“Clonagem e Expressão de uma Potencial α -Neurotoxina da Cobra Coral *Micrurus corallinus* em *Escherichia coli*”

JANE OLIVEIRA DE FIGUEIREDO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

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

Profa. Dra. ANA CLAUDIA RASERA DA SILVA
IQ - USP

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO WINTER
ICB - USP

SÃO PAULO
11 DE MAIO DE 2000.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA POTENCIAL α -NEUROTOXINA
DA COBRA CORAL *Micrurus corallinus* EM *Escherichia coli*.

JANE OLIVEIRA DE FIGUEIREDO

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica do Instituto de Química/USP para
a obtenção do título de Mestre em Bioquímica
Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo

2000

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

F475c Figueiredo, Jane Oliveira de
Clonagem e expressão de uma potencial α -neurotoxina da
cobra coral *Micrurus corallinus* em *Escherichia coli* / Jane
Oliveira de Figueiredo. -- São Paulo, 2000.
91p.

Dissertação (mestrado)–Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Ho, Paulo Lee

1. Bioquímica molecular I. T. II. Ho, Paulo Lee,
orientador.

574.88 CDD

*Toda a nossa ciência, comparada com a
realidade, é primitiva e infantil – e, no
entanto, é a coisa mais preciosa que temos.*
Albert Einstein

Agradecimentos	1
Abreviaturas	3
Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
1. Os venenos de serpentes e as neurotoxinas	9
2. As cobras corais	13
3. A biologia molecular e as toxinas	16
4. O ponto de partida	18
Objetivos gerais do projeto	19
Objetivos específicos	20
Material e métodos	21
1. Subclonagem da sequência <i>nxhl</i> nos vetores pRSETb e pCP	21
1.a. Os vetores	21
1.b. Os primers	22
1.c. Preparação dos vetores, preparação dos insertos e reação de ligação	23
1.d. Construção do plasmídeo recombinante pRSETb- <i>nxhl</i>	24
1.e. Construção dos plasmídeos recombinantes pCP- <i>nxhl</i> e pRSETb-ZZ- <i>nxhl</i>	24
1.f. Seleção dos clones recombinantes	25
1.g. Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes	26
2. Expressão das proteínas recombinantes	26
3. Purificação das proteínas de fusão com cauda de histidina	27
3.a. Preparação da resina <i>Chelating Sepharose</i>	27
3.b. Purificação da proteína recombinante His ₆ -NXH1	27

3.c. Renaturação da proteína recombinante His ₆ -NXH1	28
3.d. Purificação e renaturação da proteína recombinante His ₆ -ZZ-NXH1	29
4. Purificação e renaturação da proteína recombinante ZZ-NXH1	29
4.a. Coluna de <i>IgG Sepharose</i>	29
4.b. Renaturação da proteína recombinante ZZ-NXH1	30
5. Análise das proteínas recombinantes	30
5.a. SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	30
6. Imunização dos camundongos	30
7. ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	31
8. Western blots	31
8.a. Western blots dos venenos	31
8.b. Venenos e anticorpos anti- <i>M. corallinus</i>	32
8.c. Remoção de anticorpos anti-bactéria do antisoro anti- <i>M. corallinus</i>	32
8.d. Western blots dos extratos de bactérias e amostras de proteínas purificadas	33
9. Ensaio de ligação ao receptor nicotínico	33
9.a. Preparação das membranas	33
9.b. Ensaio de ligação do veneno ao receptor nicotínico	34
9.c. Ensaio para verificar a influência da presença dos soros na ligação do veneno ao receptor nicotínico	34
10. Bioinformática	35
Resultados	36
1. A potencial toxina NXH1 é similar às α -neurotoxinas.	36
2. Foram construídos três plasmídeos recombinantes para a expressão da NXH1 em <i>E. coli</i> .	36
3. Soro anti- <i>M. corallinus</i> do Instituto Butantan reage contra a NXH1 recombinante em Western blot.	39
4. Soro anti-His ₆ -NXH1 produzido em camundongos reage também com outra toxina de <i>M. corallinus</i> , a NXH8, em ELISA e Western blot.	40

5. Soro anti-His ₆ -NXH1 é específico para o veneno de <i>M. corallinus</i> .	41
6. Veneno de <i>M. corallinus</i> contém componente que se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina.	42
7. Soro anti-His ₆ -NXH1 não inibe a ligação de componentes do veneno de <i>M. corallinus</i> ao receptor nicotínico.	43
Discussão	45
Figura 1. Estrutura tridimensional e sítio funcional de uma α -neurotoxina, a erabutoxina a.	53
Figura 2. Cobra coral <i>M. corallinus</i> .	54
Figura 3. Esquema do plasmídeo recombinante pRSETb- <i>nxb1</i> .	55
Figura 4. Esquema do plasmídeo recombinante pCP- <i>nxb1</i> .	56
Figura 5. Esquema do plasmídeo recombinante pRSETb-ZZ- <i>nxb1</i> .	57
Figura 6. Sequências completas dos clones <i>nxb1</i> , <i>nxb3</i> e <i>nxb7</i> .	58
Figura 7. Alinhamento da NXH1 com as diversas toxinas de “três dígitos”.	59
Figura 8. Expressão e purificação da proteína recombinante ZZ-NXH1.	60
Figura 9. Expressão da proteína recombinante His ₆ -NXH1.	61
Figura 10. His ₆ -NXH1 purificada.	62
Figura 11. Conformações que uma proteína pode adquirir durante o processo de renaturação.	63
Figura 12. Expressão das proteínas recombinantes ZZ-NXH1 e His ₆ -ZZ-NXH1.	64
Figura 13. Western blot das três construções com os anticorpos anti- <i>M. corallinus</i> .	65
Figura 14. Resultados do ELISA para determinação dos títulos dos soros produzidos.	66
Figura 15. Western blot das proteínas de fusão expressas com o soro anti-NXH1.	67
Figura 16. Western blot das proteínas de fusão expressas com o soro anti-NXH8.	68
Figura 17. Painel de venenos.	69

Figura 18. Western blot do painel de venenos contra o soro anti- <i>M. corallinus</i> .	70
Figura 19. Western blot do painel de venenos contra os anticorpos anti- <i>M. corallinus</i> purificados.	71
Figura 20. Western blot do painel de venenos contra o antisoro anti-NXH1.	72
Figura 21. Ligação do veneno de <i>M. corallinus</i> aos receptores nicotínicos de células musculares esqueléticas de rato.	73
Figura 22. Efeito dos antisoros produzidos sobre a ligação do veneno de <i>M. corallinus</i> aos receptores nicotínicos de células musculares esqueléticas.	74
Figura 23. Esquema mostrando as relações entre os diversos grupos de toxinas de “três dígitos” baseado na sua similaridade estrutural.	75
Tabela 1. K_d aparente da erabutoxina a (Ea) nativa e dos mutantes com alterações no <i>loop I</i> e na região entre os <i>loops I</i> e <i>II</i> .	76
Tabela 2. K_d aparente dos mutantes da erabutoxina a (Ea) com alterações no <i>loop II</i> .	77
Tabela 3. K_d aparente dos mutantes da erabutoxina a (Ea) com alterações no <i>loop III</i> .	78
Referências bibliográficas	79
Apêndice	86
Curriculum Vitae	91

Agradecimentos

Ao Dr. Paulo Lee Ho, pela orientação valiosa, pela atenção, dedicação e paciência e, principalmente, por acreditar na minha capacidade e não me deixar desistir.

Ao Álvaro, por tudo que me ensinou dentro e fora do laboratório, pela paciência infinita, pela ajuda nos alinhamentos, por me ensinar a usar os programas do PHILYP, pela ajuda nas figuras, por todas as discussões que nós tivemos durante o decorrer do projeto, por todo o trabalho feito com a NXH8, por ter injetado os camundongos para mim e, além de tudo isso, pela amizade e pelo companheirismo que sempre marcaram nossa convivência.

À Waldely de Oliveira Dias, pelas dicas sobre os ELISAs e por ter sangrados os camundongos.

A todos os técnicos que passaram pelo nosso laboratório nesses anos, não só pelo meios, soluções e bactérias competentes, mas também pelas conversas e piadas que tornaram o ambiente de trabalho sempre mais descontraído.

À Úrsula pela ajuda, pela amizade, pelo apoio moral e pelas risadas. Essas últimas foram indispensáveis!

A todo o pessoal que trabalhou no Laboratório do Projeto Genoma de *Xylella fastidiosa* do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, e ao pessoal do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, pelos sequenciamentos.

À Dra. Regina Markus por abrir as portas de seu laboratório para que nós pudéssemos realizar os experimentos de ligação do receptor nicotínico.

À Dra. Leticia Lotufo por ter realizado os experimentos de ligação.

Ao Marco Antônio Stephano pelos anticorpos purificados.

À Dra. Hisako Gondo Higashi, ao Dr. Wilson Fernandes, à Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado, à Dra. Luciana Lyra Casais e Silva, à Dra. Josefina Farina Moraes e à Dra. Ivone Kasuko Yamagushi pelos soros e venenos gentilmente concedidos.

Ao Dr. André Ménez por ter gentilmente cedido o vetor pCP.

Ao Dr. Isaías Raw pelo apoio ao projeto e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Ao Dr. Marcelo Bento Soares pela biblioteca de cDNA e pelos trabalhos iniciais de clonagem de potenciais toxinas da *M. corallinus*.

A todos os colegas do laboratório que estiveram sempre dispostos a me ajudar e me apoiaram em todos os momentos.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À FAPESP pela bolsa concedida.

A toda a minha família, por acreditarem em mim até quando eu mesma não acreditava mais, pela paciência e por terem respeitado o meu cansaço e a minha ausência em muitos momentos importantes.

Ao Caio, meu marido, pelo apoio, pela amizade, pela paciência, pelo interesse e, principalmente, pelo amor.

Por fim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, estiveram do meu lado e contribuíram, cada um a sua maneira, para esse projeto.

Abreviaturas

°C - graus Célsius
μg - micrograma
μl - microlitro
Ala (A) - alanina
Amp - ampicilina
Arg (R) - arginina
Asn (N) - asparagina
Asp (D) - aspartato
cAMP - 3', 5' - monofosfato cíclico de adenosina
cDNA - DNA complementar
Ci - Curie
cm - centímetros
cm² - centímetros quadrados
Col E1 - origem de replicação bacteriana
cpm - cintilações por minuto
CX1_HEMHA - citotoxina 1 de *Hemachatus haemachatus*
CX2_NAJMO - citotoxina 2 de *N. mossambica*
CX5_NAJMO - citotoxina 5 de *Naja mossambica*
Cys (C) - cisteína
DAB - diaminobenzidina
ddNTP - didesoxirribonucleotídeo
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleotídeo
EDTA - ácido etinodiaminotetraacético
EK - sítio de clivagem da enteroquinase
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
F Xa - sítio de clivagem do Fator Xa
F1 ori - origem de replicação do fago F1
FMnxh1 - *Forward Multi nxh1 primer*
fmol - fentomol
FPZZnxh1 - *Forward Primer ZZ nxh1*

g - gramas
Gln (Q) - glutamina
Glu (E) - glutamato
Gly (G) - glicina
His (H) - histidina
His 6 - cauda de histidina
IgG - imunoglobulina G
Ile (I) - isoleucina
KCOB_NAJNA - κ -cobrotoxina de *N. naja*
kDa - kilodaltons
LB - Luria-Bertani
Leu (L) - leucina
Lys (K) - lisina
M - molar
MAMB_DENJA - mambina de *D. jamesoni*
Met (M) - metionina
mg - miligramas
ml - mililitros
mm - milímetros
mM - milimolar
mmol - milimol
ng - nanogramas
nm - nanômetros
NXH1 - *neurotoxin homolog 1* - proteína
nxh1 - *neurotoxin homolog 1* - sequência de cDNA
NXH1_MICCO - NXH1 de *M. corallinus*
NXH3 - *neurotoxin homolog 3* - proteína
nxh3 - *neurotoxin homolog 3* - sequência de cDNA
NXH7 - *neurotoxin homolog 7* - proteína
nxh7 - *neurotoxin homolog 7* - sequência de cDNA
NXH8 - *neurotoxin homolog 8* - proteína
nxh8 - *neurotoxin homolog 8* - sequência de cDNA
NXH8_MICCO - NXH8 de *M. corallinus*

NXL1_DENJA - *long neurotoxin 1* de *Dendroaspis jamesoni kaimosae*
 NXL2_BUNMU - κ -bungarotoxina de *B. multicinctus*
 NXL2_OPHHA - *long neurotoxin 2* de *Ophiophagus hannah*
 NXLD_ACAAN - acantofina d de *Acanthophis antarcticus*
 NXLH_BUNMU - *long neurotoxin homolog* de *Bungarus multicinctus*
 NXS1_HYDCY - *Hydrophitoxin 1* de *H. cyanocinctus*
 NXS1_HYDLA - neurotoxina a de *Hydrophis lapemoides*
 NXS1_LATSE - erabutoxina a de *Laticauda semifasciata*
 NXS1_MICNI - *short neurotoxin 1* de *M. nigrocinctus*
 NXS3_AIPLA - neurotoxina c de *Aipisurus laevis*
 OPD - *o*-dihidrocloreto de fenilenodiamina
 Ori - origem de replicação bacteriana
 P T7 - promotor do fago T7
 PBS - *phosphate buffer saline*
 PBT - tampão fosfato 100 mM pH 8, 0,1% Tween 20
 PCR - *Polymerase chain reaction*
 Phe (F) - fenilalanina
 Pro (P) - prolina
 RBS - Ribosome binding site
 RMnxh1 - *Reverse Multi nxh1 primer*
 RNA - ácido ribonucléico
 rpm - rotações por minuto
 RPnxh1- *Reverse Primer nxh1*
 SDS - dodecil sulfato de sódio
 SDS-PAGE - SDS - *polyacrylamide gel electrophoresis*
 Ser (S) - serina
 TBE - tampão Tris-CL 89 mM, Borato 89 mM, EDTA 2,5 mM
 Thr (T) - treonina
 Tris - Tris (hidroxidometil) amino-metano
 Trp (W) - triptofano
 TSYL_DENAN - *synergistic like venom protein* de *D. angusticeps*
 TXCA_DENPO - *acetylcholinesterase toxin c* de *D. polylepis polylepis*
 TXF2_DENPO - toxina FS-2 de *D. polylepis polylepis*

TXM1_DENAN - toxina muscarínica 1 de *D. angusticeps*

TXMB_DENPO - toxina muscarínica beta de *D. polylepis polylepis*

TXW1_OPHHA - *weak toxin* DE-1 de *O. hannah*

Tyr (Y) – tirosina

U – unidade enzimática

UV - ultravioleta

Val (V) - valina

XEN3_XENLA - xenotoxina 3 de *Xenopus laevis*

A sequência *nxxl* foi isolada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno da cobra coral *Micrurus corallinus*. Essa sequência apresenta similaridade estrutural com as toxinas de “três dígitos”, e principalmente com as α -neurotoxinas, devendo apresentar 4 pontes dissulfeto deduzidas por comparação com outras proteínas desta família. Porém, essa potencial toxina não possui alguns aminoácidos importantes para a interação com o receptor nicotínico de acetilcolina na junção neuromuscular. A potencial toxina NXH1 foi expressa em *E. coli* de 3 maneiras distintas. Os melhores resultados foram obtidos quando a NXH1 foi expressa em fusão com uma cauda de histidina. Essa construção permitiu uma rápida e eficiente purificação da proteína recombinante. A proteína de fusão foi usada para a produção de um soro específico anti-NXH1. O soro anti-proteína recombinante, assim como o soro do Instituto Butantan, reconheceu a toxina recombinante em Western blot e ELISA. Além disso, o anti-NXH1 reconheceu em Western blot apenas uma banda presente no veneno de *M. corallinus*, mas não reconheceu os venenos de outras 10 espécies de *Micrurus*. Experimentos de ligação mostraram que componentes do veneno de *M. corallinus* ligam-se aos receptores nicotínicos das membranas de músculo de rato. O soro anti-NXH1 não inibiu a ligação do veneno aos receptores, indicando que, ou a NXH1 não é uma α -neurotoxina, ou o antisoro não consegue impedir a ligação da toxina nativa ao receptor, ou que existem outras α -neurotoxinas do veneno que não são bloqueadas pelo soro anti-NXH1.

Abstract

The *nxh1* sequence has been isolated from a cDNA library from the coral snake *Micrurus corallinus*' venom gland. The deduced protein is highly similar to known "three finger" α -neurotoxins, with four deduced disulfide bridges. However, the predicted protein lacks some important amino acids for the nicotinic acetylcholine receptor interaction. The potential toxin NXH1 was expressed in *E. coli* in three different ways. The best results were obtained when the protein was expressed as a His-tagged fusion protein, which allowed rapid and efficient purification of the recombinant toxin. The fusion protein was used to generate a specific antiserum against NXH1. The produced antiserum, as well as the serum from Instituto Butantan, recognized in ELISA and Western blot the recombinant toxin. Besides, the anti-NXH1 serum recognized in Western Blot a single band from the venom of *M. corallinus* but not the venom from other 10 *Micrurus* species. Binding experiments showed that the components from *M. corallinus* venom bind to nicotinic acetylcholine receptor in rat muscle membranes. The anti-NXH1 serum did not inhibited the binding of the venom to the receptors. It seems that NXH1 is not an α -neurotoxin, or that the antiserum does not inhibit the binding of the native toxin to the receptor, or that the antiserum is not capable to inhibit the action of other α -neurotoxin from the venom.

1. Os venenos de serpentes e as neurotoxinas

As serpentes estão entre os grupos de animais que mais causam medo, repulsa e fascínio ao homem. A imagem da serpente deu origem a vários mitos e lendas nas mais diversas civilizações. Apesar de nem todas as serpentes serem venenosas, é o veneno mortal produzido por muitas delas que inspira medo e respeito. O veneno é utilizado pelas serpentes, assim como por outros grupos de animais venenosos, para paralisar e, freqüentemente, matar as presas e/ou predadores. Os componentes tóxicos individuais dos venenos costumam apresentar uma ação rápida, específica e muito potente, sendo assim, valiosas ferramentas para o estudo de diversos mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares.

Os venenos de serpentes são compostos, principalmente, de polipeptídeos (90 a 95% do peso seco). As glândulas de veneno se desenvolveram a partir de glândulas salivares e por isso, a maioria das toxinas do veneno se desenvolveu a partir de enzimas digestivas e algumas ainda conservam suas funções enzimáticas (Kochva *et al.*, 1983). Muitas dessas enzimas têm ação hidrolítica, sendo importantes na digestão das presas, enquanto outras não têm ação hidrolítica mas contribuem diretamente para o efeito tóxico do veneno (Bon, 1991; Hider *et al.*, 1991). Entre as hidrolases, podemos citar as proteinases, exo e endopeptidases, fosfodiesterases e fosfolipases. As hialuronidases também são de grande importância uma vez que ajudam a espalhar os outros componentes do veneno no tecido da presa (Hider *et al.*, 1991). Outros tipos de enzimas encontradas nos venenos são as oxiredutases e as transferases (Bon, 1991).

