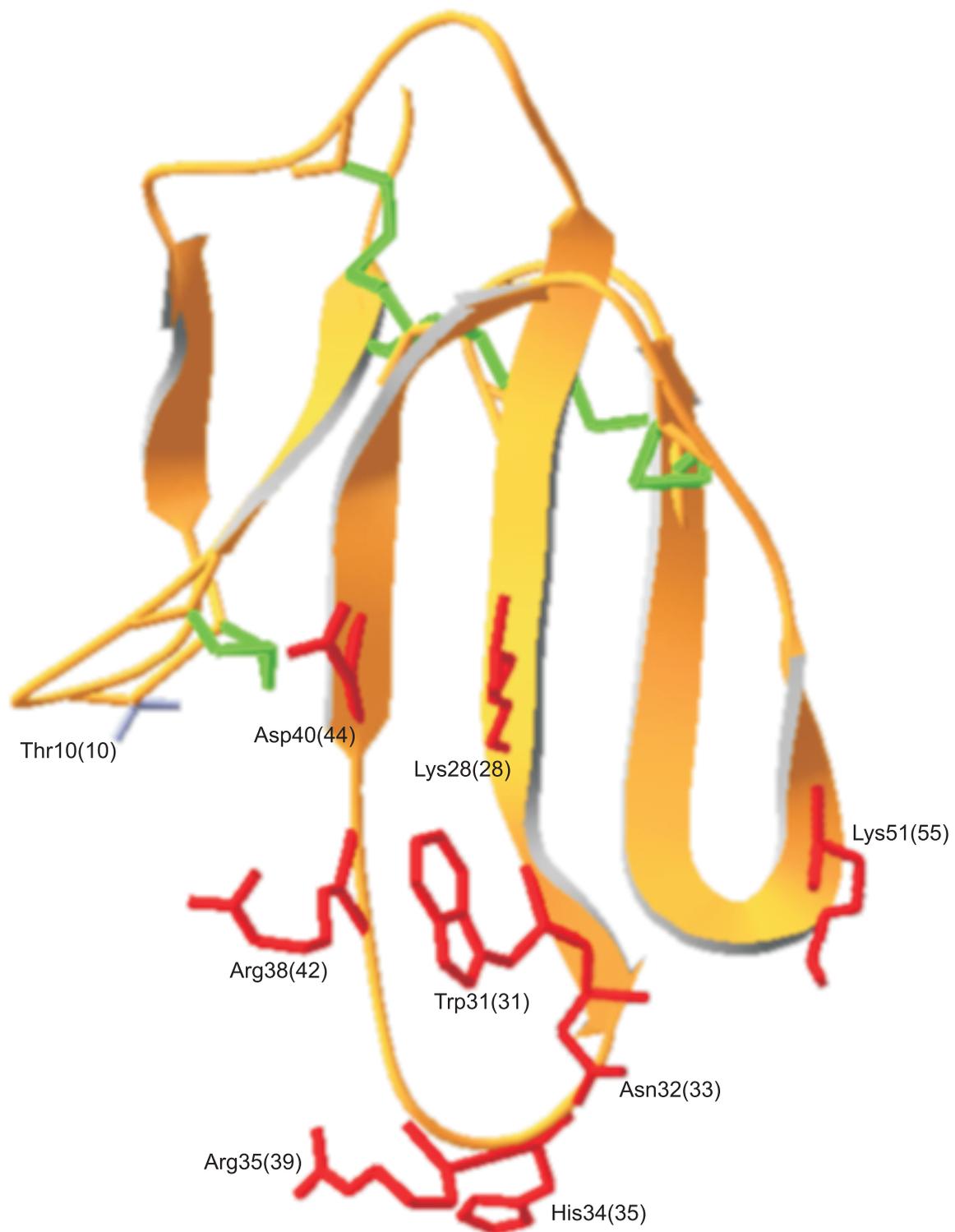


FIGURA 41: Modelo tridimensional de NXH8 ilustrando o possível sítio funcional.

Os resíduos de NXH8 similares e alinhados com aqueles que são responsáveis pela afinidade pelo receptor de acetilcolina das  $\alpha$ -neurotoxinas curtas e longas são mostrados em vermelho. Em verde estão indicadas as pontes dissulfeto e em lilás um resíduo de treonina conservada nas  $\alpha$ -neurotoxinas longas e que faz contato com o nAChR, como é o caso da  $\alpha$ -bungarotoxina. O número indica a posição do resíduo na cadeia da proteína e o número entre parênteses indica a posição no alinhamento.

## TABELAS

**TABELA 01: Seqüências similares ao precursor de NXH8 MICCO.**

Toxina	Descrição	Acesso	Espécie de serpente	Escore	Valor E
NXLH_BUNMU	Long Neurotoxin Homolog Precursor	P15818	<i>Bungarus multicinctus</i>	104	4e-23
NXSB_NAJAT	Short Neurotoxin Precursor (Cobrotoxin B)	P80958	<i>Naja atra</i>	90	9e-19
CADO_BUNCA	Candoxin	P81783	<i>Bungarus candidus</i>	88	6e-18
NXS1_NAJAT	Short Neurotoxin 1 Precursor (Cobrotoxin)	P01430	<i>Naja atra</i>	87	8e-18
NXS2_AIPLA	Short Neurotoxin B Precursor	P19959	<i>Aipysurus laevis</i>	83	2e-16
NXS4_AIPLA	Short Neurotoxin D Precursor	P19960	<i>Aipysurus laevis</i>	82	3e-16
TXW1_NAJAT	Probable Weak Neurotoxin NNAM1 Precursor	Q9YGI2	<i>Naja atra</i>	76	3e-14
NXS1_LATSE	Short Neurotoxin 1 Precursor (Erabutoxin A)	P01435	<i>Laticauda semifasciata</i>	75	5e-14
XXX9_NAJAT	Probable Weak Neurotoxin Ta-N9 Precursor	Q9YGI4	<i>Naja atra</i>	73	2e-13
TXWK_NAJAT	Kappa-Cobrotoxin Precursor.	O93422	<i>Naja atra</i>	73	2e-13

**TABELA 02: Seqüências similares ao peptídeo maduro NXH8**

Toxina	Descrição	Acesso	Espécie de serpente	Escore	Valor E
CADO_BUNCA	Candoxin	P81783	<i>Bungarus candidus</i>	88	4e-18
NXLH_BUNMU	Long Neurotoxin Homolog Precursor	P15818	<i>Bungarus multicinctus</i>	86	1e-17
NXS1_PSEAU	Short Neurotoxin 1 (Neurotoxin Pa A)	P25497	<i>Pseudechis australis</i>	73	1e-13
NXL1_NAJHC	Long Neurotoxin 1 (Toxin III)	P01389	<i>Naja haje anchietae</i>	72	2e-13
NXSB_NAJAT	Short Neurotoxin Precursor (Cobrotoxin B)	P80958	<i>Naja atra</i>	71	3e-13
NXS1_BOUCH	Short Neurotoxin 1	P34076	<i>Boulengerina christyi</i>	71	3e-13
NXL1_ASPSC	Long Neurotoxin 1 (Toxin S4C6)	P25670	<i>Aspidelaps scutatus</i>	71	3e-13
NXS1_NAJOX	Short Neurotoxin 1 (Neurotoxin Alpha)	P01427	<i>Naja naja oxiana</i>	71	4e-13
NXL1_OPHHA	Long Neurotoxin 1 (Neurotoxin A)	P01387	<i>Ophiophagus hannah</i>	71	6e-13
NXS1_NAJPH	Short Neurotoxin 1	P01428	<i>Naja philippinensis</i>	70	1e-12