As serpentes que apresentam veneno estão classificadas em quatro famílias: Viperidae, Crotalidae, Hydrophiidae e Elapidae. Além de enzimas, os venenos são compostos de toxinas e pequenos peptídeos (Bon, 1991; Hider *et al.*, 1991). Oligopeptídeos de baixo peso molecular são encontrados principalmente nos venenos de Viperidae e Crotalidae. Alguns desses peptídeos agem como inibidores de enzimas, ligando-se às enzimas de desativação da bradicinina (Ferreira & Vane, 1967) ou ligando-se à enzima de conversão de angiotensina I para II (Ferreira *et al.*, 1970). Tanto a bradicinina quanto a angiotensina são importantes reguladores dos sistemas vascular e circulatório de mamíferos.

Diversos grupos de toxinas são encontrados nos venenos de serpentes. As dendrotoxinas são encontradas nos venenos de mambas (*Dendroaspis*) e promovem um aumento na liberação de neurotransmissores. Os venenos de mambas têm também, inibidores de acetilcolinesterase. Há também miotoxinas, como a crotoxina, que são toxinas pequenas presentes nos venenos de crotalídeos. Existem também outras miotoxinas com estrutura de fosfolipases A₂. Outras toxinas agem no sistema vascular, como as sarafotoxinas, que são peptídeos com estrutura similar às endotelinas, e têm ação vasoconstritora; e as hemorraginas, que agem diretamente na parede dos vasos (Bon, 1991).

Muitas toxinas encontradas nos venenos de serpentes agem bloqueando a transmissão do impulso nervoso no terminal sináptico, causando paralisia na presa. Essas toxinas são proteínas ricas em estrutura secundária e pontes dissulfeto (Hider *et al.*, 1990).

Os venenos das serpentes proteróglifas, Elapidae e Hydrophiidae, são extremamente tóxicos e os componentes desses venenos apresentam alta similaridade estrutural e funcional. Entre os componentes mais tóxicos desses venenos estão as neurotoxinas pós-sinápticas de junção neuromuscular (Endo & Tamyia, 1991). Essas neurotoxinas (α e κ -neurotoxinas) bloqueiam o receptor nicotínico de acetilcolina, impedindo a ativação desse receptor pela ligação do neurotransmissor, bloqueando a transmissão de sinal e causando a morte do animal por asfixia pela paralisia de músculos respiratórios (Rosenthal *et al.*, 1994; Falkenstein *et al.*, 1996). As α -neurotoxinas ligam-se a receptores de musculatura esquelética e/ou receptores neuronais e as κ -neurotoxinas ligam-se apenas a receptores neuronais (Chiappinelli *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 1991).

As α e as κ -neurotoxinas pertencem à grande família das chamadas toxinas de “três dígitos”. Essa família de toxinas apresenta uma estrutura terciária característica, com 5 folhas β -pregueadas anti-paralelas formando três alças adjacentes (*loops*) que partem de um pequeno centro globular, onde 4 pontes dissulfeto estão invariavelmente localizadas (Figura 1). Apesar da semelhança estrutural, os componentes dessa família podem ter ações bastante distintas. Os principais grupos de toxinas de “três dígitos” conhecidos, além das α e κ -neurotoxinas, são os seguintes:

1) citotoxinas e cardiotoxinas - estão presentes nos venenos das serpentes dos gêneros *Naja* e *Hemachatus* (Elapidae) e têm ação lítica em um grande número de tipos celulares e membranas. Induzem agregação protéica e provocam despolarização da célula muscular (Dufton & Hider, 1991).

2) fasciculinas - estão presentes nos venenos das serpentes do gênero *Dendroaspis* (Elapidae) e inibem a acetilcolinesterase. Essas proteínas agem em sinergismo com uma outra família de toxinas, as dendrotoxinas (Cervenánský *et al.*, 1991), que apresentam uma estrutura distinta.

3) calseptina - é uma toxina que bloqueia canais de cálcio do tipo L de uma maneira tecido dependente (Weille *et al.*, 1991).

4) toxinas muscarínicas - bloqueiam receptores muscarínicos de acetilcolina (Adem *et al.*, 1988).

5) mambina - foi isolada a partir do veneno de *Dendroaspis jamesonii* e se distingue das outras toxinas pela presença de uma tríade de RGD no *loop* III. Essa toxina inibe a agregação de plaquetas através da sua ligação com a glicoproteína IIb-IIIa, que é um receptor de integrina presente nas plaquetas, responsável pela agregação plaquetária via integração com fibrinogênio (McDowell *et al.*, 1992).

6) outras toxinas - efeitos farmacológicos desconhecidos.

Um dos fatores que distingue as diferentes classes de toxinas de “três dígitos” é a tendência de formar oligômeros. As α -neurotoxinas são essencialmente monoméricas, enquanto as κ -bungarotoxinas são encontradas na forma de dímeros (Oswald *et al.*, 1991; Dewan *et al.*, 1994). Análises de difração de raios X mostraram que as cardiotoxinas formam trímeros com um exterior hidrofóbico e um poro central hidrofílico, que indica uma possível formação de poros ou canais na membrana (Bilwes *et al.*, 1994).

Essa estrutura de “três dígitos” está presente também em um grupo de proteínas de mamíferos ancoradas com fosfatidilinositol chamado de Ly-6, que inclui o CD59, que protege as células do ataque do complemento (Petranka *et al.*, 1992) e o uPAR (receptor para ativador de plasminogênio do tipo uroquinase) (Ploug & Ellis, 1994).

Em sapos, as xenoxinas também apresentam essa mesma conformação (Kolbe *et al.*, 1993). O trabalho de Macleod *et al.* (1998) mostra que a xenoxina -1 ativa canais de cálcio sensíveis a dihidropiridina presentes nas células de villus e causa diminuição do volume dessas células devido ao influxo de cálcio.

Alape-Girón *et al.* (1999) encontrou também uma proteína de *C. elegans* que apresenta aproximadamente 30% de identidade de resíduos com as toxinas de “três dígitos” de elapídeos e apresenta o mesmo padrão de distribuição das cisteínas na molécula. Esse grupo sugere que as α -neurotoxinas, assim como as fosfolipases A₂ e as dendrotoxinas, surgiram a partir do recrutamento de uma estrutura ancestral já existente em proteínas não tóxicas do animal.

As α -neurotoxinas são proteínas pequenas, de 60 a 80 aminoácidos. Essas toxinas são normalmente divididas em dois grandes grupos: as α -neurotoxinas de cadeia curta, que têm de 60 a 62 aminoácidos e apresentam 4 pontes dissulfetos, e as α -neurotoxinas de cadeia longa, que têm de 66 a 74 aminoácidos, possuem uma porção carboxi-terminal mais longa e uma quinta ponte dissulfeto. Essa quinta ponte dissulfeto forma um pequeno *loop* na ponta do *loop* central da toxina. Nessas toxinas, o *loop* I é mais curto que nas α -neurotoxinas de cadeia curta.

Além dessas diferenças estruturais, tanto as α -neurotoxinas de cadeia longa quanto as de cadeia curta ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina do tecido elétrico de *Torpedo marmorata* com a mesma afinidade, mas apenas as de cadeia longa ligam-se com alta afinidade ao receptor neuronal $\alpha 7$ nicotínico (Servent *et al.*, 1997; Tsetlin, 1999). O papel da ponte dissulfeto adicional localizada na ponta do *loop* II foi estudado por duas diferentes abordagens. Estudos conformacionais foram realizados comparando a estrutura das α -conotoxinas (pequenas toxinas peptídicas de moluscos marinhos do gênero *Conus*) com as α -neurotoxinas de cadeia longa. A estrutura da α -conotoxina G1, que não se liga ao receptor neuronal, determinada tanto por difração de raio-X como por ressonância magnética nuclear, não apresenta semelhança com o *loop* II das neurotoxinas. Por outro lado, a estrutura da α -conotoxina ImI, que se liga ao receptor neuronal, revelada por ressonância magnética nuclear, mostrou-se semelhante à região da ponta do *loop* II das α -neurotoxinas de cadeia longa. Isso indica que a presença da quinta ponte dissulfeto no *loop* central das α -neurotoxinas longas é um fator conformacional essencial para a ligação ao receptor neuronal (revisado por Tsetlin, 1999). Além disso, os estudos de Servent *et al.* (1998) mostraram que a reposição das duas cisteínas da quinta ponte dissulfeto das α -neurotoxinas de cadeia longa por serinas causa uma redução de afinidade pelo receptor neuronal de 35 vezes, enquanto a afinidade pelo receptor de *Torpedo* diminui apenas 6 vezes. Além disso, uma inserção desse *loop* numa posição análoga em uma α -neurotoxina de cadeia curta aumentou a afinidade dessa pelo receptor neuronal em 20 vezes.

Recentemente, Lin *et al.* (1998) sugeriu a existência de um terceiro grupo de α -neurotoxinas de tamanho intermediário, ou seja, 62 a 68 aminoácidos. Esse grupo apresenta 8 cisteínas em posições análogas às das outras neurotoxinas e outras duas cisteínas adicionais no *loop* I, formando uma ponte dissulfeto interna a esse *loop*. Esse grupo não apresenta a ponte dissulfeto na ponta do *loop* II, característica das α -neurotoxinas de cadeia longa. Essas neurotoxinas foram identificadas em diversas najas (Lin *et al.*, 1998, Endo & Tamyia, 1991, Hung *et al.*, 1998, Chang *et al.*, 1996; Chang & Lin, 1997, Shafqat *et al.*, 1991) e podem estar relacionadas com estágios da evolução das neurotoxinas (Lin *et al.*, 1998, Chang & Lin, 1997).

Muitas das serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae, produzem simultaneamente α -neurotoxinas de cadeia curta e de cadeia longa (Tamiya *et al.*, 1999). Além disso, freqüentemente são encontradas mais de uma forma da mesma toxina no veneno de uma mesma espécie (Tamiya *et al.*, 1985; Obara *et al.*, 1989; Fuse *et al.*, 1990; Ducancel *et al.*, 1990; Afifiyan *et al.*, 1998). Essas diferentes formas, pelo menos em alguns casos, parecem estar associadas a diferenças nos hábitos alimentares dos animais, de acordo com a região onde os indivíduos foram coletados (Afifiyan *et al.*, 1998).

Os primeiros trabalhos de isolamento de α -neurotoxinas datam do final da década de 50 e início da década de 60 (Endo & Tamiya, 1991). Durante os anos 60, algumas dessas neurotoxinas começaram a ser caracterizadas (Yang, 1965; Tamiya & Arai, 1966; Karlsson *et al.*, 1966). Desde então, dezenas de seqüências de α -neurotoxinas foram determinadas.

Na década de 70 foram realizados vários estudos visando desvendar a relação entre estrutura e função das moléculas de neurotoxinas através de modificações químicas estruturais e comparação com os dados de seqüências, cada vez mais numerosos. Vários resíduos importantes para a neurotoxicidade foram determinados (revisado por Karlsson, 1979). Em 1976, a estrutura da erabutoxina b (*Laticauda semifasciata*) foi determinada por cristalografia (Low *et al.*, 1976; Tsernoglou and Petsko, 1976). Esse resultado, juntamente com os conhecimentos prévios, possibilitou a determinação do possível sítio de ligação ao receptor nicotínico.

A partir do final dos anos 70, muitos estudos se dedicaram à determinação da estrutura das neurotoxinas em solução (revisado por Dufton & Hider, 1983). O conhecimento da estrutura das α -neurotoxinas impulsionou a pesquisa da imunologia dessas toxinas no nível molecular (revisado por Ménez, 1991). As α -neurotoxinas foram as principais ferramentas usadas nos estudos de Changeaux e colaboradores (Changeux *et al.*, 1967, 1970; Changeaux & Podleski, 1968; Menier *et al.*, 1972) para a caracterização farmacológica e bioquímica do receptor nicotínico de acetilcolina, que hoje é um dos receptores mais bem conhecidos.

2. As cobras corais.

As cobras corais são os únicos elapídeos da América, compreendendo três gêneros: *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus*. As corais brasileiras pertencem ao gênero *Micrurus* e são conhecidas por apresentarem uma coloração formada por anéis vermelhos, pretos e brancos ou amarelos. São animais geralmente pequenos, mas podem atingir até 1,60 metros de comprimento. As cobras corais diferenciam-se das outras serpentes venenosas brasileiras pela ausência de fosseta loreal, cabeça arredondada recoberta com placas e escamas grandes e

pequenos dentes inoculadores de veneno fixos no maxilar superior, na região anterior da boca (proteróglifas). As corais costumam ser pouco agressivas, não atacando o homem através de botes, tendo sido responsáveis por apenas 0,47% de um total de 70600 casos de acidentes ofídicos registrados no Brasil entre junho de 1986 e dezembro de 1989 (Anônimo, 1990). A maioria dos acidentes acontece por manuseio de cobras ou quando são pisoteadas com o pé descalço. Além do comportamento pouco agressivo, essas serpentes costumam viver em ambientes florestais e ter hábitos semi-fossoriais, o que contribui para a baixa incidência de acidentes de envenenamento por corais (Anônimo, 1990). Porém, quando ocorrem, os acidentes costumam ser bastantes graves, podendo causar morte por asfixia após 5 ou 6 horas (Vital Brazil, 1980).

A espécie de coral *Micrurus corallinus* (Figura 2) está presente em regiões florestais da Mata Atlântica. O estudo de história natural dessa espécie realizado por Marques (1992) mostrou que, ao contrário da maioria das cobras corais, essa espécie parece apresentar maior atividade no período diurno. Os espécimes usados para esse estudo tinham de 190 a 1040 mm. Sua dieta é composta principalmente de anfisbenídeos (70%), gimnofionos (10%) e eventualmente, algumas serpentes e lagartos (Marques & Sazima, 1997).

As duas espécies de cobras corais que mais causam acidentes no Brasil são *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*, pois essas espécies habitam regiões populosas no sul, sudeste e centro do país. Sabe-se que os efeitos causados pelo seus venenos são distintos. Ambos atuam na junção neuromuscular, porém o veneno de *Micrurus frontalis* apresenta apenas ação pós-sináptica (Vital Brazil *et al.*, 1976/ 77), enquanto o veneno de *Micrurus corallinus* tem ação pré e pós-sináptica (Vital Brazil & Fontana, 1983/ 84). Além disso, estudos imunológicos mostraram que o soro produzido contra o veneno de *M. corallinus* (anti-*M. corallinus*) neutraliza o efeito letal do veneno de *M. corallinus*, mas não dos venenos das outras principais corais brasileiras: *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. spiixi*. Por outro lado, o soro anti-*M. frontalis* foi capaz de neutralizar os efeitos dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. spiixi*, mas não o da *M. corallinus* (Higashi *et al.*, 1990; 1995). O soro anti-*M. spiixi* apresentou resultados semelhantes aos obtidos com o soro anti-*M. frontalis*, sugerindo a presença de antígenos de ação tóxica semelhante nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. spiixi*, mas diferente dos antígenos do veneno de *M. corallinus*. O antisoro anti-elapídico produzido no 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.*,

1990; 1995) e de corais norte americanas (*M. fulvius* e *M. carinicauda dumerilli*) (Cohen & Selignann Jr., 1968; Flowers, 1966).

Poucos estudos bioquímicos são encontrados com relação aos venenos de cobras corais. Seus hábitos as tornam difíceis de capturar e a manutenção em cativeiro é bastante complicada, devido à sua dieta especializada. Além disso, a quantidade de veneno coletável por extração é muito pequena (0-5 µl/ extração/ cobra) e 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 antisoro. Com isso, raramente tem-se veneno disponível para efetuar estudos farmacológicos e bioquímicos dos seus componentes.

O efeito letal dos venenos de *Micrurus* é causado por sua ação neurológica (Vital Brazil, 1965; 1980; 1987; Vital Brazil *et al.*, 1976/77; Vital Brazil & Fontana, 1983/84 Jimenez-Porras, 1973; Snyder *et al.*, 1973; Patrão-Lomba *et al.*, 1973; Daló *et al.*, 1989; Moussatché & Meléndez, 1979). Além dessa ação, outros efeitos farmacológicos foram observados: como efeito cardiotoxico (Weis & McIsaac, 1971; Ramsey *et al.*, 1971; 1972a; 1972b), hemorrágico (Moussatché *et al.*, 1976; Moussatché & Meléndez, 1979; Gomez-Leiva, 1978) e mionecrótico (Vital Brazil, 1965; 1980; 1987; Vital Brazil *et al.*, 1976/77; Vital Brazil & Fontana, 1983/84, Jimenez-Porras, 1973; Snyder *et al.*, 1973; Patrão-Lomba *et al.*, 1973; Daló *et al.*, 1989). Várias atividades biológicas e enzimáticas (acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, hialuronidase, L-aminoácido desidrogenase, 5' nucleotidase, fosfodiesterase, fosfolipase A₂, leucina aminopeptidase, L-aminoácido oxidase, atividade proteolítica, coagulante e hemorrágica) têm sido relatadas em venenos de *Micrurus* de diversas espécies e subespécies (*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 dos componentes responsáveis por essas atividades tem sido isolados e caracterizados. O trabalho de Rosso *et al.* (1996) apresenta a purificação e caracterização, a partir do veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus* de sete α-neurotoxinas, cinco fosfolipases A₂ e outras quatro proteínas similares a outras toxinas, além da sequência completa de aminoácidos da α-neurotoxina majoritária desse veneno. Outros estudos apresentaram o isolamento de proteínas com seqüências N-terminais características de α-neurotoxinas, como aquelas relatadas por Aird *et al.* (1993), do veneno de *M. surinamensis surinamensis*; por Alape-Girón *et al.* (1996), do veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus*; e por Francis *et al.* (1997), do veneno de *M. frontalis frontalis*.

3. A biologia molecular e as toxinas.

Tradicionalmente, os estudos bioquímicos realizados com venenos animais iniciam-se com o isolamento dos componentes a partir do veneno bruto e posteriormente, são realizados experimentos para a caracterização de cada um desses componentes. Essa abordagem apresenta algumas limitações. Primeiramente, é necessária uma quantidade razoavelmente grande de veneno para o isolamento dos componentes, e uma quantidade razoável do determinado componente para sua caracterização. Assim, alguns componentes importantes presentes em baixa concentração no veneno podem ser ignorados.

O advento da biologia molecular trouxe novas possibilidades para o estudo das toxinas. Toxinas de venenos de animais pequenos, como abelhas e vespas podem agora ser clonadas e caracterizadas. Toxinas que eram purificadas do veneno bruto em pequenas quantidades, podem agora ser potencialmente produzidas em maior quantidade (Adams & Oliveira, 1994). Estudos de mutação sítio dirigida já vem sendo usados para elucidar os sítios responsáveis pela ligação de algumas toxinas aos seus receptores específicos, como foi feito nos trabalhos de Pillet *et al.* (1993) e Trémeau *et al.* (1995) que caracterizaram os resíduos mais importantes na ligação de erabutoxina a de *Laticauda semifasciata* ao receptor nicotínico. Essa técnica possibilita também o estudo de outras características das moléculas, como a determinação de epitopos específicos reconhecidos por anticorpos ou o mapeamento dos aminoácidos importantes para a estrutura da molécula (Zinn-Justin *et al.*, 1994; Ducancel *et al.*, 1996).

Muitas toxinas de serpentes vêm sendo produzidas em *Escherichia coli* por engenharia genética nos últimos anos, como por exemplo: uma fosfolipase A₂ de *Notechis scutatus scutatus* (Hodgson *et al.*, 1993), uma outra fosfolipase A₂ do grupo II de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Lathrop *et al.*, 1992), a cardiotoxina V (Chi *et al.*, 1994, Chang *et al.*, 1996), a cardiotoxina VII (Chang *et al.*, 1996) e as dendrotoxinas K, I e E (Smith *et al.*, 1995). A produção dessas toxinas recombinantes vem possibilitando inúmeros estudos de atividade, estrutura e características bioquímicas e imunológicas dessas moléculas.

As neurotoxinas também estão sendo caracterizadas com o auxílio da biologia molecular. Em 1989, Ducancel *et al.* clonou e expressou em *E. coli* a erabutoxina a de *Laticauda semifasciata* em fusão com a proteína A de *Staphylococcus aureus*. Esse grupo de pesquisa mostrou que a proteína de fusão expressa bloqueava os receptores nicotínicos de acetilcolina com uma afinidade mais baixa que a toxina selvagem e apresentava também toxicidade mais baixa *in vivo*. No ano seguinte, o mesmo grupo demonstrou que com a adição de uma metionina

na posição -1 da toxina, era possível, após a clivagem química com brometo de cianogênio, obter a toxina recombinante com as mesmas propriedades da toxina nativa (Boyot *et al.*, 1990). Esse grupo, liderado pelo Dr. André Ménez, vem realizando diversos trabalhos usando a engenharia genética de neurotoxinas. Nos trabalhos de Pillet *et al.* (1993) e Trémeau *et al.* (1995), foi feita a caracterização da molécula da erabutoxina a através de mutagênese sítio dirigida. Em outro trabalho, Fromen-Romano *et al.* (1997) demonstrou que é possível transformar uma neurotoxina num toxóide por engenharia genética, com poucas mutações. Gillet *et al.* (1992) inseriu a erabutoxina a entre os resíduos +6 e +7 da fosfatase alcalina de *E. coli* por engenharia genética, produzindo um híbrido que é exportado para o periplasma da bactéria e que retém, tanto a atividade enzimática, quanto a capacidade de ligar-se ao receptor colinérgico. O híbrido é estável e resistente à proteólise.

Além da erabutoxina a, outros genes para neurotoxinas vem sendo expressos. Fiordalisi *et al.* (1991) expressou a κ -bungarotoxina em *E. coli* em fusão com a proteína intestinal ligante de ácidos graxos de rato. Após a clivagem da proteína de fusão, a toxina recombinante foi capaz de ligar-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina de gânglio ciliar de galinha com a mesma afinidade da toxina nativa. A técnica de mutagênese sítio dirigida também foi usada na caracterização molecular da α -bungarotoxina (Rosenthal *et al.*, 1994) e da toxina α de *Naja mossambica mossambica* (Ackermann & Taylor, 1997; Ackermann *et al.*, 1998). Mais recentemente, 4 neurotoxinas de *Naja naja sputatrix* (Afifiyan *et al.*, 1998) também foram clonadas e expressas em *E. coli*.

Uma abordagem que vem sendo bastante utilizada é o isolamento de seqüências de cDNA que codificam para proteínas com estrutura similar a toxinas já caracterizadas, ou seja, possíveis toxinas, a partir de bibliotecas feitas com glândulas de veneno de serpentes (Danse *et al.*, 1990; Ducancel *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1996; Chang & Lin, 1997; Smith *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1998; Tamiya *et al.*, 1999). Os estudos dessas seqüências de cDNAs tem proporcionado também evidências sobre a evolução desses genes de toxinas. Alguns trabalhos sugerem mecanismos como evolução acelerada (Nakashima *et al.*, 1993, 1995; Ogawa *et al.*, 1992, 1996; Tamiya *et al.*, 1999) e duplicação gênica (Tamiya *et al.*, 1999).

A idéia de nossa atual linha de pesquisa é utilizar essa nova abordagem para caracterizar alguns dos principais componentes do veneno da cobra coral *Micrurus corallinus*.

4. O ponto de partida.

A glândula de veneno das serpentes venenosas é um órgão diferenciado e especializado em síntese de toxinas (Sato *et al.*, 1969). Essas toxinas são sintetizadas pelo processo normal de síntese protéica e os RNA mensageiros são relativamente estáveis (Sato *et al.*, 1969; Takeda *et al.*, 1974). Partindo desses pressupostos, foi construída uma biblioteca de expressão de cDNA a partir da glândula de veneno da coral brasileira *Micrurus corallinus* em λ gt11D (Pharmacia) (Ho *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1997). Essa serpente foi escolhida porque seu veneno é um dos mais tóxicos entre as serpentes desse gênero quando injetado em camundongos (Silva *et al.*, 1993), o número de acidentes com humanos envolvendo essas serpentes é o maior entre as corais e o seu veneno é usado na imunização de cavalos para a produção do antisoro anti-elapídico no Instituto Butantan. A partir dessa biblioteca foram isolados alguns genes que apresentavam similaridade estrutural com lectinas, fatores natriuréticos, α -neurotoxinas e fosfolipases A₂ (Ho *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1997). Os cDNAs dos clones *nxh1*, *nxh3*, *nxh7* e *nxh8* codificam para potenciais α -neurotoxinas, sendo que os clones *nxh1*, *nxh3* e *nxh7* codificam para possíveis isoformas da mesma toxina (Ho *et al.*, 1995). O estudo de cada um dos produtos desses genes depende agora de sua subclonagem e expressão. Além da produção e da caracterização bioquímica e farmacológica dessas novas toxinas, ainda há a possibilidade da produção de anticorpos neutralizantes contra o veneno da coral a partir da imunização de animais de laboratório com as toxinas recombinantes. O presente trabalho teve o intuito de produzir, por engenharia genética, uma potencial α -neurotoxina do veneno de *M. corallinus* (codificada pelo clone *nxh1*) em *E. coli*.

Objetivos gerais do projeto

- Isolar seqüências de cDNA que codifiquem para possíveis toxinas do veneno de *Micrurus corallinus* e definir sua função no envenenamento.
- Produzir antisoros contra as toxinas recombinantes visando uma possível neutralização do efeito letal do veneno da serpente.

Objetivos específicos

- Clonar e expressar o cDNA da potencial toxina NXH1 de *Micrurus corallinus* em *E. coli*.
- Verificar se a toxina recombinante expressa é reconhecida pelo soro do Instituto Butantan.
- Produzir um antisoro para a toxina recombinante.
- Testar se o antisoro produzido reage contra o veneno de *Micrurus corallinus* e de outras espécies de *Micrurus* e de elapídeos.
- Verificar se o veneno de *Micrurus corallinus* se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina.
- Verificar se o antisoro produzido contra a NXH1 recombinante impede a ligação do veneno de *Micrurus corallinus* aos receptores nicotínicos de acetilcolina.

1. Subclonagem da sequência *nxb1* nos vetores pRSETb e pCP.

1.a. Os vetores.

O vetor pRSETb

Os vetores da série pRSET (Invitrogen) são plasmídeos 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. Esses vetores têm um promotor de T7 e um sítio de ligação ao ribossomo (RBS) posicionado antes do códon ATG de iniciação de tradução, uma série de seis códons para histidina que funciona como um domínio ligante de metais na proteína traduzida, uma sequência do gene 10 do fago T7 estabilizadora do transcrito, uma sequência com o sítio de clivagem da enteroquinase e um sítio de clonagem da proteína de interesse (Figura 3).

O domínio ligante de metal permite a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade em uma coluna quelante carregada com 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 plasmídeos têm ainda um gene de resistência a ampicilina, que serve como marca de seleção.

O plasmídeo recombinante deve ser amplificado (manipulado) em uma cepa de *E. coli* que não contém a RNA Polimerase do fago T7. A expressão pode ser feita numa cepa dessa bactéria que contenha a RNA Polimerase do fago T7 sob o controle de um promotor indutível, como *Lac UV-5*, que é induzido na presença de IPTG.

Os vetores da série pRSET têm um sítio policlonal com diversos sítios para enzimas de restrição (ver Figura 3). A diferença entre os plasmídeos pRSET a, b e c, é a sequência do sítio policlonal, permitindo a escolha do vetor na qual a sequência da proteína fique em fase com o ATG inicial.

O vetor pCP

O vetor pCP foi gentilmente cedido pelo laboratório do Professor André Ménez, CEA, França. Esse vetor possui, assim como o pRSET, um promotor de T7. Esse promotor está posicionado imediatamente antes da sequência dos domínios ZZ 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 4. O pCP tem ainda um gene de resistência a antibiótico, no caso, ampicilina.

A presença dos domínios ZZ permite a purificação dessa proteína de fusão por cromatografia em coluna de *IgG Sepharose*.

A expressão se dá da mesma forma que nos vetores pRSET, ou seja, 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.

1.b. Os primers.

Para as clonagens e os sequenciamentos dos plasmídeos recombinantes foram utilizados os 6 diferentes oligonucleotídeos, descritos a seguir:

T7 Promoter Primer: Oligonucleotídeo universal para sequenciamento a partir do promotor do fago T7.

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Universal M13 Reverse Primer: Oligonucleotídeo universal para sequenciamento de qualquer vetor contendo a sequência N-terminal da β -galactosidase.

5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

Forward Multi nxh1 e Reverse Multi nxh1: Oligonucleotídeos desenhados para amplificação da sequência *nxh1* e sua clonagem no vetor pCP.

FMnxh1

5' CGGGGTACCCGAATTCATCGAGGGCCGCATAGTATGTTACAAGAGGCATGCG 3'

Kpn I *Eco*R I sítio para Fator Xa Sequência *nxh1*

RMnxh1

5' CCGGAATTCTCGAGGATCCCAATTTTCAAACCTACAGATCTAG 3'

*Eco*R I *Xho* I *Bam*H I Sequência *nxh1* (região não traduzida)

Forward Primer ZZ nxh1 e *Reverse Primer nxh1*: Oligonucleotídeos desenhados para amplificação da sequência dos domínios ZZ em fusão com a sequência *nxh1* a partir do pCP-*nxh1* para clonagem no vetor pRSET b.

FPZZnxh1

5' CCCGGATCCGGTACCACATATGGCGCAACACGATG 3'

*Bam*H I *Kpn* I Sequência ZZ

RPnxh1

5' AAACCCAAGCTTGAATTCTCCATGATGGATGAGAGCGA 3'

Hind III *Eco*R I Sequência *nxh1* (região não traduzida)

1.c. Preparação dos vetores, preparação dos insertos e reação de ligação.

Os plasmídeos pRSETb e pCP foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* competentes da linhagem JM109 (Promega) pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989). As bactérias transformadas foram amplificadas em meio LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina e o DNA plasmidial foi purificado com o kit *Nucleon Mip* da Amersham. Os vetores purificados foram digeridos com uma das enzimas de restrição de clonagem (ver itens 1.d e 1.e) em tampão próprio, nas condições recomendadas pelo fabricante de cada enzima. Uma pequena amostra do DNA digerido foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,25 µg/ml. O gel foi visualizado em transiluminador UV. Depois de confirmada a digestão, todo o DNA plasmidial digerido foi purificado a partir de gel de agarose *low melting* 1% (Sambrook *et al.*, 1989). Os plasmídeos digeridos e purificados foram então submetidos a uma nova digestão com a segunda enzima de restrição usada para a clonagem. Os resultados da digestão foram analisados em gel de agarose 1% e depois purificados a partir de gel de agarose *low melting* 1%.

O cDNA do clone *nxhl* foi amplificado pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do vetor pGEM11zf(+)-*nxhl* para as clonagens em pRSETb e pCP, e toda a região compreendendo as seqüências do clone *nxhl* e dos domínios ZZ de *Staphilococcus aureus* foi amplificada a partir do plasmídeo recombinante pCP-*nxhl* para a construção do plasmídeo recombinante pRSETb-ZZ-*nxhl*. A reação tinha um volume final de 100 µl, contendo: 50 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 0,5 mM de dNTP Mix (Gibco-BRL), 1 µl (5U) de *Taq* DNA Polimerase, 1 µl de DNA molde (purificado por *Nucleon Mip* - Amersham) em tampão para PCR 1X da Amersham. Foram realizados 30 ciclos de replicação, com temperatura de denaturação de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 55°C por 1 minuto e temperatura de polimerização de 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 7 minutos a 72°C. O produto de PCR foi purificado de gel agarose *low melting* 1% pelo método descrito por Sambrook *et al.* (1989). O DNA purificado foi então digerido separadamente por duas horas a 37°C, com cada uma das enzimas de restrição utilizadas nas clonagens, sendo novamente purificado de gel de agarose *low melting* 1% após cada digestão.

As reações de ligação foram feitas sempre em banho a 16°C por 16 horas com a enzima T4 DNA Ligase (Gibco-BRL), numa relação molar de 1:6 vetor/ inserto. Foram feitos controles de ligação nos quais o DNA do inserto foi omitido. O volume total foi de 20 µl de reação, dos quais 10 µl foram utilizados para transformação por cloreto de cálcio de bactérias *E. coli* competentes da linhagem JM 109.

1.d. Construção do plasmídeo recombinante pRSETb-*nxhl*.

O cDNA do clone *nxhl* foi amplificado por PCR com os primers *Forward Multi nxhl* e *Universal M13 Reverse* (ver item 1.b). A seqüência amplificada foi clonada no vetor pRSETb nos sítios de restrição para as enzimas *Hind* III e *Eco* RI, segundo o protocolo descrito no item 1.c. A Figura 3 mostra o esquema do plasmídeo recombinante pRSETb- *nxhl*.

1.e. Construção dos plasmídeos recombinantes pCP-*nxhl* e pRSETb-ZZ-*nxhl*.

A seqüência do cDNA do clone *nxhl* foi amplificada por PCR com os primers *Forward Multi nxhl* e *Reverse Multi nxhl* e clonada no plasmídeo pCP nos sítios de restrição das enzimas *Kpn* I e *Bam*H I, como mostra o esquema da Figura 4. O plasmídeo recombinante pCP-*nxhl* foi utilizado como fita molde no PCR feito para amplificar a seqüência da fusão desde os domínios ZZ até o fim da seqüência do clone *nxhl*. Essa seqüência foi então subclonada no vetor

pRSETb nos sítios das enzimas de restrição *Hind* III e *Bam*H I, como esquematizado na Figura 5 (pRSETb-ZZ-*nxhl*).

1.f. Seleção dos clones recombinantes.

A seleção dos clones que continham os plasmídeos recombinantes pRSETb-*nxhl*, pCP-*nxhl* ou pRSETb-ZZ-*nxhl* foi feita, primeiramente, através do plaqueamento das bactérias transformadas com o produto de ligação em placas de LB ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina. As bactérias da linhagem JM109 não apresentam o gene de resistência a ampicilina, portanto só os clones que contêm o plasmídeo podem crescer na presença desse antibiótico.

Algumas colônias de bactérias transformadas com o produto de ligação vetor/ inserto foram amplificadas em meio LB líquido com ampicilina. Para a seleção dos plasmídeos recombinantes pRSETb-*nxhl* e pCP-*nxhl*, os DNAs dos plasmídeos dessas colônias foram então purificados pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e digeridos com as enzimas de restrição usadas em cada clonagem por duas horas a 37°C.

Os plasmídeos digeridos foram aplicados em gel de agarose 1% e visualizados em transiluminador UV. As amostras digeridas que apresentavam um inserto do tamanho esperado foram amplificadas novamente em bactérias JM109 e o DNA plasmidial foi purificado com o kit *Nucleon Mip* (Amersham).

Para a seleção dos clones contendo o plasmídeo recombinante pRSETb-ZZ-*nxhl* foi utilizado o método de seleção rápido descrito por Beuken *et al.* (1998), da seguinte maneira: das colônias de bactérias transformadas com o produto de ligação vetor/ inserto, 20 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 em microcentrífuga e o meio foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 40 µl de tampão de aplicação (*Ficoll Dye*) e acrescentou-se 14 µl de fenol: clorofórmio 1:1 a cada tubo. Os tubos foram agitados em vortex por 5-10 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 pRSETb não digerido, além de um padrão de peso molecular. Depois da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e as amostras foram visualizadas em transiluminador UV. Os DNAs das amostras cujo peso molecular era nitidamente maior que o peso do vetor vazio tiveram seu DNA plasmidial purificado com o kit *Nucleon Mip* (Amersham) a partir da própria cultura inicial.

Os possíveis plasmídeos recombinantes foram digeridos com *Bam*H I e *Hind* III por 2 horas a 37°C e novamente analisados em gel de agarose 1%.

1.g. Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.

Os plasmídeos recombinantes pRSETb-*nxh1*, pCP-*nxh1* e pRSETb-ZZ-*nxh1* foram amplificados em bactérias *E. coli* da linhagem JM 109 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/μl. 400 ng de DNA de cada plasmídeo foram sequenciados em sequenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer, Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan), pelo método de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977). Usou-se nos sequenciamentos 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, no caso do pRSETb-*nxh1* e pCP-*nxh1*, foram separados em gel de sequenciamento de DNA de 36 cm de comprimento (4,25% acrilamida: bisacrilamida, na proporção 19:1, em TBE e 7 M uréia) montado segundo a especificação do fabricante, que durou 6 horas. Já as amostras de pRSETb-ZZ-*nxh1* foram aplicadas em capilares de corrida curta (cerca de 45 minutos), inseridos no sequenciador *ABI Prism 310* (Perkin Elmer, Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan). Ambos os aparelhos estão ligados a um sistema de detecção que consiste em uma fonte de laser e um detetor de fluorescência, localizados na parte inferior do gel de sequenciamento. Cada ddNTP *Big-Dye* emite uma fluorescência específica que é captada pelo detetor, 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 plasmídeos recombinantes: pRSETb-*nxh1*: *T7 Primer*; pCP-*nxh1*: *Reverse Multi nxh1*; pRSETb-ZZ-*nxh1*: *T7 Primer*, *Forward Multi nxh1* e *Reverse Multi nxh1*.