**TABELA 03: Vetores recombinantes utilizados para expressar NXH8 em *E. coli*.**

Vetor	Finalidade	Hospedeiro	Promotor	Indução	Proteína de fusão	Purificação	Produto	Clivagem
pGEM3Zf (+)-nxh8	Amplificação e seqüenciamento	DH5 $\alpha$	SP6/T7	-	-	-	-	-
pRSETB-SSnxh8	Expressão no citoplasma, ou periplasma (?)	BL21(DE3)	T7	IPTG	Peptídeo N-terminal com cauda de 6(His)-EK - precursor de nxh8	Ni <sup>2+</sup> - Sepharose	-	-
pRSETC-nxh8M	Expressão no citoplasma em corpúsculos de Inclusão	BL21(DE3)	T7	IPTG	Peptídeo N-terminal com cauda de 6(His)-EK - peptídeo maduro NXH8	Ni <sup>2+</sup> - Sepharose	rNXH8	enteroquina se DRWI- NXH8
pCP-NXH8	Expressão no citoplasma Solúvel	BL21(DE3)	T7	IPTG	Domínios ZZ - (Met) peptídeo maduro NXH8	IgG- Sepharose	rZZNXH8	CNBr NXH8
pEZZ-NXH8	Expressão no periplasma ou secreta no meio de cultura	DH5 $\alpha$	lacUV5 P pspA	Constitutivo	Domínios ZZ - (Met) peptídeo maduro NXH8	IgG- Sepharose	ZZNXH8	CNBr NXH8
pRSETB-ZZNXH8	Expressão no citoplasma solúvel	BL21(DE3)	T7	IPTG	Peptídeo N terminal com cauda 6(His)-ZZ-(Met) peptídeo maduro NXH8	Ni <sup>2+</sup> - Sepharose e IgG- Sepharose	(His)ZZNXH8	CNBr NXH8

EK – Sítio de clivagem para enteroquinase. CNBr- Cliva na metionina da posição -1

**TABELA 04: Esquema do ensaio de inibição por competição do veneno de *M. corallinus* com  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -Bungarotoxina pelo receptor nicotínico de acetilcolina do músculo esquelético de ratos neonatos e neutralização por anticorpos contra as toxinas recombinantes NXH8 e NXH1.**

Tubos	Tampão BSA 10X *	membranas *	Tampão ligação *	Nicotina ( $10^{-1}$ mol/L) *	Ensaio 1h de incubação	$^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BGTX ( $10^{-8}$ mol/L) *	CATEGORIAS
01, 02 e 03	10	20	50	10	-	10	nicotina $10^{-2}$ mol/L
04, 05 e 06	10	20	60	-	-	10	controle $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BGTX ( $10^{-9}$ mol/L)
07, 08 e 09	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ anti-MIX	10	soro anti-MIX
10, 11 e 12	10	20	55	-	5 $\mu\text{L}$ de veneno 1X	10	5,00 $\mu\text{g}$ de veneno
13, 14 e 15	10	20	55	-	5 $\mu\text{L}$ de veneno 10X	10	0,50 $\mu\text{g}$ de veneno
16, 17 e 18	10	20	55	-	5 $\mu\text{L}$ de veneno 100X	10	0,05 $\mu\text{g}$ de veneno
19, 20 e 21	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização A	10	5,00 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-NXH8
22, 23 e 24	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização B	10	0,50 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-NXH8
25, 26 e 27	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização C	10	0,05 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-NXH8
28, 29 e 30	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização A	10	5,00 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-MIX
31, 32 e 33	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização B	10	0,50 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-MIX
34, 35 e 36	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização C	10	0,05 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-MIX
37, 38 e 39	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização A	10	5,00 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-NXH1
40, 41 e 42	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização B	10	0,50 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-NXH1
43, 44 e 45	10	20	50	-	10 $\mu\text{L}$ de neutralização C	10	0,05 $\mu\text{g}$ de veneno + anti-NXH1

(\*) todos os valores em  $\mu\text{L}$

volume final do ensaio: 100  $\mu\text{L}$  por tubo

tampão BSA 10X: 2mg/mL de albumina sérica bovina

tampão ligação: Tris-HCl 20 mmol pH 7,4 EDTA 0,1 mmol/L

$^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BGTX:  $\alpha$  - Bungarotoxina marcada com Iodo-125, 1h de incubação

Diluição Seriada do Veneno 10X (concentração 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )			
1X	3 $\mu\text{L}$ de veneno em 27 $\mu\text{L}$ de tp ligação	1,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$ = 5,00 $\mu\text{g}$
10X	3 $\mu\text{L}$ do anterior em 27 $\mu\text{L}$ de tp ligação	0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$ = 0,50 $\mu\text{g}$
100X	3 $\mu\text{L}$ do anterior em 27 $\mu\text{L}$ de tp ligação	0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$ = 0,05 $\mu\text{g}$
Neutralização Seriada do Veneno em soro anti-MIX, anti-NXH8 ou anti-NXH1			
A	3 $\mu\text{L}$ de veneno em 57 $\mu\text{L}$ de soro	0,500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$ = 5,00 $\mu\text{g}$
B	6 $\mu\text{L}$ do anterior em 54 $\mu\text{L}$ de soro	0,050 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$ = 0,50 $\mu\text{g}$
C	6 $\mu\text{L}$ do anterior em 54 $\mu\text{L}$ de soro	0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$ = 0,05 $\mu\text{g}$

**BIBLIOGRAFIA**

1. Ackermann E.J. & Taylor P. (1997) Nonidentity of the  $\alpha$  - neurotoxin binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor revealed by modification in  $\alpha$  - neurotoxin and receptor structures. **Biochemistry**, 36: 12836-12844.
2. Ackermann E.J., Ang E.T.H., Kanter J. R., Tsigelny I. & Taylor P. (1998) Identification of pairwise interactions in the  $\alpha$  - neurotoxin - nicotinic acetylcholine receptor complex through double mutant cycles. **J. Biol. Chem.**, 273(18): 10958-10964.
3. Adams M. E., & Olivera B. M. (1994) Neurotoxins: overview of an emerging research technology. **Trends Neurosci.** 17(4): 151-5.
4. Adem A., Asblom A., Johansson, G., Mbugua P. M., & Karlsson E. (1988) Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. **Biochem. Biophys. Acta** 968: 340-345.
5. Afifyan F., Armugam A., Gopalakrishnakone P., Tan N. H., Tan C.H. & Jeyaseelan K. (1998) Four new postsynaptic neurotoxins from *Naja naja sputatrix* venom: cDNA cloning, protein expression, and phylogenetic analysis. **Toxicon**. 36: 1871-1885.
6. Afifyan F., Armugam A., Tan C. H., Gopalakrishnakone P., & Jeyaseelan K. (1999) Postsynaptic alpha-neurotoxin gene of the spitting cobra, *Naja naja sputatrix*: structure, organization, and phylogenetic analysis. **Genome Res.** 9(3): 259-66.
7. Aird S. D, Womble G. C., Yates J. R. 3rd, & Griffin P. R. (1999) Primary structure of  $\gamma$  - bungarotoxin, a new postsynaptic neurotoxin from venom of *Bungarus multicinctus*. **Toxicon.** (4): 609-25.
8. Aird S. D. & Jorge da Silva N. Jr. (1991) Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, 99B: 287-294.
9. Aird S. D., Jorge da Silva, N. & Griffin P. R. (1993) Preliminary structure of a short postsynaptic neurotoxin from the venom of *Micrurus surinamensis surinamensis*. **Toxicon**, 31: 108.
10. Alape-Giron A., Persson B., Cederlund E., Flores-Diaz M., Gutierrez J.M., Thelestam M., Bergman T., & Jornvall H. (1999) Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. **Eur. J. Biochem.** 259(1-2): 225-34.
11. Alape-Girón A., Stiles B., Schmidt J., Girón-Cortes M., Thelestam M. H. & Bergman, T. (1996) Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. **FEBS Letters**, 380: 29-32.
12. Albrand J. P, Blackledge M. J, Pascaud F, Hollecker M, & Marion D. (1995) NMR and restrained molecular dynamics study of the three-dimensional solution structure of toxin FS2, a specific blocker of the L-type calcium channel, isolated from black mamba venom. **Biochemistry**. 34(17): 5923-37.

13. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., & Lipman D. J. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
14. Antil S., Servent D., & Ménez A. (1999) Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of alpha-cobratoxin. *J. Biol. Chem.* 274 (49): 34851-8.
15. Antil-Delbeke S., Gaillard C., Tamiya T., Corringer P. J., Changeux J.-P., Servent D., & Ménez A. (2000) Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 275 (38): 29594-601.
16. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. D., Smith J. A., & Struhl K. (1989) **Current Protocols in Molecular Biology**. Vol. 1 Suppl. 24 p1.6.5 John Wiley & Sons N. Y.
17. Barros, A. C. S., Fernandes, D. P., Lima Ferreira, L. C., & dos Santos, M. C. (1994) Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (Coral Snakes). *Toxicon* 32(4): 445-452
18. Basus, V. J., Song G, & Hawrot E. (1993) NMR solution structure of an alpha-bungarotoxin/nicotinic receptor peptide complex. *Biochemistry*. 32(46): 12290-8.
19. Besse,t P. H., Åslund, F., Beckwith, J, & Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(24): 13703-8.
20. Beuken, E., Vink, C. & Bruggeman, C. A. (1998) One step procedure for screening recombinant plasmids by size. *BioTechniques*, 24: 748-750.
21. Bilwes, A., Rees, B., Moras, D., Ménez, R. & Ménez, A. (1994) X-Ray structure at 1.55Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion in membranes. *J. Mol. Biol.*, 239(1): 122-136.
22. Bon, C. (1991) Snake venom & pharmacopoeia. *In: Snakes: A Natural History*, pp 194-209. Roland Bauchot (Ed.), Sterling Publishing Co., Inc. New York.
23. Boyot, P., Pillet, L., DucanceL F., Boulain, J. C., Trémeau, O. & Ménez, A. (1990) A recombinant snake neurotoxin generated by chemical cleavage of a hybrid protein recovers full biological properties. *FEBS Lett.* 266: 87-90.
24. Bradley, K. N. (2000) Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol. Ther.* 85(2): 87-109.
25. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
26. Brazil, V. & Brazil F°, V. (1933) Do envenenamento elapídico em confronto com o choque anafilático. *Bol. Inst. Vital Brazil*, 15: 3-49.
27. Cadle, J. E. & Sarich, V. M. (1989) An immunological assessment of phylogenetic position of the New World coral snakes. *J. Zool., Lond.* 195: 157-167.

28. Campbell, J. A. & Lamar W.W. (1989) **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca and London Comstock, Cornell Univ. Press
29. Carey, J. E., & Wright, E. A. (1960) Isolation of the neurotoxic component of the venom of the sea snake *Enhydrina scitosa*. **Nature** (London) 185: 103-104.
30. Carlsson F. H. (1975) Snake venom toxins. The primary structure of protein S4C11. A neurotoxin homologue from the venom of Forest Cobra (*Naja melanoleuca*) **Biochem. Biophys Acta** 400: 310-321.
31. Cerveňanský C., Dajas F., Harvey A. L. & Karlsson E. (1991) Fasciculins, anticholinesterase toxins from mamba venoms: biochemistry and pharmacology. **In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics**, 134. pp 303-322, Harvey, A L. (Ed), Pergamon, New York.
32. Chaim-Matyas A., Borkow G., & Ovadia M. (1991). Isolation and characterization of a cytotoxin P4 from the venom of *Naja nigricollis nigricollis* preferentially active on tumor cells. **Biochem. Int.** 24: 415-421.
33. Chang C. C. (1979) The action of snake venoms on nerve and muscle. *In: Snake venoms*, pp. 309-376. Lee, C.Y. (Ed.) **Handbook of Experimental Pharmacology**, 52. Springer Verlag, Berlin.
34. Chang, L. S., Lin, J. & Wu, P. F. (1996) cDNA sequence analysis and expression of cardiotoxin V and a new cardiotoxin VII from *Naja naja atra* (Taiwan Cobra). **Biochem. Biophys. Acta** 1295:1-4.
35. Chang L. S., & Lin J. (1997) cDNA sequence analysis of a novel neurotoxin homolog from Taiwan banded krait. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 43(2): 347-54.
36. Chang L. S., Lin J., Chou Y.C, & Hong E. (1997a) Genomic structures of cardiotoxin 4 and cobrotoxin from *Naja naja atra* (Taiwan cobra). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 239(3): 756-62.
37. Chang L. S., Lin J., Wu P., Chang C., & Hong E. (1997b) cDNA sequence analysis and expression of kappa-bungarotoxin from Taiwan banded krait. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 230(1): 192-5.
38. Chang L. S., Chen K. C., Wu B. N., Lin S. K., Wu P. F., Hong Y. R., & Yang C. C. (1999a) Expression and mutagenesis studies of cobrotoxin from Taiwan cobra **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 5; 263(3): 652-6
39. Chang L. S., Lin S., Huang H.B., & Hsiao M. (1999b) Genetic organization of alpha-bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait): evidence showing that the production of alpha-bungarotoxin isotoxins is not derived from edited mRNAs. **Nucleic Acids Res.** 27(20): 3970-5.
40. Chang L. S., Lin S., Wang J., Hu W. P., Wu B., & Huang H. (2000a) Structure-function studies on Taiwan cobra long neurotoxin homolog. **Biochim Biophys Acta.** 14; 1480(1-2):293-301.
41. Chang L. S., Huang H.B., & Lin S. R. (2000b) The multiplicity of cardiotoxins from *Naja naja atra* (Taiwan cobra) venom. **Toxicon.** 38(8): 1065-76.
42. Changeux J.-P., Kasai M., & Lee C.Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 67(3): 1241-7.

43. Changeux J.-P. (1990) Functional architecture and dynamics of the acetylcholine receptor: An allosteric ligand-gated ion channel. *In: Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures* Vol. 4 Raven Press, New York.
44. Changeux, J.-P. (1993) Chemical Signaling in Brain. *Scientific American*, Nov: 58-62.
45. Changeux J.-P., Bertrand D., Corringer P. J., Dehaene S., Edelstein S., Lena C., Le Novere N., Marubio L., Picciotto M., & Zoli, (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors. *Mol. Pharmacol.* 37: 429–434.
46. Chen, Y. H., Hu C. T., & Yang, J. T. (1984). Membrane disintegration and hemolysis of human erythrocytes by snake venom cardiotoxin (a membrane-disruptive polypeptide). *Biochem. Int.* 8: 329–338.
47. Chi L. M., Vyas A. A., Rule G. S. & Wu W. G. (1994) Expression of glutathione S-transferase-cardiotoxin fusion protein in *Escherichia coli*. *Toxicon*, 32: 1679-1683.
48. Chiapinelli V. A. (1993) Neurotoxins acting on acetylcholine receptors. *In: Natural and Synthetic Neurotoxins*, pp 66-128. (Ed.) Harvey, LA. 1983 Academic Press London
49. Chiappinelli V. A., & Lee J. C. (1985) Kappa-bungarotoxin: Self-association of a neuronal nicotinic receptor probe. *J. Biol. Chem.* 260:6182-86.
50. Chiappinelli V. A., & Wolf K. M. (1989) Kappa-neurotoxins: heterodimer formation between different neuronal nicotinic receptor antagonists. *Biochemistry.* 28(21): 8543-7.
51. Chiappinelli, V. A. (1991)  $\alpha$ -neurotoxins and  $\kappa$ -neurotoxins: Effects on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, pp 223-258, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.
52. Chou JH, Bargmann CI, & Sengupta P. (2001). The *Caenorhabditis elegans* odr-2 gene encodes a novel Ly-6-related protein required for olfaction. *Genetics* 157(1): 211-24.
53. Cohen P. & Seligmann Jr. E. B. (1968) Immunological studies of coral snake venom. *Mem. Inst. Butantan*, 33 (1): 339-347.
54. Corfield P. W., Lee T. J., & Low B. W. (1989) The crystal structure of erabutoxin a at 2.0-Å resolution. *J. Biol Chem.* 264(16): 9239-42.
55. Corthier, G., Boschetti, E. & Charley-Poulain, J. (1984) Improved method for IgG purification from various animal species by ion exchange chromatography. *J. Immunol. Methods*, 66: 75-79.
56. Crowe, J. & Henko, K. (1992) QIAexpress: The high level expression and protein purification system. *Technical inform QIAGEN GmbH*, Hilden, Germany.
57. Daló N., Perales J, Munoz R., Martinez B. & Moussatché H. (1989) Neuromuscular blocking activity of a fraction isolated from the coral snake venom, *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon*, 27: 40.
58. Danse J. M., Garnier J. M. & Kempf J. (1990) A cDNA sequence encoding a neurotoxin-homolog from *Bungarus multicinctus*. *Nucleic Acids Res.* 18(4): 1045.