2. Expressão das proteínas recombinantes.

Bactérias *E. coli* da linhagem BL 21 (DE3) competentes por cloreto de cálcio, foram transformadas com os plasmídeos recombinantes. As bactérias transformadas foram crescidas em meio líquido 2YT com ampicilina a 37°C, no caso dos plasmídeos pRSETb-*nxh1* e pCP-*nxh1*, e a 30°C, no caso do pRSETb-ZZ-*nxh1*, sob agitação constante até atingirem densidade óptica a 600 nm de 0,6-1,0. Nesse momento, a expressão do gene recombinante foi induzida pela

adição de 1 mM de IPTG ao meio. A cultura permaneceu a 37°C, sob agitação constante por mais 3 horas. Amostras da cultura antes da indução e após as 3 horas foram recolhidas para análise em gel de SDS-PAGE.

A cultura induzida foi centrifugada a 3000 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.

3. Purificação das proteínas de fusão com cauda de histidina.

3.a. Preparação da resina *Chelating Sepharose*.

As proteínas recombinantes His₆-NXH1 e His₆-ZZ-NXH1 foram purificadas com a utilização de uma resina carregada com Ni⁺², como descrito por Crowe & Henko, 1992.

Foi acrescentado à resina *Chelating Sepharose* (Pharmacia) 0,5 volume de NiSO₄ 300 mM. Após mistura por inversão, a resina foi deixada 5 minutos a temperatura ambiente e então centrifugada a 1000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus, com o rotor SS-34 por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados mais dois volumes de NiSO₄ 300 mM. Repetiu-se o procedimento anterior e o sobrenadante foi novamente desprezado. A resina foi lavada 4 vezes com tampão de ligação 1X (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9) e armazenada a temperatura ambiente com dois volumes desse mesmo tampão.

3.b. Purificação da proteína recombinante His₆-NXH1.

As bactérias induzidas foram descongeladas em gelo e ressuspensas em 10 ml de tampão de sonicação (20 mM Tris-HCl pH 7,2, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) para cada 150 ml de cultura. As células foram rompidas por sonicação de 15 minutos 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 10000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus, com o rotor SS-34. A proteína de fusão His₆-NXH1 forma corpúsculos de inclusão no citoplasma da bactéria ficando, portanto, na fração de proteínas insolúveis. As proteínas solúveis, neste caso, foram descartadas.

O pellet foi ressuspendido em 10 ml de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,2, NaCl 100 mM, 3 M uréia, ressonicado e centrifugado novamente nas mesmas condições descritas acima. Lavou-se o pellet, contendo os corpúsculos de inclusão formados pela proteína recombinante por mais duas vezes com esse mesmo tampão. O pellet foi então ressuspendido em 10 ml de tampão de

solubilização (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol, 8 M uréia) e ficou 1 hora sob rotação contínua a temperatura ambiente. A amostra foi então centrifugada a 10000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus, com o rotor SS-34, por 20 minutos a 4°C.

Foi montada uma coluna de 5 ml de *Chelating Sepharose* carregada com Ni^{+2} (item 3.a) e equilibrada com tampão de ligação (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7,9) contendo 8 M de uréia. A amostra foi passada na coluna com fluxo de aproximadamente 1 ml por minuto. A coluna foi então lavada com 10 volumes de tampão de ligação com 8 M de uréia. A proteína foi então eluída com tampão de eluição (1 M imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9) também contendo 8 M de uréia. Foram coletadas amostras de 1 ml e a concentração de proteína foi monitorada através da leitura das amostras em espectrofotômetro a 280 nm. A coluna foi lavada com tampão quelante (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA) e guardada em 1X tampão de ligação com 20% etanol.

Para retirar a uréia e o imidazol da amostra eluída, foi feita uma diálise (corte de 3,500 Da) contra concentrações decrescentes de uréia (4, 2, 1.75, 1.5, 1.25, 1.0, 0.5 e 0 M) em PBS contendo 10 mM histidina durante 8 dias a 4°C. A amostra dializada foi analisada em gel de SDS-PAGE e armazenada em geladeira.

3.c. Renaturação da proteína recombinante His₆-NXH1.

O procedimento de renaturação foi feito durante a purificação, que nesse caso, ao invés de ser feita em coluna, foi feita em *batch*. Após a solubilização em tampão contendo 8 M uréia e β -mercaptoetanol, a amostra foi diluída 100 vezes gota a gota em 2 litros de tampão 20 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, sem uréia. A amostra diluída ficou uma noite sob agitação branda a 4°C para possibilitar a renaturação das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína.

No dia seguinte, 2 ml de resina carregada com Ni^{+2} foram adicionados à amostra, que foi deixada por mais 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente. A resina foi então separada e lavada várias vezes com tampão de ligação 1X (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9). Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e adicionou-se à resina 3 ml de tampão de eluição (1 M imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9). A amostra foi misturada por 30 minutos por rotação a temperatura ambiente. O eluato foi separado e guardado em geladeira e repetiu-se o procedimento de eluição. Após a coleta de uma segunda amostra eluída, a resina foi lavada várias vezes com tampão quelante 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, contendo também 100 mM EDTA. A resina foi guardada em 1X tampão de ligação com 20% etanol.

3.d. Purificação e renaturação da proteína recombinante His₆-ZZ-NXH1.

A proteína recombinante His₆-ZZ-NXH1 foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺². A resina *Chelating Sepharose* foi carregada com o metal segundo o protocolo descrito no item 3.a. As purificações foram feitas a partir de culturas de 500 ml. As bactérias induzidas foram ressuspensas em 50 ml de tampão sonicação sem EDTA (20 mM Tris pH 7,2, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) e sonicadas por 10 minutos em ciclos de 5 segundos, a 60% da potência, em gelo. As frações de proteínas solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação por 20 minutos a 4°C, numa velocidade de 10000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus, com o rotor SLA-1500. A fração insolúvel foi ressuspensa em tampão de sonicação e ressonicada. Após nova centrifugação o sobrenadante foi adicionado ao sobrenadante anterior e o pellet foi descartado. A proteína recombinante é solúvel devido a presença dos domínios ZZ. A fração solúvel foi passada numa coluna de 4 ml de resina carregada com Ni⁺² com um fluxo de 1 ml/min. A coluna foi lavada com aproximadamente 10 volumes de tampão de ligação 1X (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9). A proteína recombinante foi então eluída com tampão de eluição contendo 1 M imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9. A coluna foi então lavada com tampão quelante (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA) e guardada em 1X tampão de ligação com 20% etanol.

As amostras foram dializadas contra PBS contendo 10 mM de histidina durante 48 horas a 4°C para retirar o imidazol.

4. Purificação e renaturação da proteína recombinante ZZ-NXH1.

4.a. Coluna de IgG Sepharose.

A purificação da proteína de fusão foi realizada segundo o procedimento descrito por Drevet *et al.*, 1997. A resina *IgG Sepharose Fast Flow Pharmacia* (5 ml para cada 10 ml de lisado bacteriano) foi equilibrada com 5 volumes de PBT (tampão fosfato 100 mM pH 8,0, 0,1% Tween 20). O extrato bacteriano foi sonicado e centrifugado por 20 minutos a 4°C, numa velocidade de 10000 rpm em centrífuga Sorvall RC 26 Plus, com o rotor SLA-1500. O sobrenadante foi adicionado à resina e a mistura foi incubada por 3 horas em roller a 4°C para adsorção da proteína. A coluna foi então montada em geladeira. O monitoramento do processo foi feito através da leitura de frações de 1 ml em espectrofotômetro, nas absorvâncias de 260 e 280 nm. A coluna foi lavada com PBT até a absorvância atingir uma linha de base. Seguiu-se

uma lavagem com acetato de amônio 5 mM pH 5.0, até a densidade óptica atingir nova linha de base. A eluição foi feita com tampão 500 mM acetato de amônio pH 3.4. As amostras que apresentaram leituras de absorbância foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Cada amostra foi ressuspensa em 100-200 µl de 100 mM Tris pH 7.6.

4.b. Renaturação da proteína recombinante ZZ-NXH1.

O processo de purificação foi feito como descrito acima. Após a lavagem com acetato de amônio 5 mM pH 5.0, a coluna foi carregada com 2 volumes do tampão de renaturação (tampão fosfato 100 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, glutatona reduzida /glutatona oxidada 2: 4 mM) e deixada no roller durante 15 horas em temperatura ambiente. A coluna foi então montada e lavada novamente com acetato de amônio 5 mM pH 5.0. A eluição foi feita em acetato de amônio pH 3.4, como descrito no item 4.a.

5. Análise das proteínas recombinantes.

5.a. SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

As amostras de culturas induzida e não induzida, e as amostras coletadas durante a purificação da proteína recombinante foram analisadas em géis unidirecionais desnaturantes de poliacrilamida 15% ou, em alguns casos, géis de gradiente de 10 a 20% 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 β-mercaptoetanol e fervidas por 3 minutos, imediatamente antes da aplicação no gel. Depois da eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue R250, exceto nos géis usados para Western blot.

6. Imunização dos camundongos.

A proteína recombinante His₆-NXH1 foi usada para a imunização de camundongos segundo os protocolos de Harlow & Lane, 1988. Foram inoculados 10 µg da proteína recombinante His₆-NXH1 em um grupo de 5 camundongos, 10 µg da proteína recombinante His₆-NXH8 (gentilmente cedida por Álvaro Rossan Brandão Prieto da Silva, do nosso laboratório) em 5 camundongos e 10 µg de cada uma das toxinas recombinantes (His₆-NXH1 e His₆-NXH8) em um grupo de 10 animais. 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 subcutâneamente. Foi feita uma sangria dos

animais um ou dois dias antes de cada injeção. Foram realizadas um total de 4 injeções com um tempo de 14 dias entre elas. O título do soro foi acompanhado por ELISA.

7. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O antígeno (proteína recombinante) foi diluído para 1 µg/ 100 µl em tampão de sensibilização (tampão carbonato 0,1 M, pH 9,6). Foi adicionado 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 (5 g 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. O soro de camundongo foi diluído 1:50 em tampão de diluição (tampão de lavagem com 0,25% de BSA) com extrato de bactéria. (Para uma cultura de 200 ml bactéria *E. coli* BL21 (DE3) sonicada e ressuspensa em 20 ml, foi utilizado 1 ml para cada 4 ml de tampão de diluição.) 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 de cabra anti-IgG de camundongo biotinilado, diluído em tampão de diluição 1:2000. As placas foram incubadas por mais 1 hora a 37°C. Repetiram-se as lavagens. Foi acrescentado a cada poço 100 µl de estreptoavidina conjugada com peroxidase diluída 1:1000 em tampão de lavagem. As placas foram incubadas por mais uma hora a 37°C e lavadas novamente. A revelação foi feita com *o*-dihidrocloreto de fenilenodiamina (8 mg de OPD, 20 ml de tampão citrato/ fosfato, 10 µl de água oxigenada). Para parar a reação foram adicionados 100 µl de H₂SO₄ 8 N. A leitura dos resultados foi feita em leitor de ELISA *Multiskan* com filtro de 492 nm.

8. Western blots.

8.a. Western blots dos 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 *semy-dry* (Pharmacia) para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de transferência utilizado foi 1X tris-glicina com 10% metanol. A transferência foi feita com uma corrente de

0,65 mA/cm² 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 foram marcadas a lápis. O bloqueio foi feito com PBS 1X, 0,05% Tween-20, 5% leite em pó desnatado MOLICO por uma noite.

Na manhã seguinte, foi adicionado o primeiro anticorpo numa diluição específica para cada soro utilizado. A membrana foi incubada com 0,1 ml/cm² de soro diluído em PBS 1X, 0,05% 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 anti-IgG de cavalo ou anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Repetiram-se as lavagens descritas anteriormente. A revelação foi feita com DAB (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 de revelação e adicionada água destilada. A membrana foi lavada com água várias vezes e seca em papel de filtro. Todo o procedimento foi feito a temperatura ambiente.

8.b. Venenos e anticorpos anti-*M. corallinus*.

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 *Micrurus corallinus* foram purificados por ácido caprílico (Dos Santos *et al.*, 1989), filtração tangencial (*cut off* 30 kDa) e cromatografia de troca iônica (Corthier *et al.*, 1984), gentilmente cedidos por Marco Antônio Stephano (Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan).

8.c. Remoção de anticorpos anti-bactéria do antisoro anti-*M. corallinus*.

O soro anti-*M. corallinus* foi obtido do Instituto Butantan. A remoção dos anticorpos anti-bactéria presentes no soro de cavalo anti-*M. corallinus* foi feita segundo descrito em Gruber & Zingales (1995). Foi crescida uma cultura de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) por uma noite a 37°C sob agitação constante. A cultura foi separada em 2 frascos com 2 litros 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 pellet 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 centrífuga e centrifugada novamente. Os tubos foram armazenados a -20°C.

No dia seguinte, o soro de cavalo anti-*M. corallinus* foi diluído 1:50 em PBS, 1% BSA. Cada pellet bacteriano previamente descongelado em gelo 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 pellet foi desprezado. Repetiu-se o ciclo de absorção mais 13 vezes. Ao final, o soro foi filtrado em membrana Millipore 0,22 e armazenado a -20°C.

8.d. Western blots dos extratos de bactérias e amostras de proteína purificada.

O protocolo usado foi o mesmo que o descrito em 8.a, com algumas modificações. O primeiro anticorpo, soro de cavalo anti-*M. corallinus* (item 8.c), foi incubado com a membrana de nitrocelulose por 2 horas numa diluição de 1:500 em PBS 1X, 0,05% Tween-20 com 10% de extrato de bactérias BL21 (DE3) sonificado. Foram feitas 3 lavagens com PBS 1X, 0,05% Tween-20 de 10 minutos cada. O segundo anticorpo utilizado foi anticorpo de cabra anti-IgG de cavalo biotilado diluído 1:1000 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 streptavidina conjugada com 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 e a membrana foi seca como o descrito anteriormente (item 8.a).

9. Ensaio de ligação ao receptor nicotínico.

Os experimentos de ligação ao receptor nicotínico foram feitos pela Dra. Letícia Veras Costa Lotufo no Laboratório da Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP.

9.a. Preparação das membranas.

A partir de uma cultura primária de células de músculo esquelético de rato (Markus *et al.*, 1996). Resumidamente, as células foram raspadas, centrifugadas e lavadas com Tris 20 mM pH7,4, 10 mM EDTA para retirar o meio de cultura. As células foram então homogeneizadas em

potter, centrifugadas, lavadas mais uma vez e ressuspensas no tampão de ligação (Tris 20 mM pH7.4, 0.1 mM EDTA). As membranas foram armazenadas a -70°C até o momento do uso. A dosagem de proteínas das membranas foi feita pelo método de Bradford.

9.b. Ensaio de ligação do veneno ao receptor nicotínico.

Foram preparados tubos com um volume de 10 µl com as seguintes concentrações de veneno de *M. corallinus*: 0.0, 0.05, 0.5, 5.0 µg/ 100 µl de reação. Em cada tubo foram adicionados 20 µl de membranas de células musculares esqueléticas de cultura primária (ver item 9.a - 25 µg de proteína total) e em todos os tubos foram adicionados 50 µl de tampão de ligação com 0.2 mg/ml de BSA e mais 10 µl de tampão de ligação sem albumina. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por uma hora e então foram adicionados 10 µl a ¹²⁵I-α-bungarotoxina diluída a 2 x 10⁻⁸ M (atividade específica - 146 Ci/ mmol). Foi feita nova incubação de uma hora e os tubos foram então centrifugados a 18000 rpm em microcentrífuga por 10 minutos e os sobrenadantes foram desprezados. As membranas foram ressuspensas em tampão de ligação e lavadas novamente da maneira descrita anteriormente. 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.

9.c. Ensaio para verificar a influência da presença dos soros na ligação do veneno ao receptor nicotínico.

O veneno de *M. corallinus* (20 µg por tubo) foi incubado previamente por 15 minutos com concentrações crescentes dos antisoros anti-His₆-NXH1, anti-His₆-NXH8 e anti-mix a temperatura ambiente. Em seguida, foram colocados 50 µl de tampão de ligação com albumina (0.2 mg/ ml de BSA) em todos os tubos. Foi adicionado a cada tubo 10 µl de veneno ou de veneno mais um dos antisoros ou só de um antisoro ou só de nicotina. A cada tubo foram então adicionados 20 µl de solução de membranas (25 µg de proteína total) e os tubos foram incubados a temperatura ambiente por uma hora. Após a incubação, foi adicionada a cada tubo 10 µl de α-bungarotoxina marcada com ¹²⁵I, diluída a 2 x 10⁻⁸. Foi feita nova incubação de uma hora e os tubos foram então centrifugados a 18000 rpm em microcentrífuga por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. As membranas foram ressuspensas em tampão de ligação e lavadas novamente da mesma maneira. 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.

10. Bioinformática.

A sequência NXH1 foi submetida a uma comparação com o banco de dados disponível na Internet com a utilização do programa PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated – Basic Local Alignment Search Tool* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast> - Altschul *et al.*, 1997). Utilizando algumas das seqüências selecionadas no resultado do PSI-BLAST, foi feito um alinhamento no programa MACAW (*Multiple Aligment Construction and Analysis Workbench* – Schulder *et al.*, 1991). Esse mesmo grupo de seqüências foi utilizado para a construção de uma árvore que reflete a similaridade estrutural dos diversos grupos funcionais de toxinas de "três dígitos" com um pacote de programas chamado PHILIP (*Phylogeny Inference Package*). Para o cálculo das distâncias entre as seqüências foi utilizado o programa Prodist (*Program to compute distance matrix from protein sequences*). O programa FITCH (*Fitch-Margoliash and Least-Squares Distance Methods*) foi utilizado para a construção da árvore propriamente dita.

1. A potencial toxina NXH1 é similar às α -neurotoxinas.

A sequência *nxb1* (*neurotoxin homolog 1*), como já foi dito, foi caracterizada a partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de cobras corais *Micrurus corallinus* (Ho *et al.*, 1995). Dessa biblioteca foram isoladas mais duas sequências, *nxb3* e *nxb7*, que possuem similaridade estrutural com as α -neurotoxinas de cadeia curta e com a *nxb1* (Figura 6). Essas 3 sequências possuem a região que codifica para o peptídeo sinal idêntica no nível de nucleotídeos e aminoácidos. Os clones *nxb3* e *nxb7* têm a mesma sequência de aminoácidos e as sequências de DNA diferem em apenas quatro nucleotídeos entre si (Figura 6). As sequências de aminoácidos da NXH3 e da NXH7 diferem da NXH1 em apenas 2 resíduos. Essas 3 sequências podem codificar para isoformas de uma mesma toxina, caso haja a expressão de mais de uma forma no mesmo indivíduo, ou um caso de SNP (*single nucleotide polymorphism*), caso haja uma variação do veneno entre os indivíduos. Apenas a sequência *nxb1* foi escolhida para ser clonada e expressa em *E. coli* no presente trabalho.

A proteína codificada pela sequência *nxb1* (peptídeo maduro) é composta de 57 aminoácidos, dos quais 8 são cisteínas, possivelmente formando 4 pontes dissulfeto (Figura 7), deduzidas por comparação com outras proteínas relacionadas. Essa sequência, quando submetida a uma comparação com o banco de dados de sequências disponíveis na Internet com o programa PSI-BLAST, apresenta grande similaridade estrutural com as α -neurotoxinas de cadeia curta. As sequências que apresentam maior similaridade com a NXH1 são: 1º) neurotoxina a de *Hydrophis lapemoides* (NXS1_HYDLA), 2º) hydrophitoxina a de *Hydrophis cyanocinctus* (NXS1_HYDCY) e 3º) neurotoxina c de *Aipysurus laevis* (NXS3_AIPLA). Essas 3 sequências estão alinhadas com a NXH1 na Figura 7.

2. Foram construídos 3 plasmídeos recombinantes para a expressão da NXH1 em *E. coli*.

A sequência de DNA do peptídeo maduro da potencial toxina NXH1 foi primeiramente clonada no vetor pCP, em fusão com os domínios ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus*, responsáveis pela ligação às IgGs (Drevet *et al.*, 1997). Para isso, a sequência foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pGEM11zf(+)-*nxb1* e inserida no vetor pCP (Figura 4). O

plasmídeo recombinante, chamado de pCP-*nxxh1*, foi usado para transformar células *E. coli* da linhagem BL 21 (DE3). Essa linhagem bacteriana contém no seu genoma o gene da RNA Polimerase do fago T7 sob o controle do promotor *Lac UV-5*. A adição de IPTG ao meio induz a expressão dessa RNA Polimerase, que por sua vez induz o promotor de T7 presente no plasmídeo, permitindo a expressão da proteína recombinante. Essas células transformadas foram crescidas em meio líquido com ampicilina, induzidas por três horas com IPTG e os extratos de bactérias foram analisados em gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Blue R250 (Figura 8). A proteína de fusão ZZ-NXH1 foi expressa na forma solúvel no citoplasma da bactéria e tinha uma massa molecular aparente de 22 kDa (Figura 8), que corresponde ao valor esperado calculado em consulta ao programa *ProtParam tool* disponível na Internet (<http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/protparam>). Essa proteína recombinante ZZ-NXH1 foi purificada em coluna de *IgG Sepharose*. A Figura 8 apresenta um gel de SDS-PAGE com diversas amostras, entre elas uma amostra do sobrenadante do lisado bacteriano de *E. coli* BL 21 (DE3), transformada com o pCP-*nxxh1*, antes e depois da adsorção na resina de *IgG Sepharose*. Nota-se que a adsorção é muito baixa uma vez que há pouca diferença visível entre as duas amostras. Além disso, a amostra de proteína purificada apresenta, além da banda de 22 kDa que corresponde à proteína recombinante, outras bandas contaminantes. Esses resultados mostram que grande parte da proteína expressa não foi adsorvida na resina e que a proteína não foi eluída da coluna de forma homogênea. Mesmo assim, esse sistema de expressão tem a grande vantagem de permitir a produção de uma proteína de fusão na forma solúvel. Isso deveria facilitar o processo de renaturação da proteína recombinante. Por isso, foram feitas algumas tentativas de renaturação dessa proteína purificada na própria coluna com a adição de glutatona oxidada e reduzida, mas infelizmente esse protocolo danificou a resina permanentemente, inviabilizando o processo. O rendimento do processo foi baixo e a análise da amostra renaturada em gel de SDS-PAGE mostrou várias bandas com a mesma intensidade (dados não mostrados).

Os problemas com o sistema pCP nos levaram a procurar um novo sistema de expressão. Optou-se então pela utilização do sistema de expressão pRSET (Invitrogen), que possibilita a clonagem de proteínas heterólogas em fusão com uma cauda de seis histidinas. A proteína recombinante é expressa na forma de corpúsculos de inclusão e pode ser facilmente purificada em coluna carregada com Ni^{+2} por um protocolo que inclui um passo de solubilização dos corpúsculos de inclusão com 8 M de uréia.

A sequência do peptídeo maduro da potencial toxina NXH1 foi clonada no pRSETb em fase com a cauda de histidinas, sob controle do promotor de T7 (Figura 3). O plasmídeo

recombinante pRSETb-*nxh1* foi usado para transformar células *E. coli* da linhagem BL 21 (DE3). As bactérias transformadas com pRSETb-*nxh1* foram induzidas com IPTG por três horas e expressaram uma proteína recombinante de aproximadamente 12 kDa (Figura 9) na forma de corpúsculos de inclusão. Essa massa molecular corresponde ao valor esperado, calculado pelo programa *ProtParam tool*. O extrato de bactérias foi sonicado e os corpúsculos de inclusão foram separados das proteínas solúveis por centrifugação. A fração insolúvel foi solubilizada com 8 M de uréia e a proteína recombinante foi purificada em uma coluna de *Chelating Sepharose* carregada com Ni^{+2} . A Figura 10 mostra o resultado da purificação da proteína recombinante His₆-NXH1. Esse sistema de expressão mostrou um alto rendimento, além de rapidez e eficiência no processo de purificação. Porém, a proteína de fusão His₆-NXH1 mostrou-se solúvel apenas em condições de 8 M de uréia. A retirada da uréia através de diálise promoveu a precipitação de grande parte da proteína.

Os processos de renaturação de proteínas comumente utilizados consistem na adição de um agente desnaturante, seguida da retirada lenta desse agente. Durante a retirada do agente desnaturante, a proteína atinge estados estruturais intermediários (Figura 11) e, a partir de então, pode ou adquirir a conformação nativa ou formar agregados. Parece que ocorre a formação de agregados com a proteína recombinante His₆-NXH1 durante a diálise com a retirada da uréia, mesmo quando o processo é feito lentamente.

O sistema pRSET já estava sendo utilizado em nosso laboratório há algum tempo e por isso, já esperávamos que esse tipo de problema pudesse acontecer. Além disso, nossa experiência com o sistema pCP indicou que a fusão dos domínios ZZ à potencial toxina NXH1 tornava-a solúvel. Por isso, paralelamente, foi construído um outro plasmídeo recombinante. Nessa nova construção, a região dos domínios ZZ juntamente com a sequência NXH1 foram amplificadas a partir do pCP-*nxh1* e clonadas no pRSETb (Figura 5). Essa construção tinha como objetivo a produção de uma proteína solúvel, devido à presença dos domínios ZZ, e de fácil purificação, devido à presença da cauda de histidinas. Imaginamos que uma maior solubilidade da proteína deveria facilitar a renaturação da proteína (Figura 11). Bactérias BL 21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante pRSETb-ZZ-*nxh1* e induzidas com IPTG. As bactérias transformadas cresciam muito vagarosamente a 37°C e apresentavam baixa expressão da proteína recombinante. Esse problema foi solucionado crescendo-se a cultura a 30°C com a adição de glicose ao meio de cultura. Foi demonstrado que em bactérias λ DE3 que crescem na fase estacionária sem a adição de glicose no meio, ocorre uma desrepressão mediada por cAMP do promotor *Lac UV-5* (Novy, 1999). Isso pode causar um estresse nas bactérias,

inibindo o crescimento da cultura. Outro fator de estresse poderia ser a temperatura, por isso as culturas passaram a ser crescidas a 30°C.

Foi observada a expressão de uma proteína solúvel de massa molecular aparente próxima a 30 kDa (Figura 12), um pouco mais alto do que o valor esperado de 26 kDa, calculado pelo programa *ProtParam tool*. A purificação dessa proteína foi feita em coluna de Ni⁺² a partir da fração solúvel do extrato bacteriano. Infelizmente, apesar do nível de expressão da proteína recombinante codificada pelo plasmídeo recombinante pRSETb-ZZ-*nxh1* (Figura 12) ser equivalente ao do pRSETb-*nxh1* (Figura 9), os resultados de purificação foram bastante distintos. O rendimento de purificação da proteína solúvel His₆-ZZ-NXH1 foi extremamente baixo (resultados não mostrados) e por isso, esse sistema não foi mais explorado e o sistema pRSETb-*nxh1*, expressando a proteína recombinante His₆-NXH1 na forma insolúvel, foi selecionado para a realização dos experimentos subseqüentes.

3. Soro anti-*M. corallinus* do Instituto Butantan reage contra a NXH1 recombinante em Western blot.

Os sistemas de expressão utilizados pCP-*nxh1*, pRSETb-*nxh1* e pRSETb-ZZ-*nxh1*, expressaram após indução, proteínas recombinantes que podiam ser visualizadas em gel de SDS-PAGE como uma banda mais forte que aparece apenas no extrato induzido (Figuras 8, 9 e 12). Com o intuito de saber se essas proteínas recombinantes eram reconhecidas pelo soro anti-*M. corallinus* produzido pelo Instituto Butantan, foi feito um Western blot dos extratos de bactérias BL 21 (DE 3) transformadas com os três plasmídeos recombinantes (pCP-*nxh1*, pRSETb-*nxh1* e pRSETb-ZZ-*nxh1*) utilizando o soro de cavalo imunizado com o veneno da cobra coral *M. corallinus* do Instituto Butantan. O soro utilizado foi previamente submetido a um processo de remoção dos anticorpos anti-bactérias *E. coli* (Gruber & Zingales, 1995).

Os resultados do Western blot estão mostrados na Figura 13. Apesar do procedimento de limpeza do soro, pode-se observar uma banda um pouco acima de 21 kDa em todas as canaletas que parece ser uma proteína bacteriana reconhecida pelo soro. As três proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo soro, inclusive, mais fracamente, nos extratos não induzidos, indicando uma pequena expressão da proteína recombinante mesmo antes da adição de IPTG.

4. Soro anti-His₆-NXH1 produzido em camundongos reage também com outra toxina de *M. corallinus*, a NXH8, em ELISA e Western blot .

A proteína recombinante His₆-NXH1 foi usada na imunização de 5 camundongos para a obtenção de um antisoro específico contra a proteína recombinante. Paralelamente, outro grupo de 5 animais foi imunizado com uma outra proteína recombinante, a His₆-NXH8, preparada por Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva. A sequência *nxh8* foi isolada a partir da mesma biblioteca de cDNA que a *nxh1* e codifica também para uma potencial α -neurotoxina de *M. corallinus*, com 65 aminoácidos e 10 cisteínas (Figura 7), que também foi clonada no sistema pRSET, sendo que a proteína expressa foi chamada de His₆-NXH8. Um terceiro grupo de 10 animais foi imunizado com as 2 proteínas recombinantes His₆-NXH1 e His₆-NXH8 ao mesmo tempo (o soro resultante foi chamado de anti-mix). Foram realizadas 4 injeções com um intervalo de aproximadamente 14 dias entre elas e os animais foram sangrados sempre antes de cada inoculação e após 14 dias da última injeção. Os títulos dos soros foram monitorados por ELISA em placas sensibilizadas com cada uma das proteínas recombinantes. Os resultados das titulações dos soros coletados na última sangria estão mostrados na Figura 14. O soro de cavalo anti-*M. corallinus* do Instituto Butantan reconhece as proteínas His₆-NXH1 e His₆-NXH8 mais fracamente que os soros específicos. O soro anti-His₆-NXH1 reconhece a proteína recombinante His₆-NXH1 e também a His₆-NXH8, da mesma forma que o soro anti-His₆-NXH8 reconhece a His₆-NXH8 e a His₆-NXH1 em ELISA. Da mesma maneira, o soro anti-mix reconhece ambas as toxinas recombinantes. Além disso, os títulos dos soros produzidos contra as proteínas recombinantes foram sempre menores que 1/50000 (Figura 14).

Os soros produzidos anti-His₆-NXH1 e anti-His₆-NXH8 também foram utilizados em reações de Western blot contra os extratos de bactéria *E. coli* BL 21 (DE3) transformadas com os três plasmídeos recombinantes (pCP-*nxh1*, pRSETb-*nxh1* e pRSETb-ZZ-*nxh1*). Os resultados (Figura 15) mostraram que o soro anti-His₆-NXH1 reconhece as três proteínas recombinantes, além de outras bandas de alto peso molecular na amostra pCP-*nxh1* induzido. Nas amostras de não induzidos, uma banda fraca de proteína recombinante também é reconhecida, como acontece também no Western blot feito com o soro anti-*M. corallinus* do Instituto Butantan (item 3).

O soro anti-His₆-NXH8 também reconhece em Western blot as bandas correspondentes às proteínas recombinantes ZZ-NXH1, His₆-NXH1 e His₆-ZZ-NXH1 (Figura 16). Assim como o soro anti-His₆-NXH1, o soro anti-His₆-NXH8 também reconhece algumas bandas de alto peso

molecular no pCP-*nxb1* induzido e levemente uma banda de alto peso molecular no pRSETb-ZZ-*nxb1*.

Resumidamente, as proteínas recombinantes NXH1 são reconhecidas pelos soros anti-His₆-NXH1 e anti-His₆-NXH8, produzidos em camundongos, em ELISA e Western blot. Foram feitos também reações de Western blot que mostraram que a proteína recombinante His₆-NXH8 também é reconhecida pelos soros anti-His₆-NXH1 e anti-His₆-NXH8 (Prieto da Silva, A. R. B., resultados não mostrados), mostrando uma reação cruzada dos dois antisoros com os dois antígenos.

5. Soro anti-His₆-NXH1 é específico para o veneno de *M. corallinus*.

Com a intenção de testar se o soro produzido anti-His₆-NXH1 reagiria contra o veneno de *M. corallinus*, de outras serpentes do gênero *Micrurus* e de outros gêneros, foi feito um painel de venenos que foi usado em reações de Western blot contra o soro anti-His₆-NXH1 e contra o soro anti-*M. corallinus* do Instituto Butantan. Primeiramente, foi feito um gel de SDS-PAGE de gradiente de 10 a 20% de poliacrilamida com um painel de 16 venenos de diferentes espécies de serpentes, que foi corado com Coomassie Blue R250 (Figura 17). Nesse painel foram aplicados venenos de 11 diferentes espécies de *Micrurus*, incluindo os venenos das principais corais brasileiras do ponto de vista de saúde pública: *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*. Foram incluídos também os venenos dos elapídeos *Dendroaspis angusticeps*, *Notechis scutatus scutatus* e *Bungarus multicinctus*, e também uma cardiotoxina do veneno de *Naja naja kaouthia*. Também foram aplicados no gel os venenos de 2 outras serpentes não elapídeos: *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*. O gel mostra que os venenos de elapídeos, principalmente do gênero *Micrurus* apresentam um padrão de proteínas semelhante, com abundância na região de baixo peso molecular. Já os outros venenos apresentam padrões um pouco distintos: o veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta uma banda forte ao redor de 30 kDa e outros componentes abaixo de 21 kDa, e o veneno de *Bothrops jararaca* apresenta diversas bandas fortes de proteínas distribuídas entre 14 e 70 kDa.

O gel com o painel de venenos foi repetido e foi feito um Western blot contra o soro anti-*M. corallinus*. O resultado desse Western blot está mostrado na Figura 18. O soro reage com todos os venenos de *Micrurus* do painel e ainda com os venenos de *Notechis scutatus scutatus*, *Bungarus multicinctus* e, mais fracamente, com o veneno de *Dendroaspis angusticeps*. Esse soro reage também contra a cardiotoxina de *Naja naja kaouthia*; reage fracamente com uma banda de baixa massa molecular de *Crotalus durissus terrificus* e com uma banda de mais de 45 kDa de

Bothrops jararaca. Esse Western blot foi repetido, mas dessa vez foram utilizados anticorpos anti-*M. corallinus* purificados do soro de cavalo (Figura 19). Esses anticorpos reagiram fortemente apenas com os venenos de: *M. corallinus*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. spixii*, *M. frontalis* e *M. spixii martiusi* e fracamente com os outros venenos.

Finalmente, o painel de venenos foi usado num Western blot contra o soro anti-His₆-NXH1. O resultado, apresentado na Figura 20, mostrou que esse antisoro reconhece exclusivamente uma banda no veneno de *M. corallinus*.

O mesmo foi feito com o soro anti-His₆-NXH8 (Prieto da Silva, A. R. B., resultados não mostrados). Esse soro reconheceu os venenos de 4 espécies de elapídeos: *M. corallinus*, *M. frontalis altirostris*, *Dendroaspis angusticeps* e *Bungarus multicinctus* e portanto não é tão específico quanto o soro anti-His₆-NXH1.

6. Veneno de *M. corallinus* contém componente que se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina.

Estudos farmacológicos realizados por Vital Brazil & Fontana (1983/84) indicaram que o veneno de *M. corallinus* possui uma ação pré- e pós-sináptica na junção neuromuscular. A ação pós-sináptica deveria ser resultado da ação de α -neurotoxinas presentes no veneno de *M. corallinus* que se ligariam aos receptores nicotínicos de acetilcolina na junção neuromuscular, bloqueando assim a transmissão de sinal. Dessa forma, foi montado um ensaio utilizando a α -bungarotoxina para verificar se o veneno de *M. corallinus* se liga a esses receptores nicotínicos. A α -bungarotoxina é uma α -neurotoxina de cadeia longa caracterizada no veneno de *Bungarus multicinctus* (Rosenthal *et al.*, 1994). Sabe-se que essa toxina liga-se com alta afinidade ao receptor nicotínico de acetilcolina em membranas de células musculares esqueléticas. Para o ensaio foram utilizadas membranas de células musculares esqueléticas de cultura primária de rato. O veneno de *M. corallinus* foi incubado com as membranas nas concentrações de 0,0, 0,05, 0,5, e 5,0 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$. Adicionou-se após uma hora a α -bungarotoxina marcada com ^{125}I . Após mais uma incubação de uma hora, as membranas foram lavadas e a radioatividade foi medida em um cintilador. Os resultados obtidos, apresentados na forma de gráfico na Figura 21, mostraram que quantidades crescentes de veneno de *M. corallinus* provocaram uma diminuição na radioatividade medida nas membranas, indicando que o veneno realmente possui componentes que se ligam aos receptores nicotínicos de acetilcolina no músculo esquelético, impedindo a ligação da ^{125}I - α -bungarotoxina.