59. Danse J. M., Rowan E. G., Gasparini S., Ducancel F., Vatanpour H., Young L.C., Poorheidari G., Lajeunesse E., Drevet P., Ménez R., Ménez A., (1994) On the site by which alpha-dendrotoxin binds to voltage-dependent potassium channels: site-directed mutagenesis reveals that the lysine triplet 28-30 is not essential for binding. **FEBS Lett.** 19; 356(2-3):153-8.
60. de Weille J. R., Schweitz H., Maes P., Tartar A., & Lazdunski M.. (1991) Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88(6): 2437-40.
61. Dennis M. S., Henzel W. J., Pitti R. M., Lipari M. T., Napier M. A., Deisher T. A., Bunting S. & Lazarus R.A. (1990) Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: Evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 87(7): 2471-5.
62. Döebli H., Trecziak A., Gillessen D., Matilde H. S., Rivasta I.K., Perrin L.H., Jakob P. E., & Certa, U. (1990) Expression purification biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 40:259-268.
63. Dos Santos M. C., D'Império-Lima M. R., Furtado C., Colieto O. M. D. D., Kipnis T. L. & Dias da Silva W. (1989) Purification of F(ab')<sub>2</sub> anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining gig fragments with high neutralization activity, purity and yield. **Toxicon**, 27(3): 297-303.
64. Dowling H. G. & Duellman W. E. (1978) **Systematic Herpetology: A synopsis of Families and Higher Categories**. Hiss Publications, New York.
65. Drenth J., Low B.W., Richardson J., & Wright C. S. (1980) The Toxin-Agglutinin Fold: A new group of small protein structures organized around a four-dissulfide core. **J. Biol. Chem.**; 255(7): 2652-2655.
66. Drevet P., Lemaire C., Gasparini S., Zinn-Justin S., Lajeunesse E., Ducancel F., Pinkansfeld S., Courçon M, Trémeau O., Boulain J. C. & Ménez, A. (1997) High-level production and isotope labeling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins. **Prot. Express. Purif** 10: 293-300.
67. Ducancel F., Boulain J.C., Trémeau O. & Ménez A. (1989) Direct expression in *E. coli* of a full functionally active protein A-snake toxin fusion protein. **Prot. Engineering**, 3(2): 139-143.
68. Ducancel F., Guignery-Frelat G., Boulain J.C., & Ménez A., (1990) Nucleotide sequence and structure analysis of cDNAs encoding short-chain neurotoxins from venom glands of a sea snake (*Aipysurus laevis*). **Toxicon** 28(1): 119-23.
69. Ducancel F., Rowan E.G, Cassar E., Harvey A.L, Ménez A., & Boulain J.C. (1991) Amino acid sequence of a muscarinic toxin deduced from the cDNA nucleotide sequence. **Toxicon**. 29(4-5): 516-20.
70. Ducancel F., Mérienne K., Fromen-Romano C., Trémeau O., Pillet L., Drevet P., Zinn-Justin S., Boulain J. C. & Ménez A. (1996) Mimicry between receptors and antibodies. **J. Biol. Chem.**, 271: 31345-31353.
71. Dufton M. J. & Hider R. C. (1980) Lethal protein conformations. **Trends in Biochem. Sci.** 5: 53-56.

72. Dufton M. J. & Hider R. C. (1983) Conformational properties of the neurotoxin and cytotoxins isolated from elapid snake venoms. **C. R. C. Crit. Rev. Biochem.** 14: 113-171.
73. Dufton M. J., Eaker D. & Hider R. C. (1983) Conformational properties of phospholipases A<sub>2</sub>. Secondary structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity. **Eur. J. of Biochem.** 137:537-544.
74. Dufton, M. J. & Hider, R. C. (1991) The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, 134. pp 259-302, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.
75. Eaker D. & Porath J. (1966) The amino acid sequence from *Naja nigricollis* venom. **Jpn J. microbiol.** 11: 353-355.
76. Endo T., & Tamiya N. (1987) Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. **Pharmacol. Ther.** 34(3): 403-51.
77. Endo T., & Tamiya N. (1991) Structure-Functions Relationships of Postsynaptic Neurotoxins from Snake Venoms. *In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics* 134: 165-220. Harvey, A. L. (Ed.) Pergamon Press, New York.
78. Faure, G. (2000). Natural inhibitors of toxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie** 82: 833-840.
79. Felsenstein J. (1989). PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics** 5: 164-166.
80. Felsenstein J. (1995). PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.57c) Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
81. Fiordalisi J. J., Feifer C. H., TenHarmsel A., Gigowski R., Chiappinelli V. A. & Grant G. A. (1991) Synthesis and expression in *Escherichia coli* of a gene for κ - bungarotoxin. **Biochemistry**, 30: 10337-10343.
82. Fiordalisi J. J., al-Rabiee R., Chiappinelli V. A., & Grant G. A. (1994) Site-directed mutagenesis of kappa-bungarotoxin: implications for neuronal receptor specificity. **Biochemistry**. 33(13): 3872-7.
83. Fiordalisi J. J., James P. L., Zhang Y., & Grant G. A. (1996) Facile production of native-like kappa-bungarotoxin in yeast: an enhanced system for the production of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor probe. **Toxicon** 34(2): 213-24
84. Fletcher, C. H., Lachmann, P. J., and Neuhaus, D. (1994). Structure of a soluble form of the human complement regulatory protein CD59. **Structure** 2, 185-199.
85. Flowers, H. H. (1966) A comparison of the neutralization ability of a heterologous vs. homologous coral snake (*Micrurus fulvius*) venom. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 15(6)1003-1006.
86. Francis, B. R., da Silva Junior, N. J., Seebart, C., Casais e Silva, L. L., Schmidt, J.J. & Kaiser, I. I. (1997) Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A<sub>2</sub> and postsynaptic neurotoxins. **Toxicon**, 35:1193-1203.
87. Frishman, D. & Argos, P. (1995) Knowledge-based secondary structure assignment. **Proteins: structure, function and genetics**, 23, 566-579.

88. Fromen-Romano C., Maillère B., Drevet P., Lajeunesse E., Ducancel F., Boulain J.C. & Ménez, A. (1997) Transformation of a non-enzymatic toxin into a toxoid by genetic engineering. **Prot. Engineering**, 10 (10): 1213-1220.
89. FUNASA (1998) Acidentes por animais peçonhentos. In: Guia de Vigilância Epidemiológica 4<sup>a</sup>. Edição. Disponível em: < URL: <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0501A.htm> > Acesso em: 15 dezembro 2001.
90. Fuse N., Tsuchiya T., Nonomura Y., Ménez A. & Tamiya T. (1990) Structure of the snake short-chain neurotoxin, erabutoxin c, precursor gene. **Eur. J. Biochem.** 13;193(3):629-33.
91. Geula, C. (1998). Abnormalities of neural circuitry in Alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. **Neurology** 51, S18-S29.
92. Gillet D., Ducancel F., Pradel E., Leonetti M., Ménez A., & Boulain J.C. (1992) Insertion of a disulfide-containing neurotoxin into *E. coli* alkaline phosphatase: the hybrid retains both biological activities. **Protein Eng.** 5(3): 273-8.
93. Gomez-Leiva M. A. (1978) Comparative study of the hemolytic activity of venoms of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*, *Bungarus multicinctus* and *Naja naja*. In: **Toxin - Animal, Plant and Microorganisms**, pp 433, Rosenberg, P. (Ed), Pergamon Press, Oxford.
94. Gong N., Armugam A., & Jeyaseelan K. (1999) Postsynaptic short-chain neurotoxins from *Pseudonaja textilis* cDNA cloning, expression and protein characterization. **Eur. J. Biochem.** 265(3): 982-989.
95. Gong N., Armugam A., & Jeyaseelan K. (2000) Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain alpha-neurotoxins in an Australian elapid, *Pseudonaja textilis*. **FEBS Lett.** 473(3): 303-10.
96. Gotti C., Fornasari D., & Clementi F. (1997) Human neuronal nicotinic receptors. **Prog Neurobiol.** 53(2): 199-237.
97. Grant G. A., Luetje C.W., Summers R., & Xu X. L. (1998) Differential roles for disulfide bonds in the structural integrity and biological activity of kappa-Bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist. **Biochemistry.** 37(35): 12166-71.
98. Gruber A., Zingales B. (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. **Biotechniques.** 19(1): 28-30.
99. Guatemosin S. C., Kalapothakis E., Diniz C. R., Chavez-Olortegui C. (2000) Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. **Toxicon** 38(1): 113-121.
100. Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis** 18, 2714-2723.
101. Gumley T.P., Mckenzie I. F. & Sandrin M. S. (1995) Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. **Immunol. Cell. Biol.** 73: 277-296.
102. Hanninen, A., Jaakkola, I., Salmi, M., Simell, O., & Jalkanen, S. (1997). Ly-6C regulates endothelial adhesion and homing of CD81 T cells by activating integrin-dependent adhesion pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94, 6898-6903.