7. Soro anti-His₆-NXH1 não inibe a ligação de componentes do veneno de *M. corallinus* ao receptor nicotínico.

Se o veneno de *M. corallinus* se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina na junção neuromuscular, então o soro contra o(s) componente(s) responsável por essa ligação pode impedir a ligação desse componente ao receptor. Assim, os soros anti-His₆-NXH1, anti-His₆-NXH8 e anti-mix foram testados para ver se inibiam a ligação de componentes do veneno ao receptor. Para isso, foi feito um ensaio de ligação da ¹²⁵I- α -bungarotoxina em receptores nicotínicos presentes em membranas de células musculares esquelética de rato. O ensaio foi feito da seguinte maneira: primeiramente o veneno de *M. corallinus* foi incubado por 30 minutos com os soros anti-His₆-NXH1 ou anti-His₆-NXH8 ou anti-mix. Em tubos separados foram adicionados às membranas: o veneno de *M. corallinus*; o veneno mais cada um dos soros; só o soro anti-mix; e nicotina como controle. Houve uma incubação de uma hora e então se adicionou a todos os tubos a ¹²⁵I- α -bungarotoxina. Depois de uma hora, as membranas foram lavadas e a radioatividade foi medida em um cintilador. O resultado está apresentado na forma de gráfico na Figura 22. O controle sem veneno mostrou a ligação da ¹²⁵I- α -bungarotoxina aos receptores nicotínicos das membranas. Isso ocorre tanto na presença quanto na ausência do soro anti-mix, indicando que o soro por si só não atrapalha a ligação da α -bungarotoxina aos receptores. O controle com nicotina mostrou baixa contagem de radioatividade pois a nicotina liga-se aos receptores impedindo a ligação da α -bungarotoxina. Com a adição de 0.05 μ g de veneno em 100 μ l de reação, algum(s) componente(s) do veneno se ligou aos receptores, diminuindo os valores de radioatividade. Isso não ocorre na presença dos soros anti-His₆-NXH8 ou anti-mix, os quais mostraram resultados semelhantes aos controles sem veneno. Provavelmente, esses soros possuem anticorpos que se ligam às toxinas do veneno, impedindo a ligação dessas aos receptores nicotínicos. Já a presença do soro anti-His₆-NXH1 não alterou o resultado do experimento, indicando que talvez a toxina NXH1 tenha uma função distinta e não se ligue aos receptores nicotínicos. Os resultados se repetiram com 0.50 μ g de veneno por 100 μ l, só que de maneira mais acentuada. 5.0 μ g de veneno em 100 μ l de reação mostrou-se ser uma quantidade excessiva de veneno para ocorrer a inibição da ligação pelos soros. Resumidamente, o veneno de *M. corallinus* se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina das membranas de células musculares esqueléticas de rato. Os soros anti-His₆-NXH8 e anti-mix, mas não o anti-His₆-NXH1, inibem a ligação das toxinas do veneno a esses receptores. A NXH8 é provavelmente um dos componentes presente no veneno responsáveis pela ligação aos receptores nicotínicos ou o soro produzido contra a proteína NXH8 é capaz de neutralizar outras toxinas estruturalmente

relacionadas responsáveis pelo bloqueio dos receptores nicotínicos da junção neuromuscular. Os resultados indicam que a NXH1 não deve ser uma α -neurotoxina, ou que o antisoro produzido contra a NXH1 recombinante não é capaz de neutralizar a NXH1 nativa do veneno, se ela for a responsável pela atividade de bloqueio dos receptores nicotínicos da junção neuromuscular, ou que existem outras α -neurotoxinas no veneno que não são bloqueadas pelo antisoro anti-His₆-NXH1.

No presente trabalho, foi feita a clonagem de uma potencial toxina de *Micrurus corallinus* chamada de NXH1. A sequência primária da NXH1 apresenta semelhança estrutural com as chamadas toxinas de "três dígitos". Existem diversos grupos de toxinas com diferentes ações farmacológicas que pertencem à família das toxinas de "três dígitos". Essa família de proteínas tem um padrão de 8 cisteínas conservadas que formam quatro pontes dissulfeto invariantes (Figura 7) e que conferem a essas moléculas uma conformação espacial com três alças (*loops*) adjacentes que partem de um pequeno centro globular.

A proteína NXH1 clonada foi expressa em bactérias *E. coli*, em fusão com uma cauda de 6 histidinas. A toxina recombinante foi utilizada para a produção de um antisoro em camundongos. Esse soro anti-His₆-NXH1 reconheceu em Western blot e ELISA a NXH1 recombinante e também uma outra potencial toxina recombinante de *M. corallinus*, a NXH8. Além disso, esse soro reconheceu apenas uma banda do veneno de *M. corallinus* em Western blot e não reconheceu os venenos de outras 10 espécies de *Micrurus*, inclusive o veneno de *M. frontalis*. Esse resultado é importante do ponto de vista clínico, pois dependendo da sensibilidade desse antisoro, ele poderia ser usado para distinguir nas vítimas de acidentes com cobras corais se o envenenamento foi provocado pela picada da *M. corallinus* e não por outra coral. As duas espécies de cobras corais responsáveis pelo maior número de acidentes no Brasil são *M. corallinus* e *M. frontalis*. Como já foi dito, os venenos dessas duas espécies têm uma ação distinta (Vital Brazil *et al.*, 1976/77; Vital Brazil & Fontana, 1983/84). Por isso, alguns procedimentos eficientes no tratamento de pessoas picadas por *M. frontalis*, não têm efeito em pessoas picadas por *M. corallinus* (Vital Brazil *et al.*, 1976/77). Portanto, a importância de saber qual a serpente que causou o envenenamento não está só na obtenção de informações estatísticas de frequência de envenenamento por uma dada espécie em uma região, mas também poderia ter um impacto no diagnóstico e assim, aumentar a eficiência terapêutica. Estudos de soroneutralização mostraram que o veneno da cobra coral *M. corallinus* parece ser único entre os venenos desse gênero de serpentes, no sentido que o soro anti-*M. corallinus* neutraliza o efeito letal do veneno de *M. corallinus*, mas não neutraliza o efeito letal dos venenos das outras principais corais brasileiras (Higashi *et al.*, 1995). O fato dos nossos resultados de Western blot

mostrarem que a NXH1 é específica do veneno da coral *M. corallinus* está de acordo com os esses estudos.

De todos os grupos conhecidos de toxinas de “três dígitos”, o que mais se assemelha estruturalmente com a NXH1 é o das α -neurotoxinas, que bloqueiam os receptores nicotínicos de acetilcolina na junção neuromuscular. Apesar dessa semelhança estrutural, a NXH1 pode não ser uma α -neurotoxina.

Com o intuito de comparar a sequência da NXH1 com os diversos grupos de toxinas de “três dígitos”, foi feito um alinhamento dessa sequência com pelo menos uma sequência de cada grupo funcional (Figura 7). O alinhamento foi feito com auxílio do programa MACAW. Esse programa ajuda na construção de alinhamentos múltiplos usando uma tabela de valores de similaridade dada por uma certa matriz, no caso Blosum 62 (Karlin & Altschul, 1990). Quanto maior o valor atribuído, mais intensa a cor do resíduo. Todas as sequências foram comparadas com a NXH1. As sequências foram escolhidas da seguinte maneira: foram selecionadas as primeiras sequências de cada um dos grupos que apareceram na lista de sequências estruturalmente relacionadas à NXH1 obtida pelo programa PSI-BLAST (resultados não mostrados). Alguns grupos de toxinas de “três dígitos” não estavam representados ou apareceram só uma vez no resultado do PSI-BLAST. Neste caso, algumas sequências foram escolhidas aleatoriamente. A sequência NXS1_MICNI (*short neurotoxin 1*) foi escolhida por ser a única sequência de α -neurotoxina descrita de uma espécie de *Micrurus*. A NXLH_BUNMU (*long neurotoxin homolog*) foi adicionada ao alinhamento por sua semelhança com a NXH8. A xenoxina (XEN3_XENLA) foi incluída apenas como grupo externo (*outgroup*) para a análise de similaridade estrutural feita posteriormente (Figura 23).

A erabutoxina a (NXS1_LATSE) também foi adicionada ao alinhamento da Figura 7. Essa neurotoxina de cadeia curta, caracterizada a partir do veneno de *Laticauda semifasciata*, teve o seu sítio de ligação ao receptor nicotínico de acetilcolina caracterizado por mutagenese sítio dirigida (Pillet *et al.*, 1993; Trémeau *et al.*, 1995). Os mutantes foram testados em experimentos de ligação aos receptores presentes no órgão elétrico de *Torpedo marmorata*. Os resultados desses trabalhos estão resumidos nas Tabela 1, 2 e 3. Os resíduos que foram considerados importantes para essa ligação estão assinalados em negrito nas tabelas e por retângulos na Figura 7, tanto na sequência da NXS1_LATSE, como nas outras sequências de α -neurotoxinas. Esses resíduos assinalados serviram de referência para a comparação com a sequência da NXH1 e também com as outras toxinas indicadas. Outros estudos de mutação sítio dirigida realizados com uma outra α -neurotoxina de cadeia curta, a toxina α de *Naja*

mossambica mossambica (Nmm I) (Ackermann & Taylor, 1997; Ackermann *et al.*, 1998), e com a neurotoxina longa, α -bungarotoxina, também serviram como referência para a análise a seguir (Rosenthal *et al.*, 1999). Entretanto, as referidas toxinas não foram incluídas no alinhamento da Figura 7.

No *loop I* foram identificados apenas 3 resíduos importantes para a ligação da NXS1_LATSE ao receptor de acetilcolina (Tabela 1). O primeiro que aparece na sequência é a glutamina-7 (a numeração corresponde à NXS1_LATSE), que quando mutada para lisina provocou uma queda de 23 vezes na afinidade pelo receptor nicotínico (Trémeau *et al.*, 1995). Na NXS1_LATSE esse resíduo ocupa a posição *i* do β -turn que liga os dois segmentos de folhas β -pregueadas que compõe o *loop I*. Todas as sequências de α -neurotoxinas de cadeia curta alinhadas na Figura 7 (e a maioria das α -neurotoxinas conhecidas) possuem glutamina nessa posição (NXS1_MICNI, NXS1_HYDLA, NXS1_HIDCY, NXS3_AIPLA). Por outro lado, nem as α -neurotoxinas de cadeia longa, nem a sequência NXH1 têm essa glutamina.

A glutamina-10, que fica na posição *i* + 3 do β -turn na erabutoxina a, também é um resíduo importante na ligação ao receptor, que causou uma diminuição de afinidade de 210 vezes quando mutada para alanina (Trémeau *et al.*, 1995). Esse resíduo também não está presente na potencial toxina NXH1, assim como nas α -neurotoxinas de cadeia longa. Por outro lado, essa glutamina é bastante comum nas α -neurotoxinas de cadeia curta.

Ainda no *loop I*, temos mais um resíduo importante que também é característico das α -neurotoxinas curtas. A serina-8 não está presente na sequência NXH1. Esse resíduo, quando mutado para glicina na NXS1_LATSE causou uma diminuição de 176 vezes na afinidade pelo receptor (Pillet *et al.*, 1993), e quando mutado para treonina essa diminuição é de 780 vezes (Trémeau *et al.*, 1995).

Em suma, os 3 resíduos presentes no *loop I* da NXS1_LATSE e nas α -neurotoxinas de cadeia curta que são importantes para a ligação ao receptor nicotínico não estão presentes nas α -neurotoxinas longas e nem na sequência NXH1.

A porção da NXS1_LATSE que liga os *loops I* e *II*, entre a cisteína-17 e a cisteína-24, é formada por 6 resíduos, enquanto na NXH1 essa porção é formada por apenas 4 resíduos, característica comum a outras α -neurotoxinas (Endo & Tamiya, 1991). Esse pedaço da molécula, na NXS1_LATSE, forma uma grande volta. Em Trémeau *et al.* (1995) foram mutados os resíduos serina-18, que fica na posição *i* do β -turn, e glutamato-21, que fica na posição *i* + 3, e nenhuma das duas mutações causou mudanças significativas na afinidade de ligação da

molécula. Portanto, as diferenças nessa região parecem não afetar a afinidade da molécula pelo receptor.

No *loop II* está concentrada a maioria dos resíduos importantes para a ligação da erabutoxina ao receptor nicotínico (Trémeau *et al.*, 1995) (Tabela 2). O primeiro resíduo importante é a lisina-27, que causou uma queda de 175 vezes na afinidade ao receptor quando mutada para glutamato (Pillet *et al.*, 1993). No caso da toxina NmmlI, que também é uma α -neurotoxina de cadeia curta, a mutação da lisina-27 para alanina aumentou a constante de dissociação da toxina ao receptor nicotínico de acetilcolina de músculo de camundongo, expresso transientemente em células HEK 293, em 10 vezes (Ackermann & Taylor, 1997). Esse mesmo resíduo, quando substituído por glutamato na NmmlI, provoca um aumento marcante na constante de dissociação ao receptor (Ackermann & Taylor, 1997). Por outro lado, na α -bungarotoxina, que é uma α -neurotoxina de cadeia longa, a mutação dessa lisina para alanina provocou uma diminuição de apenas 9 vezes na afinidade pelo receptor de *Torpedo* e de 34 vezes na afinidade pelo receptor de músculo de camundongo, expresso em ovócito (Rosenthal *et al.*, 1999). Essa lisina-27 é característica das α -neurotoxinas e está presente em todas as seqüências desse grupo alinhadas na Figura 7 e também na NXH1. Vale ressaltar que a diferença do efeito observado causado pela mesma mutação desse resíduo para alanina na NmmlI e na α -bungarotoxina pode indicar diferenças na natureza da ligação ao receptor em neurotoxinas longas e curtas (Rosenthal *et al.*, 1999), apesar de esse resíduo ser importante em ambos os grupos. O trabalho de Ackermann *et al.* (1998) indica que, na NmmlI, essa lisina está interagindo com pelo menos 3 resíduos da subunidade α do receptor nicotínico de músculo de camundongo (tirosina-190, prolina-197 e aspartato-200) na interface $\alpha\delta$.

O próximo resíduo importante e característico das α -neurotoxinas é o triptofano-29, que está presente em todas as α -neurotoxinas listadas, mas não na NXH1. Quando esse triptofano foi mutado na erabutoxina para fenilalanina ocorreu uma queda de 67 vezes na afinidade pelo receptor (Pillet *et al.*, 1993).

A mutação do aspartato-31 para histidina causou um decréscimo de 46 vezes na afinidade da NXS1_LATSE ao receptor (Pillet *et al.*, 1993). Por outro lado, Rosenthal *et al.* (1994) mostrou que a mutação do aspartato-31 (Asp-30 na α -bungarotoxina) para alanina não afetou a afinidade da α -bungarotoxina pelo receptor de acetilcolina. Das seqüências de α -neurotoxinas listadas na Figura 7, todas têm aspartato na posição 31. A NXH1 não apresenta um aspartato nessa posição.

A arginina-33 foi mutada para glutamato, lisina e glicina na erabutoxina, o que provocou uma diminuição de 318, 25 (Pillet *et al.*, 1993) e 187 vezes (Trémeau *et al.*, 1995), respectivamente, na afinidade. Ackermann & Taylor (1997) mostraram que a mutação dessa arginina na Nmml para glutamato provoca um decréscimo de afinidade de 680 vezes para as subunidades $\alpha\delta$ do receptor nicotínico de acetilcolina de músculo de camundongo, e de 16000 vezes para as subunidades $\alpha\gamma$. Essa seletividade pelo sítio de ligação do receptor não foi observada por Pillet *et al.* (1993) e Trémeau *et al.* (1995) nos receptores do órgão elétrico de *Torpedo*. Essa arginina é bastante conservada na família das α -neurotoxinas, estando presente tanto nas curtas quanto nas longas. Esse resíduo foi substituído por alanina na α -bungarotoxina, o que provocou um decréscimo na afinidade pelo receptor de *Torpedo* de 90 vezes, demonstrando que essa arginina é importante também na ligação das neurotoxinas de cadeia longa aos receptores (Rosenthal *et al.*, 1999). As κ -neurotoxinas também têm essa arginina. Fiordalisi *et al.* (1994) produziu por mutagênese sítio dirigida uma κ -bungarotoxina onde essa arginina foi mutada para alanina, o que tornou a toxina incapaz de se ligar ao receptor nicotínico de gânglio ciliar de galinha até uma concentração de 10 μ M. Juntamente com a lisina-27, a arginina-33 parece interagir com a valina-188 da subunidade α do receptor, pelo menos no caso da Nmml (Ackermann *et al.*, 1998). A importância desse resíduo está de acordo com a proposta de que essa arginina possa estar mimetizando o amônio quaternário da acetilcolina (Karlsson, 1979). A NXH1 também possui uma arginina nessa posição.

Surpreendentemente, uma das mutações introduzidas na NXS1_LATSE provocou um aumento na afinidade da molécula pelo receptor nicotínico. A mutação na posição 36 de uma isoleucina para uma arginina provocou um aumento de aproximadamente 7 vezes na afinidade (Trémeau *et al.*, 1995). Arginina é um resíduo comum nessa posição nas α -neurotoxinas e está presente nas seqüências NHS1_HYDLA, NXS1_HYDCY, NXH3_AIPLA, NXL2_OPHHA e NXL1_DENJA. A seqüência NXS1_MICNI possui, como a NXS1_LATSE, uma isoleucina nessa posição, e a NDLD_ACAAN tem uma valina. Essa posição na NXH1 é preenchida por uma serina, aminoácido cujas características diferem bastante da isoleucina ou da arginina.

O último resíduo da erabutoxina a importante no *loop II* é o glutamato-38, que quando mutado para leucina causou um decréscimo na afinidade de 25 vezes (Trémeau *et al.*, 1995). Esse glutamato está presente na NXH1 e em todas as α -neurotoxinas mostradas na Figura 7, exceto a NXL2_OPHHA, que possui um aspartato nessa posição. Como ambos os aminoácidos possuem carga negativa, pode-se considerar que não há diferenças significativas entre as seqüências nessa posição.

No *loop III* da NXS1_LATSE apenas o resíduo lisina-47 foi determinado como importante na ligação ao receptor de acetilcolina (Tabela 3). A substituição dessa lisina por uma alanina provocou uma queda de afinidade de 32 vezes (Trémeau *et al.*, 1995). Esse resíduo também mostrou-se importante na ligação da Nmml ao receptor de acetilcolina (Ackermann & Taylor, 1997). Essa lisina está presente em todas as α -neurotoxinas listadas no alinhamento da Figura 7, mas não na NXH1.

Resumidamente, os resíduos que foram identificados por Pillet *et al.* (1993) e Trémeau *et al.* (1995) como sendo importantes para a ligação da NXS1_LATSE ao receptor nicotínico de acetilcolina foram: glutamina-7, serina-8, glutamina-10 (*loop I*), lisina-27, triptofano-29, aspartato-31, arginina-33, isoleucina-36, glutamato-38 (*loop II*) e lisina-47 (*loop III*). Desses 10 resíduos, a NXH1 possui apenas 3: a lisina-27, a arginina-33 e o glutamato-38. Os três resíduos do *loop I*, porém, não estão presentes nas α -neurotoxinas longas, que também se ligam em receptores nicotínicos de acetilcolina. O *loop II* da NXH1 é mais curto que das α -neurotoxinas conhecidas e talvez isso comprometa a capacidade da molécula de se ligar ao receptor de acetilcolina, uma vez que essa é a porção da molécula onde estão concentrados vários resíduos importantes.

Uma vez que a NXH1 apresenta diversas distinções com relação ao grupo das α -neurotoxinas, sua seqüência foi comparada com alguns membros dos outros grupos de toxinas de “três dígitos”. No alinhamento da Figura 7 não fica claro nenhuma região de grande similaridade entre a NXH1 e alguma outra seqüência do alinhamento. Para aprofundar essa análise, foi construída uma árvore que reflete a similaridade estrutural entre os diversos grupos funcionais. Para tanto, foram utilizados os programas do pacote chamado PHILIP. Para o cálculo das distâncias entre as seqüências foi utilizado o programa Prodist com o modelo de substituições de aminoácidos por categoria de Hall cujas categorias são: (Glu, Gln, Asp, Asn) (Lys, Arg, His) (Phe, Tyr, Trp) (Cys) (Met, Val, Leu, Ile) (Gly, Ala, Ser, Thr) (Pro). O programa FITCH foi utilizado para a construção da árvore apresentada na Figura 23. É importante destacar que, apesar de terem sido usados programas destinados a análises filogenéticas, a Figura 23 não tem uma conotação de relação evolutiva entre espécies de serpentes. Ao contrário, nota-se que nessa figura proteínas de um mesmo gênero ou espécie são agrupadas em ramos distintos. Isso porque essa figura tem como objetivo apenas mostrar que através de uma análise de similaridade estrutural das seqüências das diversas toxinas de “três dígitos” é possível distinguir os diversos grupos funcionais e com isso, inferir as possíveis funções da toxina NXH1.

A primeira informação que podemos tirar da Figura 23 é que a NXH1 foi colocada num ramo a parte, enquanto as outras seqüências foram agrupadas de acordo com a sua função. Dois grandes grupos podem ser identificados: o primeiro contendo as cardiotoxinas, a toxina sinérgica e as toxinas muscarínicas, e o segundo todos os outros grupos funcionais e a NXH1. Portanto, é bastante improvável que a NXH1 tenha uma função relacionada com o primeiro grupo.

Dentro do segundo grupo, os primeiros ramos deram origem às κ -neurotoxinas e às α -neurotoxinas de cadeia longa. A NXH1 foi incluída no grande grupo que contém as fasciculinas (inibidoras de acetilcolinesterase), as α -neurotoxinas de cadeia curta, uma neurotoxina fraca, as bloqueadoras de canal de cálcio e a mambina. O ramo das fasciculinas é bastante longo, sugerindo que esse grupo tem algumas características exclusivas que o diferem das outras seqüências. O alinhamento da Figura 7 não mostrou nenhuma região de alta similaridade entre a NXH1 e o grupo das inibidoras de acetilcolinesterase.

A Figura 23 indica também que o ramo da NXH1 é mais antigo que o ramo que inclui as α -neurotoxinas de cadeia curta, uma neurotoxina fraca, as bloqueadoras de canal de cálcio e a mambina. Porém, esse é o grupo mais próximo da NXH1 depois das fasciculinas. As semelhanças estruturais entre a NXH1 e as α -neurotoxinas já foram descritas em detalhe anteriormente.

Com relação às bloqueadoras de canal de cálcio, se voltarmos à Figura 7, notaremos que realmente em algumas regiões da molécula a NXH1 se parecem mais com esse grupo do que com as α -neurotoxinas, com destaque para a região central do *loop II* onde a NXH1 tem os resíduos IT e o grupo da calsiceptina tem IRT. No *loop I* também, a semelhança está na presença de uma dupla AS.

Kini (1998) propôs uma teoria de que os sítios funcionais de uma proteína estão muitas vezes flanqueados por prolínas e sugeriu que pequenas seqüências entre prolínas devem ser investigadas na determinação dos resíduos importantes para a função da molécula. Nesse mesmo trabalho, Kini sugeriu que a seqüência PTAMWP do *loop III* da calsiceptina (TXCA_DENPO) fosse o sítio funcional da molécula. O peptídeo APTAMWPA foi sintetizado e mostrou-se que ele realmente se liga a canais de cálcio do tipo L, bloqueando o fluxo de íons. Talvez esses não sejam os únicos resíduos da molécula de calsiceptina que estejam envolvidos na ligação ao canal, mas é importante notar que a NXH1 possui uma seqüência totalmente diferente nessa região da molécula. Esse fato pode ser um indício de que a NXH1 também não é uma

bloqueadora de canais de cálcio do tipo L. Mesmo assim, as semelhanças entre as seqüências podem indicar uma relação entre a NXH1 e as toxinas bloqueadoras de canal de cálcio.

Os resíduos funcionais da mambina, também estão flanqueados por prolinas, como citado por Kini (1998). São eles os resíduos RGD do *loop III*, que também estão ausentes na molécula da NXH1, indicando que essa toxina também não deve ser uma inibidora de agregação plaquetária.

Além de todas as diferenças entre a NXH1 e as outras toxinas de "três dígitos" conhecidas, os nossos resultados obtidos nos experimentos de ligação do veneno de *M. corallinus* aos receptores nicotínicos de acetilcolina em membranas de músculo esquelético de rato indicaram que: ou a NXH1 tem uma função fisiológica distinta e não é uma α -neurotoxina, ou o soro produzido contra a toxina recombinante His₆-NXH1 não é capaz de inibir a ligação da NXH1 nativa e de outras α -neurotoxinas aos receptores nicotínicos. Com relação à outra potencial toxina de *M. corallinus*, a NXH8, os resultados indicaram que: a NXH8 é um dos componentes do veneno responsáveis pelo bloqueio dos receptores de acetilcolina observado, ou o soro produzido contra a toxina recombinante His₆-NXH8 inibe a ligação aos receptores de outras toxinas estruturalmente relacionadas que podem estar presentes no veneno.

Concluindo, uma análise inicial da seqüência sugeriu que a NXH1 fosse uma α -neurotoxina de cadeia curta. Porém, os resultados obtidos indicaram que isso pode não ser verdadeiro. A comparação da seqüência de aminoácidos da NXH1 com a erabutoxina mostrou que a potencial toxina não tem em sua seqüência vários resíduos importantes para a ligação ao receptor nicotínico de acetilcolina. Além disso, o antisoro contra a NXH1 recombinante não impede a ligação do veneno de *M. corallinus* ao receptor, ao contrário do antisoro anti-His₆-NXH8. Por outro lado, o alinhamento e as análises de similaridade estrutural não agruparam a NXH1 em nenhum dos grupos funcionais de toxinas de "três dígitos" conhecidos. Em algumas regiões da seqüência, a NXH1 se assemelha com as toxinas bloqueadoras de canal de cálcio do tipo L. É possível que a NXH1 bloqueie algum subtipo de canal de cálcio, mas essa possibilidade ainda não foi testada. Há também a possibilidade dessa toxina pertencer a um novo grupo cuja função permanece desconhecida. É importante ressaltar que a NXH1 parece ser um componente específico para a cobra coral *M. corallinus*. De qualquer maneira, apesar dos nossos esforços, muitas dúvidas permanecem com relação à potencial toxina NXH1. Esse trabalho, porém, marca o início da utilização de uma nova abordagem que parte da biologia molecular para a caracterização bioquímica de venenos pouco estudados, como é o caso da cobra coral *Micrurus corallinus*.

Figura 1. Estrutura tridimensional e sítio funcional de uma α -neurotoxina, a erabutoxina a. Desenho adaptado de Fromen-Romano *et al.*, 1997. Em amarelo estão as pontes dissulfeto. Em vermelho e azul estão as cadeias laterais que quando mutadas causam um decréscimo de afinidade pelo receptor de mais de 100 vezes. Em laranja estão as cadeias laterais que quando mutadas causam um decréscimo de afinidade entre 10 e 100 vezes.

Figura 2. Cobra coral *Micrurus corallinus*.

Figura 3. Esquema do plasmídeo recombinante pRSETb-nxh1. Amp: gene de resistência a ampicilina. Col E1: origem de replicação bacteriana. EK: sítio de clivagem da enteroquinase. F1 ori: origem de replicação do fago F1. F Xa: sítio de clivagem do Fator Xa. His 6: cauda de histidina. P T7: promotor de T7. RBS: sítio de ligação do ribossomo.

Figura 4. Esquema do plasmídeo recombinante pCP-nxh1. Amp: gene de resistência a ampicilina. F Xa: sítio de clivagem para o Fator Xa. Ori: origem de replicação bacteriana. PT7: promotor de T7. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ZZ: gene dos domínios ZZ da proteína A de *Staphiloccocus aureus*.

Figura 5. Esquema do plasmídeo recombinante pRSETb-ZZ-nxh1. Amp: gene de resistência a ampicilina. Col E1: origem de replicação bacteriana. EK: sítio de clivagem da enteroquinase. F1 ori: origem de replicação do fago F1. F Xa: sítio de clivagem do Fator Xa. His 6: cauda de histidina. P T7: promotor de T7. RBS: sítio de ligação do ribossomo. ZZ: gene dos domínios ZZ de *Staphiloccocus aureus*.

Figura 8. Expressão e purificação da proteína recombinante ZZ-NXH1. Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue R250 com amostras de extrato de bactérias *E. coli* BL 21 (De3), transformadas com o plasmídeo indicado, amostras de lisado dessas bactérias após adsorção ou não à resina IgG Sepharose e amostra da proteína recombinante ZZ-NXH1 purificada.

Figura 9. Expressão da proteína recombinante His₆-NXH1. Gel de SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue R250 com amostras de extrato de bactérias *E. coli* BL21 (De3), transformadas com os plasmídeos indicados.

Figura 10. His₆-NXH1 purificada. Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue R250 mostrando uma amostra de proteína recombinante His₆-NXH1 purificada.

Figura 11. Conformações que uma proteína pode adquirir durante o processo de renaturação. a) forma nativa; b) estado intermediário; c) e d) agregados de proteínas; e) proteína desnaturada linear.

Figura 12. Expressão das proteínas recombinantes ZZ-NXH1 e His₆-ZZ-NXH1. Gel de SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue R250, com amostras de extrato de bactérias *E. coli* BL 21 (De3), transformadas com os plasmídeos indicados.

Figura 13. Western blot das três construções com os anticorpos anti-*M. corallinus*. Membrana de nitrocelulose para onde foram transferidos os extratos de bactérias *E. coli* BL 21 (DE3) transformadas com os três plasmídeos recombinantes, induzidas ou não com IPTG, reagida com os anticorpos purificados anti-*M. corallinus*.

Títulos dos soros:
soro do Butantan: 1/800
soro anti-NXH1: 1/102400
soro anti-NXH8: 1/102400
soro anti-mix: 1/51200

Títulos dos soros:
soro do Butantan: 1/1600
soro anti-NXH1: 1/102400
soro anti-NXH8: < 1/102400
soro anti-mix: < 1/102400

Figura 14. Resultados do ELISA para determinação dos títulos dos soros produzidos. As reações de ELISA foram feitas em placas sensibilizadas com os antígenos His₆-NXH1 e His₆-NXH8, como indicado nos gráficos.

Figura 15. Western blot das proteínas de fusão expressas com o soro anti-NXH1. Membrana de nitrocelulose para onde foram transferidos extratos de bactérias *E. coli* BL 21 (De3), transformadas com os plasmídeos indicados, induzidas ou não com IPTG, reagida contra o soro produzido contra His₆-NXH1.

Figura 16. Western blot das proteínas de fusão expressas com o soro anti-NXH8. Membrana de nitrocelulose para onde foram transferidos extratos de bactérias *E. coli* BL 21 (De3), transformadas com os plasmídeos indicados, induzidas ou não com IPTG, reagida contra o soro produzido contra His₆-NXH8.

Figura 17. Painel de venenos. Gel de SDS-PAGE de gradiente de 10 a 20% poliacrilamida, corado com Coomassie Blue R250, mostrando os padrões eletroforéticos dos venenos de diversas espécies de serpentes.

Figura 18. Western blot do painel de venenos contra o soro anti-*M. corallinus*. Membrana de nitrocelulose para onde foram transferidos os venenos de diversas serpentes, reagida contra o soro de cavalo anti-*M. corallinus* do Instituto Butantan..

Figura 19. Western blot do painel de venenos contra os anticorpos anti-*M. corallinus* purificados. Membrana de nitrocelulose para onde foram transferidos os venenos de diversas serpentes, reagida contra os anticorpos anti-*M. corallinus* purificados.

Figura 20. Western blot do painel de venenos contra o soro anti-NXH1. Membrana de nitrocelulose para onde foram transferidos os venenos de diversas serpentes, reagida contra o soro produzido anti-His₆-NXH1.

Figura 21. Ligação do veneno de *Micrurus corallinus* aos receptores nicotínicos de células musculares esqueléticas de rato. O gráfico mostra a ligação da ^{125}I - α -bungarotoxina aos receptores na presença de concentrações crescentes de veneno.

Figura 22. Efeito dos antisoros produzidos sobre a ligação do veneno de *M. corallinus* aos receptores nicotínicos de células musculares esqueléticas. Ensaio de ligação da ^{125}I - α -bungarotoxina na presença do veneno e dos soros nos receptores nicotínicos de músculo de rato.

Figura 23. Esquema mostrando as relações entre os diversos grupos de toxinas de “três dígitos” baseado na sua similaridade estrutural.

Potenciais toxinas de *Micrurus corallinus*: NXH1_MICCO: *neurotoxin homolog 1* (em vermelho), NXH8_MICCO: *neurotoxin homolog 8*. Alfa-neurotoxinas curtas: NXS1_MICNI: *short neurotoxin 1* de *M. nigrocinctus*, NXS1_HYDLA: neurotoxina a de *Hydrophis lapemoides*, NXS1_HYDCY: *hydrophitoxina a* de *H. cyanocinctus*, NXS3 AIPLA: neurotoxina c de *Aipysurus laevis*, NXS1_LATSE: *erabutoxina a* de *Laticauda semifasciata*. Alfa-neurotoxinas longas: NXL2_OPHHA: *long neurotoxin 2* de *Ophiophagus hannah*, NXL1_DENJA: *long neurotoxin 1* de *Dendroaspis jamesoni kaimosae*, NXLD_ACAAN: *acanthophina d* de *Acanthophis antarcticus*. Neurotoxina homóloga: NXLH_BUNMU: *long neurotoxin homolog* de *Bungarus multicinctus*. Bloqueadoras de canal de cálcio: TXF2_DENPO: toxina FS-2 de *Dendroaspis polylepis polylepis*, TXCA_DENPO: *calciseptina* de *D. polylepis polylepis*. Inibidoras de acetilcolinesterase: TXF7_DENAN: *fasciculina I/II* de *D. angusticeps*, TXAC_DENPO: *acetylcholinesterase toxin c* de *D. polylepis polylepis*. Cardiotoxinas: CX5_NAJMO: *citotoxina 5* de *Naja mossambica*, CX2_NAJMO: *citotoxina 2* de *N. mossambica*, CX1_HEMHA: *citotoxina 1* de *Hemachatus haemachatus*. Toxinas muscarínicas: TXM1_DENAN: *toxina muscarínica 1* de *D. angusticeps*, TXMB_DENPO: *toxina muscarínica beta* de *D. polylepis polylepis*. Inibidor de agregação plaquetária: MAMB_DENJA: *mambina* de *D. angusticeps*. Toxina sinérgica: TSYL_DENAN: *synergistic-like venom protein* de *D. angusticeps*. Neurotoxina fraca: TXW1_OPHHA: *weak toxin DE-1* de *Ophiophagus hannah*. Kappa-neurotoxinas: NXL2_BUNMU: *kappa-bungarotoxina* de *B. multicinctus*, KCOB_NAJNA: *kappa-cobrotoxina* de *N. naja*. Peptídeo encontrado na pele de sapo: XEN3_XENLA: *xenoxina 3* de *Xenopus laevis*.

Tabela 1. K_d aparente da erabutoxina a (Ea) nativa e dos mutantes com alterações no *loop I* e na região entre os *loops I* e *II*.

Os resíduos importantes para a ligação da toxina (Ea) ao receptor nicotínico estão em negrito. O símbolo (Δ) indica deleção. Tabela reconstruída a partir dos dados de Pillet *et al.*, 1993 e Trémeau *et al.*, 1995.

Proteína	K_d (nM)	K_d mutante/ K_d Ea
Ea	$0,07 \pm 0,03$	
EaF4A	$0,09 \pm 0,03$	1,2
EaN5V	$0,10 \pm 0,01$	1,4
EaH6A	$0,42 \pm 0,20$	6
EaQ7L	$1,62 \pm 0,05$	23
EaS8G	$12,3 \pm 1,00$	176
EaS8T	$54,6 \pm 20,0$	780
EaS9G	$0,62 \pm 0,10$	8,8
EaQ10A	$14,7 \pm 0,70$	210
EaP11N	$0,15 \pm 0,02$	2,2
EaQ12A	$0,09 \pm 0,05$	1,2
EaT13V	$0,21 \pm 0,10$	3
EaT14A	$0,19 \pm 0,04$	2,7
EaK15A	$0,07 \pm 0,05$	1
EaT16A	$0,14 \pm 0,02$	2
Ea Δ S18	$0,07 \pm 0,03$	1
EaE21A	$0,07 \pm 0,02$	1

Tabela 2. K_d aparente dos mutantes da erabutoxina a (Ea) com alterações no *loop II*.

Os resíduos importantes para a ligação da toxina ao receptor nicotínico estão em negrito. Tabela reconstruída a partir dos dados de Pillet *et al.*, 1993 e Trémeau *et al.*, 1995.

Proteína	K_d (nM)	K_d mutante/ K_d Ea
EaY25F	$0,26 \pm 0,10$	3,7
EaN26H	$0,07 \pm 0,02$	1
EaK27E	$12,2 \pm 1,00$	175
EaQ28A	$0,09 \pm 0,20$	1,35
EaW29H	$0,60 \pm 0,10$	8,6
EaW29F	$4,70 \pm 0,10$	67
EaS30A	$0,07 \pm 0,03$	1
EaD31H	$3,22 \pm 0,10$	46
EaD31N	$0,10 \pm 0,02$	1,5
EaF32L	$0,47 \pm 0,20$	7
EaR33E	$22,3 \pm 2,00$	318
EaR33K	$1,77 \pm 0,60$	25
EaR33Q	$13,1 \pm 1,00$	187
EaG34S	$0,50 \pm 0,20$	7
EaT35A	$0,07 \pm 0,03$	1
EaI36R	$0,01 \pm 0,001$	0,14
EaE38Q	$0,05 \pm 0,01$	0,8
EaE38K	$0,55 \pm 0,20$	7,8
EaE38L	$1,73 \pm 0,50$	25

Tabela 3. K_d aparente dos mutantes da erabutoxina a (Ea) com alterações no *loop III*.