103. Harlow, E. & Lane, D. (1988) **Antibodies: A laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
104. Harris, J. B. (1991) Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*: 91-129 Harvey, A. L. (Ed.) Pergamon Press, New York.
105. Harvey A. L. (2001) Twenty years of dendrotoxins. **Toxicon**, 39(1):15-26.
106. Harvey A. L., Anderson A.J., Marshall D., Pemberton K.E. & Rowan E.G. (1990) Facilitatory neurotoxins and transmitter release. **Journal of Toxicology** 9: 225-42.
107. Harvey A. L., Marshall R. J., & Karlsson E. (1982). Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra [*Naja naja siamensis*] on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. **Toxicon** 20, 379-396.
108. Harvey, A. L. & Karlsson, E. (1982) Protease inhibitors homologues from mamba venoms: Facilitation of acetylcholine release and interactions with prejunctional blocking toxins. **Br. J. Pharmacol.** 77: 153-161.
109. Hervé M., Pillet L., Humbert P., Trémeau O., Ducancel F., Hirth C., & Ménez A, (1992) Role and environment of the conserved Lys27 of Snake curaremimetic toxins as probed by chemical modifications, site-directed mutagenesis and photolabeling experiments. **Eur. J. Biochem.** 208:125-31
110. Hider R. C., Karlsson E., & Namiranian S. (1991) Separation and purification of toxins from snake venoms. *In: Snake Toxins*. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, 134: 1-34 Harvey, A. L. (Ed.) Pergamon Press, New York.
111. Higashi H. G., Guidolin R., Caricatti C. P., Fernandes I. Marcelino J. R., Moraes, J. F., Yamagushi I., Stephano M. A. & Takehara H. A. (1990) Especificidade do soro anti - elapídico frente a venenos do gênero *Micrurus*. V **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambú, MG.
112. Higashi H. G., Guidolin R., Caricatti C.P., Fernandes I. Marcelino J. R., Morass J.F., Yamaguchi, I., Stephan M. A., Dias da Silva, W. & Takehara H. A. (1995) Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. **Brazil. J. Med. Biol. Res.** 28: 767-771.
113. Ho P. L., Soares M. B., Yamane T. & Raw I. (1995) Reverse Biology Applied to *Micrurus corallinus*, A South American Coral Snake. **J. Toxicol.-Toxin Reviews** 14(3)327-337.
114. Ho P. L., Soares M. B., Maack T. Giménez I., Puerto G., Furtado M.F.D., & Raw, I (1997) Cloning of an unusual peptide from South American coral snake *Micrurus corallinus*. **Eur. J. Biochem.**, 250:144-149.
115. Hockney R. C. (1994) Recent development in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **TIBTech** 12: 456-463.
116. Hodges S. J., Agbaji A. S., Harvey A. L., & Hider, R. C. (1987). Cobra Cardiotoxins: Purification, effects on skeletal muscle and structure/activity relationship. **Eur. J. Biochem.** 165, 373-383.
117. Hodgson D., Gasparini S., Drevet P., Ducancel F., Bouet F., Boulain J.C., Harris, J.B. & Ménez, A. (1993) Production of recombinant notechis 11'2L, an enzymatically active mutant of a

- phospholipase A2 from *Notechis scutatus scutatus* venom, as directly generated by cleavage of a fusion protein produced in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, 212: 441- 446.
118. Hung C.C, Wu S.H, & Chiou S.H. (1998) Two novel alpha-neurotoxins isolated from Taiwan cobra: sequence characterization and phylogenetic comparison of homologous neurotoxins. **J. Protein Chem.** 17(2): 107-14
119. Ishikawa Y., Kano M., Tamiya N., & Shimada Y. (1985) Acetylcholine receptors of human skeletal muscle: a species difference detected by snake neurotoxins. **Brain Res.**346 (1): 82-8.
120. Jaseja M., Lu X., Williams J. A., Sutcliffe M. J., Kakkar V. V., Parslow R. A., & Hyde E. I. (1994) <sup>1</sup>H-NMR assignments and secondary structure of dendroaspin, an RGD-containing glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb-beta 3) antagonist with a neurotoxin fold. **Eur. J. Biochem.** 226(3):861-8.
121. Jerusalinsky D., Kornisiuk E., Alfaro P., Quillfeldt J., Ferreira A., Rial V.E., Duran R., & Cervenansky C. (2000). Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. **Toxicon.** 38(6): 747-61.
122. Jones, D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J. Mol. Biol.** 292: 195-202.
123. Jorge da Silva, N. Jr. & Aird S.D. (2001) Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 128(3): 425-56.
124. Joubert F. J. (1975) The purification and amino acid sequence of toxin CM-13b from *Naja haje annulifera* (Egyptian cobra) venom. **Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.** 356: 1901-1908.
125. Joubert F. J. (1985) The amino acid sequence of protein CM-3 from *Dendroaspis polyleps polyleps* (black mamba) **Int. J. Biochem.** 17:695-699.
126. Joubert F. J., & Taljaard N. (1978) *Naja haje haje* (Egyptian cobra) venom. Some properties and the complete primary structure of three toxins (CM-2, CM-11 and CM-12). **Eur. J. Biochem** 90: 359-367.
127. Joubert F. J., & Taljaard, N. (1979) Snake venom. The amino acid sequence S<sub>2</sub>C<sub>4</sub> from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (jameson's mamba) venom. **Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.** 361: 571-80.
128. Joubert F. J. & Taljaard N. (1980) The amino acid sequences of Two Melanoleuca-Type Toxins. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.** 361, 425-436.
129. Joubert, F.J., & Viljoen, C.C. (1979) Snake venom. The amino acid sequence of two reduced and S-carboxymethylated proteins (C<sub>8</sub>S<sub>2</sub> and C<sub>8</sub>S<sub>3</sub>) from *Dendroaspis angusticeps* venom. **Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.** 360: 1075-90.
130. Karlson E. (1979) Chemistry of protein toxins in snake venoms. *In Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 52 (Lee, C-Y. Ed.), pp159 – 212. Spring – Verlag, Berlin.
131. Karlsson E., Eaker D. L., & Porath J. (1966) Purification of a neurotoxin from the venom of *Naja nigricollis*. **Biochim Biophys Acta.** 127(2):505-20.

132. Kieffer B., Driscoll P.C., Campebell, I.D., Willis A. C., van der Merwe P.A., & Davis S.J. (1994) Three-dimensional solution structure of the extracellular region of the complement regulatory protein CD59, a new cell-surface protein domain related to snake venom neurotoxins. **Biochemistry**, 33: 4471-4482.
133. Kochva E., Nakar O., & Ovadia M. (1983) Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Amer. Zool.**, 23: 427-430.
134. Kohno T., Cramichael D.F., Sommer A., & Thompson R.C. (1990) Refolding of recombinant proteins. *In: Expression in E. coli. Meth. Enzimol.* 185:187-195.
135. Kolbe H. V, Huber A., Cordier P., Rasmussen U. B., Bouchon B., Jaquinod M., Vlasak R., Delot E. C., & Kreil G. (1993) Xenoxins, a family of peptides from dorsal gland secretion of *Xenopus laevis* related to snake venom cytotoxins and neurotoxins. **J. Biol. Chem.** 268(22): 16458-64.
136. Kuhn P., Deacon A. M., Comoso S., Rajaseger G., Kini R. M., Usón I. & Kolatkar P. R. (2000) The atomic resolution structure of buccandin, a novel toxin isolated from the Malayan krait, determined by direct methods. **Acta Cryst. D56**: 1401-1407.
137. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
138. Laskowski R. A, MacArthur M. W., Moss D. S. & Thornton J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, 26, 283-291.
139. Lathrop B. K., Burack W. R., Biltonen R. L. & Rule, G. S. (1992) Expression of a group II Phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* in *Escherichia coli*: recovery and renaturation from bacterial inclusion bodies. **Prot. Express. Purif**, 3: 512-517.
140. Lee C. Y. & Chang C. C. (1966) Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. **Mem Inst Butantan.** (2): 555-72.
141. Lentz T. L. (1990) Rabies virus binding to an acetylcholine receptor alpha-subunit peptide. **J. Mol Recognit.** (2): 82-8.
142. Levi-Montalcini R. (1976) The nerve growth factor: its widening role and place in neurobiology. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** 15:237-50.
143. Lim L. K. F., & Lee T. M. M., (1989). **Fascinating Snakes of Southeast Asia: An Introduction.** Tropical Press Sdn. Bhd, Kuala Lumpur.
144. Lin S. R., Huang H. B., Wu B. N., & Chang L. S. (1998) Characterization and cloning of long neurotoxin homolog from *Naja naja atra*. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 46(6): 1211-7.
145. Low BW, Preston HS, Sato A, Rosen LS, Searl JE, Rudko AD, Richardson JS. (1976) Three dimensional structure of erabutoxin b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor. **PNAS USA.** 73(9): 2991-4.
146. Luetje C. W., Piattoni, M., & Patrick J. (1990) Mapping of ligand binding sites of neuronal nicotinic acetylcholine receptors using chimeric  $\alpha$  subunits. **Mol. Pharmacol.** 44: 657-666.

147. Luetje C. W., Wada K., Rogers S., Abramson S. N., Tsuji K., Heinemann S., & Patrick J. (1990) Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J. Neurochem.* 55 (2): 632-40.
148. Macleod R. J., Lembessis P., James S. & Benett, H. P. J. (1998) Isolation of a member of the neurotoxin cytotoxin peptide family from *Xenopus laevis* skin which activates dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 273 (32): 20046-20051.
149. Marques O. A. V. & Puerto G. (1991) Padrões cromáticos e possível mimetismo em *Erythrolampus aesculapii* (Serpentes, Colubridae). *Mem. Inst. Butantan*, 53:127-34.
150. Marques O. A. V. (1992) História natural de *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae). Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil.
151. Marques O. A. V., & Sazima I. (1997) Diet and feeding behavior of coral snake *Micrurus corallinus*, from Atlantic Forest of Brazil. *Herpetol. Nat. History*, 5(1): 88-93.
152. Marques O. A. V., Eterovic, A., & Sazima I. (2001) *Serpentes da Mata Atlântica*. Guia ilustrado para a Serra do Mar. Holos Editora, Ribeirão Preto, SP.
153. Marston F. A. O. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 240: 1-12.
154. Mayhew M, da Silva A. C. R., Martin J., Erdjument-Bromage H., Tempst P & Hartl U. (1996) Protein folding in central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379: 420-426.
155. McDowell R. S., Dennis M. S., Louie A., Shuster M., Mulkerrin M. G., & Lazarus RA. (1992) Mambin, a potent glycoprotein IIB-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry*. 31(20): 4766-72.
156. Mebs D. & Claus I. (1991) Amino acid sequences and toxicities of snake venom components. *In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics* 134: 425-433. Harvey, A. L. (Ed.) Pergamon Press, New York
157. Mebs D. & Ownby C. L. (1990) Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacology and Therapeutics*. 48: 223-36.
158. Ménez, A. (1991). Immunology of snake toxins. *In Snake Toxins* (Harvey, A. L. Ed.), pp. 35-90, Pergamon Press, Inc., New York.
159. Ménez A., Bontemps F., Roumestand C., Gilquin B. & Toma F. (1992) Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Proceedings of Royal Society of Edinburg*. 99B(1/2): 83-103.
160. Ménez, A. (1996) Les venins et toxines de serpents. *In: Biodiversité. La Fonction Venimeuse*. pp200-220. Goyffon, M. et Heurtault, J. (Ed.) Manson, Paris.
161. Middlebrook J. L. (1991) Molecular Cloning of Snake Toxins and other Venom Components. *In: Handbook of Natural Toxins, Vol. 5, Reptile Venoms and Toxins*. pp 281-295, Ed Tu, AT., Marcel Decker Inc., New York, NY.

162. Ministério da Saúde. (1990) Acidentes Ofídicos: Contribuição ao estudo da morbidade. **Boletim** N° 41, Ano IV, Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Ministério da Saúde, Brasília, DF.
163. Miwa J. M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G. W., Sanchez R., Sali A., Role L. W., & Heintz N. (1999) lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. **Neuron**. 1999 (1): 105-14.
164. Moura-da-Silva A. M., Línica A., Della-Casa M., Kamiguti A. S., Ho P. L., Crampton J. M., & Theakston D. G. (1999) Jararhagin ECD-Containing desintegrin domain: Expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. **Arch. Biochem. Biophys.** 369: 295-301.
165. Moussatché H, Meléndez T. (1979) Some pharmacological observations with Elapidae and Crotalidae snake venoms in the guinea-pig denervated diaphragm. On the specificity of the cholinergic blockade by their venoms. **Rev Bras Biol.** 39 (3): 605-10.
166. Nakashima K., Ogawa T., Oda N., Hattori M., Sakaki Y., Kihara H & Olmo M. (1993) Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 90: 5964-5968.
167. Nakashima K., Nobuhisa I., Deshimaru M., Nakai M., Ogawa, T., Shimohigashi Y., Fukumaki Y, Haifori M., Sakaki Y., Haifori S & Olmo M. (1995) Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in *crotalinae* snake venom gland phospholipase A2 isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 92: 5605-5609.
168. Nasman J., Jolkkonen M., Ammoun S., Karlsson E., Akerman K. E. (2000) Recombinant expression of a selective blocker of M(1) muscarinic receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 271(2): 435-9.
169. Neri P., Bracci L., Rustici M., & Santucci A. (1990) Sequence homology between HIV gp120, rabies virus glycoprotein, and snake venom neurotoxins. Is the nicotinic acetylcholine receptor an HIV receptor? **Arch Virol.** 114(3-4): 265-9.
170. Nirthanan S., Joseph J. S., Gopalakrishnakone P., Gwee, M. C. E., Khoo, H. E., Cheah, L. S., & Kini, M. R. (2001). A neurotoxin (Candoxin) isolated from the venom of the Malayan krait *Bungarus candidus*, significantly potentiates the activity of acetylcholinesterase in the venom. **FASEB J** 15: (5) A894-A894 Part 2.
171. Noel SL, Champion BR, Holley CL, & Simmons CJ, Morris DC, Payne JA, Lean JM, Chambers TJ, Zaman G, Lanyon LE, Suvai LJ, & Miller LR. (1998). RoBo-1, a Novel Member of the Urokinase Plasminogen Activator Receptor/CD59/Ly-6/Snake Toxin Family Selectively Expressed in Rat Bone and Growth Plate Cartilage. **J. Biol. Chemistry** 273(7): 3878-83.
172. Ogawa T., Oda N., Nakashima K., Sasaki H., Hattori M., Sakaki Y., Kihara H & Olmo, M. (1992) Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2 isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 8557-8561.
173. Ogawa T., Nakashima, K. Nobuhisa, I., Deshimaru M., Shimohigashi Y., Fukumaki Y, Sakaki Y., Hattori, 5 & Olmo, M (1996) Accelerated evolution of snake venom phospholipase A2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon**, 34:1229-1236.
174. Ohkura N, Inoue S, Ikeda K, & Hayashi K. (1994). The two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type

- plasminogen activator receptor and LY-6 related proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 204(3): 1212-8.
175. Ohno M., Ménez R., Ogawa T., Danse J.M., Shimohigashi Y., Fromen C., Ducancel F., Zinn-Justin S., Le Du MH., Boulain J.C., Tamiya T., & Ménez A., (1998) Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? **Prog. Nucleic Acid Res. Mol Biol.** 59:307-64
176. Osaka H., Malany S., Kanter J. R., Sine S.M. & Taylor T. (1999) Subunit interface selectivity of the  $\alpha$  - neurotoxins for the nicotinic acetylcholine receptor. **J. Biol. Chem.** 274(14): 9581-9586.
177. Patrão-Lomba M., Fontana M.D. & Vital Brazil O. (1973) Sobre o mecanismo de ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus frontalis*. **Acta Phys. Latinoamericana**, 23: 674.
178. Parvathy VR, Chary KVR, Kini RM & Govil G. (2001). Sequence - specific  $^{13}\text{C}$  NMR assignments in a neurotoxin (candoxin) from *Bungarus candidus*. **Magn. Reson. Chem.** 39: 577-580.
179. Pillet L., Trémeau O., Ducancel F., Drevet P., Zinn-Justin, Pinkasfeld S., Bolain J. C. & Ménez A. (1993) Genetic engineering of snake toxins. **J. Biol. Chem.** 268: 909-916.
180. Ploug M., & Ellis V. (1994) Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. **FEBS Lett.** 349(2): 163-8.
181. Prieto da Silva A.R.B., Yamagushi I.K., Morais J.F., Higashi H.G, Raw I., Ho P. L., & Oliveira J. S. (2001) Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. **Toxicon.** 39(7): 949-53.
182. Prinz W. A., Aslund F., Holmgren A., & Beckwith J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **J Biol. Chem.** 272(25): 15661-7.
183. Pugsley A. P. d'Enfert C., Reyss I, & Kornacker M. G. (1990) Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Genet.** 24: 67-90.
184. Qian Y.C., Fan C.Y., Gong Y., & Yang S. L. (1998a) cDNA cloning and sequence analysis of six neurotoxin-like proteins from Chinese continental banded krait. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 46(4): 821-8.
185. Qian Y.C., Fan C.Y., Gong Y., & Yang S. L. (1998b) cDNA sequence analysis and expression of four long neurotoxin homologues from *Naja naja atra*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1443(1-2): 233-8.
186. Qian Y.C., Fan C.Y., Gong Y., & Yang S. L. (1999) cDNA sequence analysis of a novel member of the three loop protein family from the Chinese continental banded krait. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63(5): 940-2.
187. Ramsey H.W., Snyder G. K. & Taylor W.J. (1971) The effect of *Micrurus fulvius* (coral) venom on myocardial contractility of the isolated perfused rabbit heart. **Clin. Res.**, 19: 66.
188. Ramsey H.W., Snyder G.K., Boruchow I. B. & Taylor W.J. (1972) Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus fulvius*) venom in dogs. **Am. J. Phys.**, 222: 782-786

189. Raw I., Guidolin R., Higashi H. & Kelen E.M.A. (1991) Antivenins in Brazil: Preparation. *In: Handbook of Natural Toxins, Vol. 5, Reptile Venoms and Toxins*, pp. 557-581, Ed. Anthony T. Tu, Marcel Dekker Inc., New York, NY.
190. Rietsch A., Belin D., Martin N., & Beckwith J. (1996) An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13048-13053.
191. Rodriguez R., China G., Lopez N., Pons T., & Vriend G. (1998) Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *CABIOS* 14, 523-528.
192. Rosenthal J. A., Hsu S.H., Schneider D, Gentile L.N., Messier N. J., Vaslet C.A., & Hawrot E. (1994) Functional expression and site-directed mutagenesis of a synthetic gene for alpha-bungarotoxin. *J. Biol Chem.* 15; 269 (15): 11178-85.
193. Rosenthal J. A., Levandoski M. M., Chang B., Potts J.F., Shi Q.L., & Hawrot E. (1999) The functional role of positively charged amino acid side chains in alpha-bungarotoxin revealed by site-directed mutagenesis of a His-tagged recombinant alpha-bungarotoxin. *Biochemistry* 15; 38(24):7847-55.
194. Rosso J.P., Vargas-Rosso O., Gutierrez J. M., Rochat H. & Bougis P. E. (1996) Characterization of  $\alpha$  -neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major  $\alpha$  - neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.* 238: 231-239.
195. Rowan E.G, Ducancel F., Doljansky Y., Harvey A.L., Boulain J.C., & Ménez A., (1990) Nucleotide sequence encoding a 'synergistic-like' protein from the venom glands of *Dendroaspis angusticeps*. *Nucleic Acids Res.* 18(6): 1639.
196. Roze J. A. (1982) A new world coral snakes (Elapidae): A taxonomic and biological summary. *Mem. Inst. Butantan.* 46:305-338
197. Rydén L., Gabel D., & Eaker D. (1973) A model of the three-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. *Int. J. Pept. Protein Res.* 5(4): 261-73.
198. Sambrook, J., Frisch, E. F. & Maniatis, T. (1989) **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
199. Sanger N., Nicklen J. & Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
200. Sato S., Yoshida H., Abe H. & Tamiya H. (1969) Properties and biosynthesis of a neurotoxic protein of the venoms of the snakes *Laticauda laticaudata* and *Laticauda colubrina*. *Biochem. J.*, 115(1): 85-90.
201. Schuler D. G., Altschul S.F., & Lipman D. J. (1993) A Workbench for Multiple Alignment Construction and Analysis. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 9, 180-190.
202. Selistre-de-Araujo H. S., de Souza E. L., Beltramini L. M., Ownby C. L., & Souza D. H. (2000) Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. *Protein Expr. Purif.* 19(1):41-7.
203. Servent D., Winckler-Dietrich V., Hu H.Y., Kessler P., Drevet P., Bertrand D., & Ménez A. (1997) Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal alpha7 nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* 1997 272(39): 24279-86.

204. Servent D., Thanh H. L., Antil S., Bertrand D., Corringier P.J., Changeux J.-P., & Ménez A., (1998) Functional determinants by which snake and cone snail toxins block the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **J. Physiol. Paris.** 92(2): 107-11.
205. Servent D., Antil-Delbeke S., Gaillard C., Corringier P.J, Changeux J.-P., & Ménez A. (2000) Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors. **Eur J Pharmacol.** 393(1-3): 197-204.
206. Shafqat J., Siddiqi A. R., Zaidi Z.H. & Jornvall, H. (1991) Extensive multiplicity of miscellaneous type of neurotoxins from the venom of the cobra *Naja naja* and structural characterization of major components. **FEBS Lett.** 284:70-72.
207. Sharma S., Jabeen T., Singh R.K., Bredhorst R., Vogel, C.W., Betzel, C., & Singh, TP. (2001) Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.** 57(Pt 4):596-8.
208. Silva N. J. Jr., Aird S.D., & Haad S.S.J. (1993) Comparative lethality of *Micrurus* venoms. **Toxicon**, 31:168.
209. Silveira de Oliveira J. (2000) Clonagem e Expressão de uma potencial  $\alpha$  - neurotoxina da Cobra Coral *Micrurus corallinus* em *E. coli*. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil.
210. Silveira de Oliveira J., Prieto da Silva A.R.B., Soares M.B, Stephano M.A, de Oliveira Dias W., Raw I., & Ho P.L. (2000) Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. **Biochem Biophys Res Commun.** 267(3): 887-91.
211. Slowinski J.B. (1995) A phylogenetic analysis of New World coral snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides* and *Micrurus*) based on allozymic and morphological characters. **J. Herptol.** 29:325-38
212. Slowinski J.B., Knight A., & Rooney A. P. (1997) Inferring Species Trees from Gene Trees: A Phylogenetic Analysis of the Elapidae (Serpentes) Based on the Amino Acid Sequences of Venom Proteins. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 8(3) 349–362.
213. Smith L. A., Olson M. A., Lafaye P.S. & Dolly S. O. (1995) Cloning and expression of Mamba toxins. **Toxicon**, 33: 459-474.
214. Snyder O., Ramsey H.W., Taylor W. S. & Chiou, C.Y. (1973) Neuromuscular blockage of chick biventer cervicis nerve-muscle preparations by a fraction from coral snake venom. **Toxicon**, 11: 505-508.
215. Stevens-Truss R., & Hinman C. L. (1996) Chemical Modification of Methionines in a Cobra Venom Cytotoxin Differentiates between Lytic and Binding Domains. **Toxicology And Applied Pharmacology** 139, 234–242
216. Stewart E.J, Aslund F, & Beckwith J. (1998) Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. **EMBO J.** 17(19): 5543-50.
217. Strydom D. J. (1977) Disulfide-rich proteins of widely differing functions were aligned with the aid of their half-cystinyl residues. **J. Mol. Evol.** Aug 5;9(4):349-61.

218. Stüber D., Matilde H., & Garotta G. (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis. *In: Immunological Methods*. Ed. by Lefkovits I. & Perrin B. Vol. IV: 121-152.
219. Studier F. W., & Moffat B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113.
220. Takeda M., Yoshida H. & Tamiya N. (1974) Biosynthesis of erabutoxins in the sea snake, *Laticauda semifasciata*. *Toxicon*, 12(6): 633-641.
221. Tambourgi D.V., dos Santos M.C., Furtado M. de F., de Freitas M. C., da Silva W. D., Kipnis T. L., (1994) Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Br. J. Pharmacol.* 112 (3): 723-727.
222. Tamiya N. (1980) Active sites of snake neurotoxins molecules. *Snake* 12: 147-148.
223. Tamiya N., & Arai H. (1966) Studies on sea-snake venoms. Crystallization of erabutoxins a and b from *Laticauda semifasciata* venom. *Biochem. J.* 99(3):624-30.
224. Tamiya T., Lamouroux A., Julien S. F., Grima B., Mallet S., Fromageot P. & Ménez, A. (1985) Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding a snake neurotoxin precursor. *Biochimie*, 67:185-189.
225. Tamiya T., Ohno S., Nishimura E., Fujimi T. S., & Tsushiya T. (1999) Complete nucleotide sequences of cDNAs encoding long chain  $\alpha$  - neurotoxins from sea krait, *Laticauda semifasciata*. *Toxicon*, 37:181 - 185.
226. Tan N. H. & Ponnudurai O. (1992) The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101B: 471-474.
227. Taylor P., Osaka H., Molles B. E., Sugiyama N., Marchot P., Ackermann E.J., Malany S., McArdele J.J., Sine S.M., & Tsigelny I. (1998) Toxins selective for subunit interfaces as probes of nicotinic acetylcholine receptor structure. *J. Physiol. Paris.* 92(2): 79-83.
228. Trémeau O., Lemaire C., Drevet P., Pinkasfeld S., Ducancel F., Boulain J.C. & Ménez A. (1995) Genetic engineering of snake toxins. *J. Biol. Chem.* 270: 9362-9369.
229. Tsetlin V. (1999) Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur. J. Biochem.* 264(2): 281-6.
230. Tsernoglou D, Petsko GA. (1976) The crystal structure of a post-synaptic neurotoxin from sea snake at A resolution. *FEBS Lett.* 15; 68(1): 1-4.
231. Utkin Y.N., Kobayashi Y., Hucho F., & Tsetlin V. I. (1994) Relationship between the binding sites for an alpha-conotoxin and snake venom neurotoxins in the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Toxicon.* 32(9): 1153-7.
232. Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Maslennikov I.V., Eletsky A.V., Starkov V.G., Weise C., Franke P., Hucho F., & Tsetlin V. I. (2001a) First tryptophan-containing weak neurotoxin from cobra venom. *Toxicon.* 39(7): 921-7.

233. Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Kryukova E.V., Chiodini F., Bertrand D., Methfessel C., & Tsetlin V. I. (2001b) "Weak toxin" from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of alpha 7 and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. **J. Biol. Chem.** 276(19): 15810-5.
234. Vital Brazil O. (1965) Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. **O Hospital**, 18:183-224.
235. Vital Brazil O. (1980) Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 26(6): 212-8.
236. Vital Brazil O. (1987) Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. **Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo**; 29(3): 119-26.
237. Vital Brazil O., Fontana M.D., & Pellegrini F<sup>o</sup>.A. (1976/1977) Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. **Mem. Inst. Butantan**, 40/41:221-240.
238. Vital Brazil O. & Fontana M.D. (1983/1984) Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. **Mem. Inst. Butantan**, 40/41:221-240.
239. Vital Brazil O. & Vieira R. J. (1996) Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases (1). **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 38(1):61-7.
240. Von Heijne G. (1983) Patterns of aminoacids near signal – sequence cleavage sites **Eur. J. Biochem.** 133, 17 – 21.
241. Wall J.G. & Plückthun A. (1995) Effects of overexpression folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opinion Biotech.** 6: 507-516.
242. Weiss R., & McIsaac R.J., (1971) Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake *Micrurus fulvius*. **Toxicon** 9, 219-28.
243. Wonnacott S., & Dajas F. (1994) Neurotoxins: nature's untapped bounty. **Trends Pharmacol Sci.** 15(1):1-3.
244. Zinn-Justin S., Pillet L., Ducancel F., Thomas A., Smith J.C., Bolain J.C. & Ménez, A. (1994) Engineering of protein epitopes: a single deletion in snake toxin generates full binding capacity to a previously unrecognized antibody. **Prot. Engineering**, 7: 917-924.



## *CURRICULUM VITAE*

### NOME:

Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva.

### LOCAL E DATA DE NASCIMENTO:

Nacionalidade Portuguesa. Nascido em Luanda, República Popular de Angola em 05 de abril de 1966.

### EDUCAÇÃO:

1981 – 1984: Colégio Estadual de Primeiro e Segundo Grau Prof Alberto Levy.

1986 – 1991: Universidade de São Paulo, Graduação em Medicina veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

1992 – 1995: FUNDAP - Instituto Butantan, Especialização em biotecnologia: Purificação de hemoderivados de placentas humanas.

1996 – 2001: Universidade de São Paulo, Doutor em Bioquímica e Biologia molecular pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

### OCUPAÇÃO:

Pesquisador científico do Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde desde 1996.

### PUBLICAÇÕES:

1. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva, Ivone Kasuko Yamagushi, Josefina Farina Morais, Hisako Gondo Higashi, Isaias Raw, Paulo Lee Ho & Jane Silveira de Oliveira. **Toxicon**, 39 (7): 949-53 (2001).
2. Characterization of a Paramyxovirus from a Fer de Lance viper (*Bothrops jararaca*): partial nucleotide sequence of the putative fusion protein. Junqueira de Azevedo ID, Prieto da Silva AR, Carmona E, & Ho PL. **Arch Virol.**, 146 (1): 51-7 (2001).
3. Cloning and Characterization of an  $\alpha$ -Neurotoxin-Type Proteín specific for the Coral Snake *Micrurus corallinus*. Jane Silveira de Oliveira, Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva, Marcelo Bento Soares, Marco Antônio Stephano, Waldely de Oliveira Dias, Isaías Raw, & Paulo Lee Ho. **Biochem. Bioph. Research Communications**, 267:887-891 (2000).
4. Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorent assay with parallel-tines analysis. Nancy Oguiura, Maria M. Camargo, Álvaro R. B. Prieto da Silva, & Denise S.P.Q. Horton. **Toxicon**, 38: 443-448 (2000).
5. A Arte de Purificar Proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. Paulo Lee Ho, Érica Kitahara, Álvaro R. B. Prieto da Silva, Diogo M. O. Oqawa, Celso R. Romero Ramos & Ana Lúcia T. O. Nascimento **Bio tecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, 113: 24 - 26 (2000).
6. Cloning and Characterization of a Repetitive 1.9 kb Hind III DNA Fragment from *Crotalus durissus terrificus* Genome. Margaret H. Magdesian, Álvaro R.B. Prieto da Silva, Paulo L. Ho, Maria F.D. Furtado, & Tetsuo Yamane. **Comp. Biochem. Physiol.**, 1188 (1): 7-11(1997).
7. Purification of basic fibroblast growth factor and alkaline phosphatase from human placenta. Maria H.B.Costa, Paulo L. Ho, Aline M. Silva, Gandhi R. Baptista, Luciana C.C. Leite, Joaquin Cabrera-Crespo, Karina M. Venturini, Marli Katz, Célia Liberman, Álvaro R. B. Prieto da Silva & Isaías Raw. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 17, 155-165 (1993).