O resíduo importante para a ligação da toxina ao receptor nicotínico está em negrito. Tabela reconstruída a partir dos dados de Pillet *et al.*, 1993 e Trémeau *et al.*, 1995.

Proteína	K_d (nM)	K_d mutante/ K_d Ea
EaP44V	$0,21 \pm 0,10$	3
EaT45A	$0,07 \pm 0,02$	1
EaV46A	$0,14 \pm 0,03$	2
EaK47A	$2,25 \pm 0,50$	32
EaP48Q	$0,07 \pm 0,02$	1
EaG49V	$0,17 \pm 0,10$	2,4
EaI50Q	$0,16 \pm 0,02$	2,3
EaK51N	$0,14 \pm 0,03$	2
EaL52A	$0,10 \pm 0,02$	1,4
EaS53A	$0,15 \pm 0,01$	2

1. Ackermann, E. J. & Taylor, P. (1997) Nonidentity of the α -neurotoxin binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor revealed by modification in α -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 α -neurotoxin-nicotinic acetylcholine receptor complex through double mutant cycles. *J. Biol. Chem.*, 273(18): 10958-10964.
3. Adams, M. E. & Oliveira, B. (1994) Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *TINS*, 17: 151-155.
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. Bioph. Acta*, 968(3): 340-345.
5. Afifiyan, 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. Aird, S. D. & Jorge da Silva, N. Jr. (1991) Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B: 287-294.
7. Aird, S. D., Jorge da Silva, N. and Griffin, P. R. (1993) Preliminary structure of a short postsynaptic neurotoxin from the venom of *Micrurus surinamensis surinamensis*. *Toxicon*, 31: 108.
8. Alape-Girón, A., Stiles, B., Schmidt, J., Girón-Cortes, M., Thelestam, M., Jörnvall, H. and 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.
9. Alape-Girón, A., Persson, B., Cederlund, E., Flores-Díaz, M., Gutiérrez, J. M., Thelestam, M., Bergman, T. & Jörnvall, H. (1999) Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *Eur. J. Biochem.* 259: 225-234.
10. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, 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 (17): 3389-3402.
11. Anônimo (1990) Acidentes ofídicos: contribuição ao estudo da morbidade. Numero 41, Ano IV, Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde, Brasília, DF.
12. Beuken, E., Vink, C. & Bruggeman, C. A. (1998) One step procedure for screening recombinant plasmids by size. *BioTechniques*, 24: 748-750.
13. Bilwes, A., Rees, B., Moras, D., Menéz, R. & Menéz, A. (1994) X-Ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.*, 239(1): 122-136.
14. Bon, C. (1991) Snake venom & pharmacopoeia. In *Snakes: a natural history*, pp194-209, Roland Bauchot (Ed), Sterling Publishing Co., Inc. New York.
15. 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* 266: 87-90.
16. Cerveñanský, 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*, pp 303-322, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.

17. 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.
18. Chang, L. S. & Lin, J. (1997) cDNA sequence analysis of a novel neurotoxin homolog from taiwan banded krait. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43 n° 2: 347-354.
19. Changeaux, J. P., Podleski, T. R. & Wofsy, L. (1967) Affinity labeling of the acetylcholine receptor. *PNAS*, 58: 2063-2070.
20. Changeaux, J. P. & Podleski, T. R. (1968) On the excitability and cooperativity of the electroplax membrane. *PNAS*, 59: 944-950.
21. Changeaux, J. P., Kasai, M. & Lee, C. Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *PNAS*, 67: 1241-1247.
22. 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.
23. Chiappinelli, V. A. (1991) κ -neurotoxins and α -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.
24. Cohen, P. & Seligmann Jr., E. B. (1968) Immunological studies of coral snake venom. *Mem. Inst. Butantan*, 33 (1): 339-347.
25. 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.
26. Crowe, J. & Henko, K. (1992) QIAexpress: The high level expression and protein purification system. Technical inform QIAGEN GmbH, Hilden, Germany.
27. 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.
28. Danse, J. M., Garnier, J. M. & Kempf, J. (1990) A cDNA sequence encoding a neurotoxin-homolog from *Bungarus multicinctus*. *Nuc. Acids Res.*, 18 (4): 1045.
29. Dewan, J. C., Grant, G. A. & Sacchettini, J. C. (1994) Crystal structure of κ -bungarotoxin at 2.3-Å resolution. *Biochemistry*, 33: 13147-13154.
30. 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 labelling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins. *Prot. Express. Purif.* 10: 293-300.
31. Dos Santos, M. C., D'Império-Lima, M. R., Furtado, G. C., Colieto, G. M. D. D., Kipnis, T. L. & Dias da Silva, W. (1989) Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon*, 27(3): 297-303.
32. Ducancel, F., Boulain, J. C., Trémeau, O. & Ménez, A. (1989) Direct expression in *E. coli* of a functionally active protein A-snake toxin fusion protein. *Prot. Engineering*, 3(2): 139-143.
33. Ducancel, F., Guignery-Frelat, G., Boulain, J. & 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: 119-123.
34. 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.
35. Dufton, M. J. & Hider, R. C. (1983) Conformational properties of the neurotoxins and cytotoxins isolated from Elapid snake venoms. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 14(2): 113-171.

36. Dufton, M. J. & Hider, R. C. (1991) The structure and pharmacology of elapid citotoxins. In: *Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, pp 259-302, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.
37. Endo, T. & Tamiya, N. (1991) Structure function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In: *Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, pp 165-221, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.
38. Falkenstein, R. J., Penã, C. & Bonino, M. J. B. J. (1996) Conformational comparison in the snake toxin family. *Int. J. Peptide Res.*, 47: 167-176.
39. Ferreira, S. H. & Vane, J. R. (1967) The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.*, 29(3): 367-377.
40. Ferreira, S. H., Bartelt, D. C. & Greene, L. J. (1970) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 9 (13): 2583-2593.
41. Fiordalisi, J. J., Fetter, 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.
42. Fiordalisi, J. J., Al-Rabee, R., Chiappinelli, V. A. & Grant, G. A. (1994) Site-directed mutagenesis of κ -bungarotoxin: implication for neuronal receptor specificity. *Biochemistry*, 33: 3872-3877.
43. 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.
44. 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 A₂ and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*, 35: 1193-1203.
45. Fromen-Romano, C.; Maillère, B.; Drevet, P.; Lajeunesse, E.; Ducancel, F.; Boulain, J. & Ménez, A. (1997) Transformation of a non-enzymatic toxin into a toxoid by genetic engineering. *Prot. Engineering*, 10 (10): 1213-1220.
46. Fuse, N., Tsuchiye, T., Nonomura, Y., Ménez, A. & Tamiya, T. (1990) Structure of short chain neurotoxin, erabutoxin c, precursor gene. *Eur. J. Biochem.*, 193: 629-633.
47. Gillet, D., Ducancel, F., Pradel, E., Léonetti, M., Ménez, A. & Boulain, J. C. (1992) Insertion of a disulfide-containing neurotoxin in *E. coli* alkaline phosphatase: the hybrid retains both biological activities. *Prot. Engineering*, 5(3): 273-278.
48. 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 Microbial*, pp 433, Rosenberg, P.(Ed), Pergamon Press, Oxford.
49. Gruber, A. & Zingales, B. (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening expression libraries. *BioTechniques*, 19 (1): 28.
50. Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
51. Hider, R. C., Karlsson, E. & Namiranian, S. (1990) Separation and purification of toxins from snake venoms. In: *Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, pp 1-34, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.
52. 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.
53. Higashi, H. G., Guidolin, R., Caricatti, C. P., Fernandes, I. Marcelino, J. R., Moraes, J. F., Yamagushi, I., Stephano, 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.
54. 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: 327-337.
 55. Ho, P. L., Soares, M. B., Maack, T., Gimenez, 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.
 56. Hodgson, D., Gasparini, S., Drevet, P., Ducancel, F., Bouet, F., Boulain, J. C., Harris, J. B. & Ménez, A. (1993) Production of recombinant *notechis11'2L*, 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.
 57. Hung, C., Wu, S. & Chiou, S. (1998) Two novel α -neurotoxin isolated from Taiwan cobra: sequence characterization and phylogenetic comparison of homologous neurotoxins. J. Prot. Chem., 17 (2): 107-114.
 58. Jimenez-Porras, J. M. (1973) Reptile toxins. In: *Biology Data Book*, Vol II, p 697, FASEB, USA.
 59. Karlin, S. & Altschul, S. F. (1990) Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. PNAS, 87: 2264-2268.
 60. Karlsson, E., Eaker, D. L. & Porath, J. (1966) Purification of a neurotoxin from the venom of *Naja nigricollis*. Biochem. Biophys. Acta, 127: 505-520.
 61. Karlsson, E. (1979) Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 52, pp 159-212, Lee, C-Y. (Ed), Springer-Verlag, Berlin.
 62. Kini, R. M. (1998) Proline brackets and identification of potencial functional sites in toxins: toxins to therapeutics. Toxicon, 36(11): 1659-1670.
 63. Kochva, E., Nakar, O. & Ovadia, M. (1983) Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. Amer. Zool., 23: 427-430.
 64. Kolbe, H. V. J., Huber, A., Cordier, P., Rasmussen, U. B., Bouchon, B., Jaquinod, M., Vlasak, R., Délot, E. & 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): 16458-16464.
 65. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
 66. 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.
 67. Lin, S., Huang, H., Wu, B. & Chang, L. (1998) Characterization and cloning of long neurotoxin homolog from *Naja naja atra*. Biochem. Mol. Biol. Int., 46 (6): 1211-1217.
 68. Low, B. W., Preston, H. S., Sato, A., Rosen, L. S., Searl, J. E., Rudko, A. D. & Richardson, J. S. (1976) Three dimensional structure of erabutoxina b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor. PNAS, 73 (9): 2991-2994.
 69. Macleod, R. J., Lembessis, P., James, S. & Bennett, 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.
 70. Markus, R. P., Zago, W. M. & Carneiro, R. C. G. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat vas deferens. J. Pharmac. Experim. Therap., 279(1): 18-22.
 71. Marques, O. A. V. (1992) História Natural de *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae). Tese de mestrado, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil.

72. Marques, O. A. V. & Sazima, I. (1997) Diet and feeding behavior of the coral snake *Micrurus corallinus*, from the Atlantic Forest of Brazil. *Herpetol. Nat. History*, 5(1), 88-93.
73. McDowell, R. S., Dennis, M. S., Louie, A., Shuster, M., Mulkerrin, M. G. & Lazarus, R. A. (1992) Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry*, 31: 4766-4772.
74. Ménez, A. (1991) Immunology of snake toxins. In: *Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, pp 35-78, Harvey, A. L. (Ed), Pergamon, New York.
75. Meunier, J. C., Olsen, R. W., Ménez, A., Fromageot, P., Boquet, P. & Changeux, J. P. (1972) Some physical properties of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* revealed by a tritiated α -toxin from *Naja nigricollis* venom. *Biochemistry*, 11 (7): 1200-1210.
76. Moussatché, H., Yates, E., Meléndez, T. & Mendoza, J. (1976) Preliminary report on the fractioning of the venom of *Micrurus nigricinctus* and the pharmacological properties of the fraction. Abstracts, 5th International Symposia on Animal, Plant and Microbial Toxins, San José, Costa Rica, p 60. Universidad de Costa Rica, San José.
77. Moussatché, H. & Meléndez, T. (1979) Some pharmacological observations with *Elapidae* and *Crotalidae* snake venom in guinea pig denervated diaphragm on specificity of cholinergic blockage by venoms. *Rev. Brasil. Biol.*, 39: 605-610.
78. Nakashima, K., Ogawa, T., Oda, N., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H & Ohno, M. (1993) Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A₂ isozymes. *PNAS*, 90: 5964-5968.
79. Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S & Ohno, M (1995) Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A₂ isozymes. *PNAS*, 92: 5605-5609.
80. Novy, R. (1999) Technical Tip: Addition of glucose to growth media to reduce background expression in λ DE3 lysogenic host strains. *Pet System Manual*, Novagen.
81. Obara, K., Fuse, N., Tsuchiye, T., Nonomura, Y., Ménez, A. & Tamiya, T (1989) Sequence analysis of cDNA encoding erabutoxin b from the sea snake *Laticauda semifasciata*. *Nucl. Acid. Res.*, 17: 10490.
82. Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Sasaki, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H & Ohno, M. (1992) Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂ isozymes. *PNAS*, 89: 8557-8561.
83. Ogawa, T., Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Sakaki, Y., Hattori, S & Ohno, M (1996) Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. *Toxicon*, 34: 1229-1236.
84. Oswald, R. E., Sutcliffe, M. J., Bamberger, M., Loring, R. H., Braswell, E. & Dobson, C. M. (1991) Solution structure of neuronal bungarotoxin determined by two-dimensional NMR spectroscopy: sequence-specific assignments, secondary structure, and dimer formation. *Biochemistry*, 30(20): 4901-4909.
85. 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.
86. Petranka, J. G., Fleenor, D. E., Sykes, K., Kaufman, R. E. & Rosse, W. F. (1992) Structure of CD59-encoding gene: Further evidence of a relationship to murine lymphocyte antigen LY-6 protein. *PNAS*, 89: 7876-7879.
87. 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.

88. 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 α -neurotoxins. *FEBS Letters*, 349: 163-168.
89. Ramsey, H. W., Snyder, G. K. & Taylor, W. J. (1971) The effect of *Micrurus f. fulvius* (coral) venom on myocardial contractility of the isolated perfused rabbit heart. *Clin. Res.*, 19: 66.
90. Ramsey, H. W., Snyder, G. K., Boruchow, I. B. & Taylor, W. J. (1972a) Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus f. fulvius*) venom in dogs. *Am. J. Phys.*, 222: 782-786.
91. Ramsey, H. W., Snyder, G. K., Kitchen, H. & Taylor, W. J. (1972b) Fractioning of coral snake venom. Preliminary studies on the separation and characterization of the properties fractions. *Toxicon*, 10: 67-72.
92. 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, p 557-581, ed. Anthony T. Tu, Marcel Dekker Inc., New York, NY.
93. 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 α -bungarotoxin. *J. Biol. Chem.*, 269: 11178-11185.
94. 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 α -bungarotoxin revealed by site-directed mutagenesis of a His-tagged recombinant α -neurotoxin. *Biochemistry*, 38: 7847-7855.
95. Rosso, J. P., Vargas-Rosso, O., Gutierrez, J. M., Rochat, H. & Bougis, P. E. (1996) Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.* 238: 231-239.
96. Sambrook, J., Frisch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
97. Sanger, N., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS*, 74: 5463-5467.
98. 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.
99. Servent, D., Winckler-Dietrich, V., Hu, H., Kessler, P., Drevet, P., Bertrand, D. & Ménéz, A. (1997) Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.*, 272 (39): 24279-24286
100. Servent, D., Mourier, G., Antil, S. & Ménéz, A. (1998) How do snake curaremimetic toxins discriminate between nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Toxic. Letters*, 102-103: 199-203.
101. Shafqat, J., Siddiq, A. R., Zaidi, Z. H. & Jörnvall, H. (1991) Extensive multiplicity of the miscellaneous type of neurotoxins from the venom of the cobra *Naja naja naja* and structural characterization of major components. *FEBS*, 284 (1): 70-72.
102. Shulder, G. D., Altschul, S. F. & Lipman, D. J. (1991) A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Prot. Struct. Func. Genet.*, 9: 180-190.
103. Silva, N. J., Aird, S. D. & Haad, J. J. S. (1993) Comparative lethality of *Micrurus* venoms. *Toxicon*, 31: 168.
104. Smith, L. A., Olson, M. A., Lafaye, P. J. & Dolly, J. O. (1995) Cloning and expression of Mamba toxins. *Toxicon*, 33: 459-474.
105. Snyder, G. K., Ramsey, H. W., Taylor, W. J. & Chiou, C. Y. (1973) Neuromuscular blockage of chick biventer cervicis nerve-muscle preparations by a fraction from coral snake venom. *Toxicon*, 11: 505-508.

106. Takeda, M., Yoshida, H. & Tamiya, N. (1974) Biosynthesis of erabutoxins in the sea snake, *Laticauda semifasciata*. *Toxicon*, 12(6): 633-641.
107. Tamiya, N. & Arai, H. (1966) Studies on sea snake venoms. Crystallization of erabutoxins a and b from *Laticauda semifasciata* venom. *Biochem. J.*, 99: 624-630.
108. Tamiya, T., Lamouroux, A., Julien, J. F., Grima, B., Mallet, J., Fromageot, P. & Ménéz, A. (1985) Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding a snake neurotoxin precursor. *Biochimie*, 67: 185-189.
109. Tamiya, T., Ohno, S., Nishimura, E., Fujimi, T. J. & Tsushiya, T. (1999) Complete nucleotide sequences of cDNAs encoding long chain α -neurotoxins from sea krait, *Laticauda semifasciata*. *Toxicon*, 37: 181-185.
110. Tan, N. H. & Ponnudurai, G. (1992) The biological properties of venoms of some american coral snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101B: 471-474.
111. Trémeau, O., Lemaire, C., Drevet, P., Pinkasfeld, S., Ducancel, F., Boulain, J. C. & Ménéz, A. Genetic engineering of snake toxins. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 9362-9369.
112. Tsernoglou, D. & Petsko, G. (1976) The crystal structure of a post-synaptic neurotoxin from sea snake at 2.2 Å resolution. *FEBS Letters*, 68 (1): 1-4.
113. Tsetlin, V. (1999) Snake venom α -neurotoxins and other 'three finger' proteins. *Eur. J. Biochem.*, 264: 281-286.
114. Vital Brazil, O. (1965) Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hospital*, 18: 183-224.
115. Vital Brazil, O., Fontana, M. D. & Pellegrini Filho, A. (1976/77) Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem. Inst. Butantan*, 40/41: 221-240.
116. Vital Brazil, O. (1980) Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Assoc. Med. Brasil.*, 26: 212-218.
117. Vital Brazil, O. & Fontana, M. D. (1983/84) Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem. Inst. Butantan*, 47/48: 13-26.
118. Vital Brazil, O. (1987) Coral snake venom: Mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 29: 119-126.
119. Weille, J. R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A. & Lazdunski, M. (1991) Calsiceptine, a peptide isolated from mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *PNAS*, 88: 2437-2440.
120. Weis, R. & McIsaac, R. J. (1971) Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. *Toxicon*, 9: 219-228.
121. Yang, C. (1965) Crystallization and properties of cobrotoxin from Formosan cobra venom. *J. Biol. Chem.*, 240 (4): 1616-1618.
122. Zinn-Justin, S., Pillet, L., Ducancel, F., Thomas, A., Smith, J. C., Bolain, J. C. & Ménéz, 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.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO