UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno
de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento**

Daniela Trinca Bertazzi

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno
de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.**

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Daniela Trinca Bertazzi

**Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani
Arantes Braga**

**Ribeirão Preto
2007**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bertazzi, Daniela Trinca

Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento. Ribeirão Preto, 2007.

155 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Braga, Eliane Candiani Arantes.

1. *Tityus serrulatus*. 2. Sistema Complemento. 3. Protease

Daniela Trinca Bertazzi

Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese ao meu marido Márcio Lazzarini, o qual tanto amo, admiro e respeito. Você é o anjo que minha mãe colocou em minha vida, Te Amo!

A meus avôs Oswaldo e Palmira, obrigada pelo carinho, afeto, atenção, generosidade e por me amar tanto. Amo vocês!

Tia Isabel obrigada pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos

A minha irmã Danila, meu cunhado Sandro, por ter dado o melhor presente do mundo, o nosso afilhado João Pedro.

E em especial a meu Pai, Ricardo, mesmo estando longe, nunca deixei de te admirar e amar. Hoje o que sou, é graças ao que me ensinou. E aprendi com você a nunca desistir.

Quase sete anos se passaram desde que você, mamãe, encontrou o caminho da luz eterna. Não houve um só dia em que não me lembrasse de você. Nestes anos sempre pedi a Deus que desse um sinal de que estava ao meu lado e muitos sinais vieram: conheci o Márcio, nos casamos, nasceu nosso primeiro sobrinho, conhecemos pessoas maravilhosas e tivemos muitas alegrias. Mas estes sinais não eram suficientes para me convencer. Até que no dia 28 de abril de 2007 recebemos um botão de rosa branca ao final do curso de noivos e, ao chegarmos à nossa casa, colocamo-lo em um jarro de água e por lá ficou por quase dois meses. Certo dia, olhamos para aquele botão que ainda permanecia fechado e pensamos em jogá-lo fora, pois a água já estava turva. Mas um fato nos deixou muito intrigado: a rosa estava brotando e com as lindas pétalas brancas como a pureza do amor! Plantamos a rosa em um vaso e depois de alguns dias havia muitas folhas nascendo ... E o botão de rosa ainda continua lindo... Mãe, sempre senti que estava ao meu lado, pois sempre soube do meu amor por você!

À Profa. Eliane Candiani Arantes Braga, minha orientadora e acima de tudo minha amiga. Nestes sete anos, recebi todo apoio, orientação e principalmente carinho. Não saberia contar quantas vezes entrei em sua sala e chorei, chorei muito e em todas estas vezes me ouviu e, sempre muito Sábia, acalmou-me e faz-me refletir.

Nestes anos, aprendi a admirá-la não só como orientadora, mas como mãe. Profa. Eliane, não dá para resumir o que sinto ou penso, mas saiba que você me fez crescer e aprender a jamais desistir. Admiro-Te muito!

À Profa. Ana Isabel de Assis Pandochi, por abrir as portas de seu laboratório, pela confiança, amizade, carinho e pela orientação durante todos estes anos. Muito obrigada! Jamais irei esquecer a primeira vez em que recebeu-me com minha mãe em sua sala.

Também não poderia deixar de agradecer-lhe a todas oportunidades que deu-me. Saiba que admiro-te demais.

Ao laboratório de Bioquímica da FCFRPP-USP, por ceder os equipamentos e reagentes necessários para realização deste trabalho.

À técnica Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini (Aninha) do laboratório de Bioquímica da FCFRPP-USP, que sempre auxiliou-me de forma criteriosa e precisa para realização deste trabalho.

Aos técnicos Ana Cristina Morseli Polegato, Ieda Maria Razaboni Prado, Alcides Silva Pereira e Dona Nadir Mazzucato pelo convívio e carinho que nunca me faltou.

À Adélia Oliveira Cintra por apoiar-me e ceder os equipamentos;

A Profa. Dra. Suefy Vilela do Laboratório de Toxinologia, da FCFRPP-USP pela permissão do uso dos equipamentos e reagentes de seu Laboratório;

Ao pessoal do Biotério Central por serem estas pessoas tão prestativas e sempre que precisei de sangue dos animais que estavam à disposição

À nossa secretária, Maria Aparecida de Almeida Segato (Cidinha), por realizar seu trabalho sempre com muita paciência, inigualável disposição e carinho.

As secretárias Amália Lúcia Basso e Maria Regina de Pila Raphaloski pelo carinho, atenção e apoio.

Aos amigos da pós-graduação, Elaine, Raquel, Andréa, pelo apoio, pela amizade e pela força nos momentos críticos;

Ao meu amigo Marcos Toline sempre que precisei de uma ajuda estava à disposição, saiba que te admiro muito, você é uma pessoa muito especial.

As minhas amigas Karla de Castro Figueiredo e Flávia Pine (Super Nany) vocês são muito especiais, sendo que cada uma sempre tem um palavra de conforto para as horas de dificuldade e de alegria. Vocês foram fundamentais nesta etapa final do trabalho. Obrigada pelo carinho, generosidade e principalmente por ter nos tornado uma família;

Ao meu grande amigo Antônio Flávio Q. Marongio pela amizade e inestimável ajuda nos momentos em que mais precisei. Sinto muita saudade das nossas longas conversas, tentando me acalmar nos momentos em que achava que não ia conseguir terminar meu doutorado;

Welligton e Rogéria Santussi mais do que amigos, nossos padrinhos de casamento. Vocês são um casal admirável e irei sentir muita falta dos nos nossos bate papos.

Aos nossos amigos Nadia e Dênis vocês foram muito importantes em nossa vida, saiba que temos muito orgulho de ser seus amigos.

Aos colegas pós-graduandos do laboratório: Camila, Patrícia Matheus, Ana Lúcia, pelo agradável convívio, troca de idéias e pela bem vinda ajuda de sempre;

Aos alunos de iniciação científica Renata, Jamily (JamyJamy), Laura, Kelly e Ricardo pela convivência gratificante e importante para vida. Aprendi muito com vocês.

Aos Profs. Drs. Antônio Caliri, Fernando Barroso e Marco Antônio e à Profa. Dra. Cristina Nonato, bem como aos seus pós-graduandos e estagiários, pelo aprazível convívio diário;

Aos demais funcionários, técnicos e servidores, que tornaram possível a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro e Profa. Dra Yara Maria Lucisano Valim que me incentivaram e incentivam a permanecer na pesquisa. Obrigada pela oportunidade de ter me aceita como aluna do programa de aperfeiçoamento ao ensino (PAE). Etapa fundamental de minha vida.

A FAPESP pelo apoio financeiro;

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento deste trabalho e que certamente foram indispensáveis.

RESUMO

BERTAZZI, D.T. **Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento.** 2007. 155f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Este trabalho relata o isolamento e caracterização bioquímica parcial de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* (VTs) com ação sobre o sistema complemento (SC). O procedimento de purificação envolveu uma cromatografia de troca iônica do VTs em CM-celulose-52, em pH 7,8 e doze frações foram obtidas, denominadas de I a XIII. A fração I, que apresenta atividade sobre o SC sérico, foi filtrada em Sephacryl S-200 e dez subfrações foram obtidas e denominadas I-1 a I-10. A subfração I-1 foi recromatografada em uma coluna de DEAE-Sepharose, em pH 7,8. Cinco subfrações foram obtidas (DE-1 a DE-5) e as subfrações DE-2, DE-3 e DE-4 incubadas com soro humano normal (SHN) induziram redução da atividade lítica da via clássica/lectina (VC/L) de forma concentração-dependente. A subfração DE-2 apresentou uma banda eletroforética única no gel de eletroforese de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), com peso molecular (PM) de aproximadamente 247.000 na ausência de β -mercaptoetanol e seis bandas na presença de β -mercaptoetanol. O procedimento de purificação dos componentes ativos da subfração I-4 envolveu basicamente uma cromatografia de troca iônica em Mono-Q, em pH 7,1. Sete subfrações (MQ-1 a MQ-7) foram obtidas neste passo cromatográfico. As proteínas MQ-5 e MQ-7 da subfração I-4 induziram redução da atividade hemolítica das VC/L e via alternativa (VA). Com o objetivo de investigar o mecanismo de ação sobre o SC, SHN foi incubado com a subfração I-4 ou seus componentes (MQ-5 e MQ-7). A imunoeletroforese mostrou a clivagem do fator B e de C3 por estas proteínas, similar ao induzido pela incubação de SHN com zimosan, o que confirma a hipótese de que MQ-5 e MQ-7 induzem a ativação do SC. A capacidade de gerar fatores quimiotáticos no soro foi investigada. Nas condições experimentais, a incubação de SHN com a subfração I-4, proteínas MQ-5 e MQ-7 induziu a migração de neutrófilos similar a induzida pela incubação de soro com zimosan, demonstrando que estas proteínas induzem clivagem de C3 e C5, gerando os fragmentos ativos de C3a e C5a. As proteínas MQ-5 e MQ-7 não foram capazes de lisar eritrócitos de coelho e carneiro. MQ-5 e MQ-7 não induziram redução da atividade hemolítica da VC/L após o aquecimento a 100°C, portanto a ação destas proteínas não é consequência da presença de produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS). As proteínas MQ-5 e MQ-7 apresentaram atividade fibrinogenolítica e caseinolítica e são metaloproteases, já que a atividade fibrinogenolítica foi inibida por EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina. Ambas proteínas apresentaram uma banda eletroforética única por SDS-PAGE, com um PM aproximado de 24.500 na ausência de β -mercaptoetanol, 33.100 na presença de β -mercaptoetanol e um ponto isoelétrico de 4,2. A sequência N-terminal (Degradação de Edman) e a sequência de peptídeos tripticos (Espectrometria de massa – ESI-MS/MS) de MQ-5 e MQ-7 foram determinadas. Ambas proteínas apresentaram sequência similar de aminoácidos. Em resumo, este trabalho mostrou que o VTs contém proteases (MQ-5 e MQ-7, metaloproteases) que são capazes de ativar o SC e podem ser importantes no processo inflamatório que ocorre em consequência do envenenamento. Além disso, estas proteínas podem ser usadas para depletar o SC em modelos experimentais de doenças em que este sistema está envolvido.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*; Sistema complemento; Proteases; Veneno de escorpião

ABSTRACT

BERTAZZI, D.T. **Isolation and biochemical characterization of components from *Tityus serrulatus* venom with action on the complement system.** 2007. 155f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

This work reports the isolation and partial biochemical characterization of components from *Tityus serrulatus* venom (TsV) with action on the complement system (CS). The purification procedure involved an ion-exchange chromatography of TsV on CM-celulose-52, at pH 7.8, twelve fractions were obtained and named I to XIII. Fraction I, showing activity on the serum CS, was filtered on Sephacryl S200 and ten subfractions were obtained and denominated I-1 to I-10. The subfraction I-1 was rechromatographed on a column of DEAE-sepharose, at pH 7.8. Five subfractions were obtained (DE-1 to DE-5) and subfractions DE-2, DE-3 and DE-4 incubated with NHS induced a concentration-dependent reduction in lytic activity of CP/L. Subfraction DE-2 showed a single electrophoretic band by SDS-PAGE, with a molecular weight (MW) of approximately 247,000 in the absence of β -mercaptoethanol and six bands in the presence of β -mercaptoethanol. The purification procedure of the active compounds of subfraction I-4 involved basically an ion-exchange chromatography on Mono-Q, at pH 7.1. Seven subfractions (MQ-1 to MQ-7) were obtained in this chromatography step. We found that proteins MQ-5 and MQ-7 of subfraction I-4 induced reduction in hemolytic activity for CP/L and AP. In order to investigate the mechanism of action on the CS, NHS was incubated with subfraction I-4 or its components (MQ-5 and MQ-7). The immunoelectrophoresis showed cleavage of factor B and C3 by these proteins, similar to that induced by incubation of NHS with zymosan, which corroborated the hypothesis that MQ-5 and MQ-7 induce activation of the CS. Their capacity to elicit serum-induced chemotaxis was then investigated. Under our assay conditions, incubation of NHS with subfraction I-4, protein MQ-5 and MQ-7 induced neutrophil migration similar to that induced by incubation of serum with zymosan, showing that the proteins induce cleavage of C3 and C5, thereby generating the active fragments C3a and C5a. Proteins MQ-5 and MQ-7 alone were unable to lyse rabbit or sheep erythrocytes. MQ-5 and MQ-7 did not induce reduction in hemolytic activity for CP/L after being heated to 100°C, therefore the action of these proteins is not a consequence of the presence of bacterial products, such as lipopolysaccharides (LPS). Proteins MQ-5 and MQ-7 showed fibrinogenolytic and caseinolytic activities and they probably are metalloproteases, since its fibrinogenolytic activity was inhibited by EDTA, EGTA and 1,10-phenantroline. Both MQ-5 and MQ-7 showed a single electrophoretic band by SDS-PAGE, with an approximate MW of 24,500 in the absence of β -mercaptoethanol, 33,100 in the presence of β -mercaptoethanol and an isoelectric point of 5.9. The N-terminal sequence (Edman Degradation) and the sequence of tryptic peptides (Mass spectrometry- ESI-MS/MS) from MQ-5 e MQ-7 were determined. The proteins MQ-5 e MQ-7 showed similar sequence of aminoacids. In summary, this work showed that the TsV venom contains proteases (MQ-5 and MQ-7, metalloproteases) which are able to activate the CS, and may therefore be important in the context of the inflammatory process occurring in consequence of envenomation. In addition these proteins may be used to deplete complement in experimental models of diseases involving participation of this system.

Keywords: Tityus serrulatus; Complement System, Proteases; Scorpion venom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Escorpião <i>Tityus serrulatus</i> Lutz e Mello Campos (1922)	3
Figura 2	- Vias de mobilização do SC	10
Figura 3	Protocolo de purificação do(s) componente(s) ativo(s) do VTs.	27
Figura 4	- Perfil cromatográfico da fração do veneno bruto solúvel (248 mg) fracionado em CM- celulose-52	45
Figura 5	- Análise das frações obtidas da cromatografia em CM-celulose-52 por PAGE sem agentes desnaturantes	47
Figura 6	- Redução da atividade lítica das vias VC/L (A) e VA (B) pela fração I em diferentes concentrações	49
Figura 7	- Redução da atividade lítica das vias VC/L (A) e VA (B) pela fração I em diferentes tempos	50
Figura 8	- Análise imunoelctroforética do fator B do SHN incubado com a fração I	51
Figura 9	- Análise imunoelctroforética do C3 do SHN incubado com a fração I	53
Figura 10	- Filtração Fração I (8 mg) em coluna Sephacryl S-200	55
Figura 11	- Análise por SDS-PAGE das sufrações obtidas da filtração da fração I em Sephacryl S200	57
Figura 12	- (A) Redução da atividade lítica das VC/L pela subfração I-1; (B, C e D) Análise imunoelctroforética do C3 do SHN incubado com a subfração I-1	58
Figura 13	- Redução da atividade lítica da VC/L pela subfração I-4 em diferentes concentrações (A) e tempos de pré-incubação (B) com SHN	60
Figura 14	- (A) Cromatografia da subfração I-1 em coluna de DEAE-Sepharose (2 x 30cm); (B e C) Análise por SDS – PAGE (10,5%) das subfrações	63
Figura 15	- Cromatografia da subfração I-4 (0,5 mg) em Coluna Mono-Q em Sistema de Cromatografia Líquida Äkta UPC	67

Figura 16	- Análise por SDS – PAGE (15%) das subfrações obtidas da Cromatografia da I-4	69
Figura 17	- Redução da atividade lítica da VC/L pela incubação de SHN com as proteínas MQ-5 e MQ-7 obtidas da cromatografia em coluna Mono-Q	70
Figura 18	- Análise imunoeletroforética do C3 do SHN incubado com a subfração I-4 e as proteínas MQ-5 e MQ-7	74
Figura 19	- Análise imunoeletroforética da atividade da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre o fator B	75
Figura 20	- Quimiotáxia de neutrófilos induzida por SHN pré – incubado com as subfração I-4 e proteínas MQ-5 e MQ-7	77
Figura 21	- (A) Análise por SDS – PAGE (15%) das subfrações obtidas da Cromatografia da I-4; (B) Curva padrão para a determinação do peso molecular da MQ-5 e MQ-7	79
Figura 22	- Determinação do pI das proteínas MQ-5 e MQ-7 através de focalização isoeletrica	80
Figura 23	- Análise por SDS-PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B)	82
Figura 24	- Análise por SDS SDS – PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B)	83
Figura 25	- Análise por SDS-PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B)	84
Figura 26	- Análise por SDS-PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B)	85
Figura 27	- Análise por SDS – PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B)	86
Figura 28	- Atividade proteolítica sobre a caseína utilizando –se diferentes concentrações das proteínas MQ-5 e MQ-7	87
Figura 29	- Alinhamento dos N-terminais das proteínas MQ-5 e MQ-7	89
Figura 30	- Perfil de espectrometria de massa ESI-MS/MS dos peptídeos trípticos da MQ-7	91

LISTA DE TABELAS

TABELA I	- Recuperação das frações obtidas da cromatografia da fração solúvel do VTs em CM- celulose –52 do VTs	46
TABELA II	- Recuperação das Subfrações obtidas da filtração em Sephacryl S-200 da Fração I	56
TABELA III	- Redução da Atividade lítica da VA pela subfração I-4 em diferentes concentrações	61
TABELA IV	- Redução da Atividade lítica da VA pela subfração I-4 em diferentes tempos de incubação	61
TABELA V	- Recuperação das Subfrações obtidas da cromatografia da subfração I-1 em DEAE-Sepharose	64
TABELA VI	Redução da Atividade lítica da VC/L pelas subfrações obtidas da cromatografia da subfração I-1 em coluna de DEAE-Sepharose	65
TABELA VII	Recuperação das Subfrações obtidas da cromatografia em coluna Mono-Q da fração I-4	68
TABELA VIII	Redução da Atividade lítica da VA após incubação do SHN com as proteínas MQ-5 e MQ-7 em diferentes concentrações	71
TABELA IX	Avaliação da atividade hemolítica direta da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre suspensão de hemácia	73
TABELA X	Seqüência N-terminal das proteínas MQ-5 e MQ-7	88
TABELA XI	Representa a seqüência de aminoácidos obtidos através dos peptídeos trípticos da MQ-7	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	- Acetonitrila
ATZ	- Anilinothiazolinona
C1 a C9	- Componentes do complemento
C3a, 5a e 4a	- Fragmentos de ativação do sistema complemento
ANOVA	- Análise de Variância
CFD/gel	- Solução de fixação de complemento em gelatina
CI	- Concentração inibitório
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCI	- Centro de Controle de Intoxicação
CM	- Carboxi-Metil
CR1, 2 e 3	- Receptores do complemento tipo 1, 2 e 3
CR₅₀	- Concentração capaz de reduzir 50% da atividade lítica
CVF	- Fator de Veneno de Cobra
Da	- Dalton
DTT	- Ditionotritol
E	- Suspensão de hemácia de coelho
EA	- Complexo hemácia/anti-hemácia de carneiro
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	- Ácido etilenoglicol bis (β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'- tetracético
EPM	- Erro Padrão da Média
GABA	- Ácido Gama – amino-butírico
IEF	- Imunoelctroforese
Ig	- Imunoglobulina
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
kDa	- kilo Dalton
LES	- Lupus eritematoso sistêmico
LPS	- Lipopolissacarídeos
MAC	- Complexo de ataque a membrana

MBL	- Lectina ligante de manose
MCP	- Proteína quimioatraente de monócito
min	- Minuto
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	- Salina tamponada com fosfato
pI	- Ponto Isoelétrico
PITC	- feniltiocinato
PMSF	- Fenilmetilsulfonilfluoreto
P.P.M	- Padrão de Peso molecular
PTH	- Feniltiohidantoína
SC	- Sistema Complemento
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TA	- Tampão da amostra
SHN	- Soro humano normal
TEA	- Trietanolamina
TEMED	- N, N, N',N',- Tetrametiletenodiamina
TFA	- Ácido de Trifluorácetico
TMA	- Trimetilamina
TNF-α	- Fator de necrose tumoral- α
Tris	- Tris-hidroximetilaminometano
VA	- Via alternativa
VC/L	- Via clássica/lectina
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
VTs	- Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>

LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviatura
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Try	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Abreviaturas de Aminoácidos	viii
 1. INTRODUÇÃO	 1
 2. OBJETIVOS	 21
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 23
3.1 Reagentes	24
3.2 Equipamentos	25
3.3 Veneno de <i>Tityus Serrulatus</i> (Vts)	26
3.4 Animais	26
3.5 Purificação Dos Componentes do VTs	26
3.5.1 Cromatografia em CM-Celulose-52 do VTs	28
3.5.2 Filtração em Sephacryl S-200 da Fração I	29
3.5.3 Diálise e Ultrafiltração	29
3.5.4 Cromatografia da Subfração I-1 em DEAE-Sepharose	29
3.5.5 Cromatografia da Sufracção I-4 em coluna Mono – Q	30
3.6 Dessalinização Em Coluna de Sephadex G-25	30
3.7 Determinação Quantitativa de Proteínas	30
3.8 Ensaios Para Caracterização Química dos Componentes Isolados	31
3.8.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) com Agentes Desnaturantes	31
3.8.2 PAGE sem Agentes Desnaturantes	31
3.8.3 Focalização Isoelétrica	32
3.8.3.1 Preparo do gel	32
3.8.3.2 Aplicação das amostras e focalização isoelétrica	32
3.8.3.3 Detecção das proteínas e determinação do gradiente de pH	33
3.8.4 Análise Seqüencial dos Resíduos de Aminoácidos da região N-Terminal	33
3.8.5 Seqüenciamento de aminoácidos dos peptídeos trípticos internos através de Espectrometria de massa	34
3.8.6 Análise da Seqüência e Alinhamento	35
3.8.7 Ensaio para Degradação de Fibrinogênio	35
3.8.8 Ensaio de Investigação de Atividade Caseinolítica	36
3.9 Atividade sobre o Sistema Complemento	36
3.9.1 Obtenção de Soro Humano Normal (SHN) como Fonte de Complemento	36
3.9.2 Preparação das Amostras	37
3.9.3 Avaliação da Atividade Lítica das Vias Clássica/Lectina (VC/L)	37

3.9.3.1 Colheita de Sangue de Carneiro e Preparo de uma Suspensão Padronizada de Hemácia	37
3.9.3.2 Preparo do Complexo Hemácia de Carneiro Anti-Hemácia (EA)	38
3.9.3.3 Ensaio Hemolítico Estático	38
3.9.4 Avaliação da Atividade Lítica da Via Alternativa (VA)	39
3.9.4.1 Colheita de Sangue de Coelhos e preparo de Suspensão Padronizada de Hemácias	39
3.9.4.2 Ensaio Hemolítico Estático	39
3.9.4.3 Ensaio Hemolítico Cinético	40
3.9.5 Análise Imunoelctroforética de C3 e Fator B	40
3.9.5.1 Preparo das Amostras	40
3.9.5.2 Imunoelctroforese Bidimensional	41
3.9.5.3 Imunoelctroforese	41
3.9.6 Quimiotaxia de Neutrófilo	42
3.9.7 Atividade Hemolítica Direta	43
3.9.8 Análise dos Dados	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Fracionamento do VTs em CM-Celulose-52	45
4.2 Efeito das frações obtidas do cromatografia em CM-celulose-52 sobre a Atividade Lítica do SC	48
4.3 Filtração da Fração I em Coluna de Sephacryl S-200	54
4.4 Cromatografia da Subfração I-1 em DEAE-Sepharose	62
4.5 Cromatografia da Subfração I-4 em Coluna Mono-Q	66
4.6 Caracterização Bioquímica da MQ-5 e MQ-7	78
4.6.1 Determinação do peso molecular através de SDS-PAGE e Determinação do Ponto isoeletrico (pI) por Focalização Isoelétrica	78
4.7 Investigação de Atividade Enzimática	81
4.7.1 Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio	81
4.7.2 Atividade proteolítica sobre a caseína	87
4.8 Determinação da Estrutura Primária Parcial da MQ-5 e MQ-7	88
4.8.1 Análise da Seqüência N-terminal	88
4.8.2 Análise da Seqüência e Alinhamento	89
4.8.3. Determinação das seqüências de aminoácidos de peptídeos internos	90
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÕES	107
7. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

Introdução

ESCORPIONISMO

Os escorpiões situam-se entre os primeiros animais que apareceram na Terra, datando seus fósseis de aproximadamente 400 milhões de anos, sendo muito semelhantes às espécies atuais.

Os escorpiões são artrópodes quelicerados (Chelicerata), incluídos entre os aracnídeos, embora haja evidências de que constituem grupo à parte. A ordem (Scorpiones) está atualmente dividida em 6 superfamílias e 20 famílias (LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 2003). Os escorpiões de maior importância médica pertencem à família Buthidae, taxonomicamente dividida em 4 subfamílias. Os escorpiões do gênero *Tityus* pertencem à subfamília Tityinae, sendo os principais causadores de acidentes graves no Brasil.

Os escorpiões mais perigosos pertencem a quatro gêneros: *Androctonus* e *Leiurus* (África do Norte e Oriente Médio), *Centruroides* (Costa Pacífica do México e zona de fronteira com os EUA) e *Tityus* (Região Sudeste e parte do Nordeste do Brasil e Ilha de Trinidad). Espécies do gênero *Buthus*, *Hottentota*, *Parabuthus* (África do Norte e do Sul, Oriente Médio e Península Arábica) e *Mesobuthus* (Índia) têm causado sérios acidentes, porém menos graves (SIMARD; WATT, 1990).

No Brasil, três espécies de escorpiões do gênero *Tityus* têm sido responsabilizadas por acidentes graves e até mesmo fatais: *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*, sendo esse último responsável pela maioria dos casos de maior gravidade (BUCARETCHI et al., 1995).

O escorpião *Tityus serrulatus* Lutz e Mello Campos (1922) (**figura 1**), mede de 6 a 7cm quando adulto e possui o tronco marrom-escuro, com patas, pedipalpos e cauda amarelos. Apresenta serrilha na face dorsal dos seguimentos distais da cauda, formada por pequenos dentes que confere o nome *serrulatus* à espécie.

Figura 1. Escorpião *Tityus serrulatus* Lutz e Mello Campos (1922).(Acervo de fotos do laboratório de Físico-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP).

O *Tityus serrulatus*, embora primitivamente habitante do cerrado e de campos abertos, tornou-se bem adaptado à vida domiciliar urbana, possivelmente em decorrência da rápida e desorganizada colonização pelo homem das regiões originalmente ocupadas pelo aracnídeo. Além disso, esses animais adaptaram-se facilmente às condições oferecidas pelas moradias humanas, com grandes possibilidades de abrigo, como lixo, entulho, pilhas de tijolos e telhas, e uma alimentação farta, com baratas e outros insetos (BUCHERL, 1979; LIKES et al., 1984). A falta de competidores e de predadores, como macacos, quatis, seriemas, sapos e rãs, também permite a rápida proliferação de escorpiões, uma vez que esses dois fatores contribuem decisivamente para o controle populacional das espécies.

Envenenamento severo por picadas de escorpião tem demonstrado um aumento alarmante em vários países tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil, México, Tunísia e Marrocos. No Brasil aproximadamente 10.000 casos humanos de picadas de escorpiões por ano são tratados em hospitais e são notificados. Grande parte ocorre em Minas Gerais e São Paulo, sendo a espécie *Tityus serrulatus* a que prevalece e é responsável pela maioria dos casos fatais, principalmente em crianças, com taxas de mortalidade tão altas quanto 1,1% (CAMPOS et al., 1980). Na região de Ribeirão Preto, no Centro de Controle de Intoxicações (CCI), implantado na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto,

Universidade de São Paulo, de 1982 a 2000 foram atendidos 9.228 pacientes, sendo a maioria dos casos (75,2 %) provocados pela espécie *Tityus serrulatus* (CUPO et al., 2003).

COMPOSIÇÃO DO VENENO DE ESCORPIÃO

Os venenos de diferentes gêneros de diversas regiões geográficas apresentam numerosas propriedades em comum. A sua composição pode variar dependendo da área habitada pelo animal, do tipo de dieta, etc.

O veneno de escorpiões pode ser obtido por estimulação elétrica do télson do animal. É uma substância mucosa, opalescente e com aspecto leitoso (DINIZ; GONÇALVES, 1956, 1960; FISHER; BOHN, 1957). É parcialmente solúvel em água e pode ser fracionado por centrifugação, obtendo-se uma fração insolúvel, não tóxica, constituída por mucoproteínas e restos de membranas. Na parte solúvel contém proteínas neurotóxicas básicas de baixo peso molecular e, em menor proporção, outros compostos como aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídios e nucleotídeos.

Diferente de venenos de aranhas e serpentes, geralmente possuem pouca quantidade de enzimas. O veneno de *Heterometrus scaber* contém fosfatase ácida, ribonuclease, hialuronidase, acetilcolinesterase e fosfolipase A (GWEE et al., 1996). A hialuronidase (PESSINI et al., 2001) e a enzima com atividade gelatinolítica (ALMEIDA et al., 2002) estão presentes no veneno de *Tityus serrulatus*. A 5-hidroxitriptamina e proteínas que inibem proteases, angiotensinase e succinato desidrogenase foram encontradas nos venenos de *Mesobuthus tamulus*, *Centruroides exilicanda* e *Heterometrus fulvipes* (GWEE et al., 1996; POSSANI et al., 1999).

As neurotoxinas são os principais componentes do veneno de escorpião conferindo-lhe defesa potente contra os predadores. Venenos de escorpião são fontes de diferentes classes de

peptídeos que afetam a função normal de canais iônicos, alterando a permeabilidade iônica de células excitáveis, através da interação específica com canais para Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Cl^- dependentes de voltagem, presentes nestas células, alterando o mecanismo de ativação dos mesmos e levando a intensa despolarização e liberação massiva de neurotransmissores (ISMAIL, 1995; GORDON et al., 1998; POSSANI et al., 1999).

ISOLAMENTO DE TOXINAS DO VENENO DE ESCORPIÕES

Após as primeiras tentativas para isolar os componentes ativos do veneno de escorpiões a partir de homogenados de telsons (WILSON, 1904; MOHAMED, 1944), vários metodologias foram empregadas.

O método geral de purificação de toxinas de escorpiões, proposto por Miranda et al. (1970), consiste em: (a) extração do veneno com água destilada, para eliminar mucoproteínas que poderiam prejudicar os passos seguintes da purificação, (b) filtração em gel de Sephadex G-50, (c) cromatografia de troca iônica (catiônica e aniônica sucessivamente). Desta forma os autores isolaram 11 neurotoxinas do veneno dos escorpiões *Androctonus australis Hector*, *Buthus occitanus tunetanus* e *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, ativas em mamíferos, insetos ou crustáceos.

Os primeiros trabalhos de purificação de toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* Lutz e Mello Campos foram realizados por Diniz e Gonçalves (1956, 1960), utilizando eletroforese em papel e gel de amido. Posteriormente, Gomez e Diniz (1966) extraíram veneno bruto com água e isolaram duas frações tóxicas, utilizando filtração em gel de Sephadex G-25, seguida de cromatografia em Carboximetil-celulose (CM-celulose). Uma destas frações apresentou-se homogênea em eletroforese em papel e foi parcialmente caracterizada por Gomez (1967), sendo denominada Tityustoxina (TsTX).

A partir destes estudos iniciais este veneno tem sido extensivamente estudado e muitas de suas toxinas isoladas e caracterizadas (COUTINHO-NETTO, 1975; TOLEDO; NEVES, 1976; POSSANI et al, 1977, 1981; SAMPAIO et al., 1983; MARTIN et al., 1985; ARANTES et al., 1989, 1994).

Toledo e Neves (1976) purificaram duas toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*, TsTX-I e TsTX-II, através de filtração em Sephadex G-25 e cromatografia em CM-Celulose-52, utilizando gradiente convexo de concentração de acetato de amônio para a eluição. A TsTX-I apresentou N-terminal lisina e peso molecular 6.932, enquanto que a TsTX-II revelou N-Terminal glicina e peso molecular de 8.500. Ambas apresentaram metionina em sua composição.

Possani et al. (1977), utilizando filtração em gel de Sephadex seguida de cromatografia em CM-celulose com tampão fosfato e recromatografia em CM-celulose com gradiente de NaCl em tampão acetato, obtiveram a TsTX- $\square$, que apresentou composição em aminoácidos semelhante à TsTX-I obtida por Toledo e Neves (1976).

Sampaio et al. (1983) isolaram e caracterizaram cinco toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*: T1VIII, T1VI, T2III, T2IV e T1IV, sendo que as T1VIII e T2IV apresentaram composição em aminoácidos semelhante à TsTX-I (TOLEDO; NEVES, 1976) ou TsTX- $\square$ (POSSANI et al., 1977). Para a purificação destas toxinas os autores utilizaram filtração em Sephadex e cromatografia em CM-celulose-52 em tampão bicarbonato de amônio, pH 8,0.

Em 1997, Sampaio et al. isolaram a TsTX-VII, que libera ácido glutâmico e ácido ácido gama-amino-butírico (GABA) de sinaptosomas de cérebro de rato, efeito não bloqueado pela tetrodotoxina, indicando que seu mecanismo de liberação não envolve canais de Na⁺. Arantes et al. (1989) desenvolveram metodologia para fracionamento do veneno de *Tityus serrulatus* na qual foi abolida a filtração em gel de Sephadex. A fração solúvel do veneno foi cromatografado em coluna de CM-celulose-52, sendo obtidas 13 frações protéicas (I-XIII),

das quais a XIII foi considerada pura. A caracterização química desta fração mostrou que a mesma é correspondente à toxina α (POSSANI et al., 1977). A partir da recromatografia da fração IX em CM-celulose-52 utilizando tampão acetato de amônio, pH 4,7 (ARANTES et al., 1989) foram obtidas as toxinas IX₃ (TsTX-II), semelhante a toxina T₁V₁ (SAMPAIO et al., 1983), e a IX₅ (TsTX-III), semelhante a toxina III-8 (POSSANI et al., 1981).

Arantes et al. (1994), isolaram e caracterizaram a TsTx-V, uma α -neurotoxina de peso molecular de 7230,0, capaz de retardar a inativação de canais para Na⁺ sensíveis a voltagem.

EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO ENVENENAMENTO ESCORPIÔNICO

O efeito tóxico do veneno varia em função de alguns fatores, como a espécie do escorpião, a dose inoculada, a capacidade e o estado fisiológico das glândulas do veneno, o peso, a idade e o estado de saúde da vítima, sua sensibilidade específica e o local da picada.

Com base nas manifestações clínicas, os acidentes podem ser classificados em leves, moderados e graves. Os leves apresentam somente sintomatologia local, representada por dor e, eventualmente, parestesia. Os moderados apresentam além da dor local, sialorréia e sintomas e sinais cardio-respiratórios. Os quadros graves diferenciam-se dos moderados por apresentarem uma ou mais manifestações do tipo bradicardia sinusal, bloqueio atrioventricular total, insuficiência cardíaca congestiva, choque, edema pulmonar agudo e convulsões (AMARAL; REZENDE, 1990).

Todos estes efeitos tenham sido explicados pela liberação de neurotransmissores colinérgicos (DINIZ; TORRES, 1968; VITAL BRAZIL et al., 1973) e adrenérgicos (CORRADO et al., 1968; EINHORN; HAMILTON, 1977), associada à estimulação das supra-renais, subsequente liberação maciça de adrenalina (CELESTE HENRIQUES et al.,

1968; MOSS et al., 1973) e ações reflexas (FREIRE-MAIA et al., 1973). Neste quadro complexo do envenenamento escorpiónico ainda é importante considerar possíveis interações com o sistema complemento, que é um mediador importante do processo inflamatório.

SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento (SC) é altamente sofisticado e exerce um papel importante na defesa do organismo, como parte do sistema imune inato ou adaptativo (WALPORT, 2001a, b). Este sistema é composto por um conjunto de proteínas séricas e de membrana, ligadas funcionalmente, que podem ser mobilizadas por diferentes mecanismos e interagem umas com as outras de maneira altamente regulada e específica. Inclui também múltiplos reguladores e receptores para os produtos ou fragmentos decorrentes de sua ativação. Este sistema é ativado por três vias diferentes, cujos componentes específicos são:

- Via Clássica: Complexo C1 composto por C1q e duas unidades C1r e duas unidades de C1s; e os componentes C4 e C2;
- Via Alternativa: Fator D e fator B;
- Via Lectina: Lectina ligante de manose (MBL), MASP-1, MASP-2, MASP-3, Map19, C4 e C2
- Além do C3, componente central das três vias de ativação, os componentes do complexo de ataque à membrana (MAC) C5, C6, C7, C8 e C9, são comuns a estas vias.

Em adição, o SC é constituído por múltiplos reguladores e receptores. Proteínas de fase fluida envolvidas na regulação são: C1-Inh (inibidor de C1); C4bp (proteína ligante de C4); fator H; fator I; inativador de anafilatoxina; properdina; clusterina; proteína S (vitronectina) (AUSTYN; WOOD, 1994). Já o receptor para C1q; CR1 (receptor do complemento tipo 1); CR2 (receptor do complemento tipo 2); CR3 (receptor do complemento

tipo 3); CR4 (receptor do complemento tipo 4); receptor para C3a e C4; receptor para C5a; o SC possui reguladores de membrana: DAF (fator de aceleração do decaimento); MCP (proteína cofator de membrana);, HRF (fator de restrição homóloga) e CD59 (protectina) estão envolvidos na regulação dos componentes ativados do SC e seus fragmentos (AUSTYN; WOOD, 1994; MORGAN et al., 2005).

Componentes do SC são moléculas de fase aguda que são sintetizadas rapidamente durante uma lesão ou infecção. A maioria das proteínas do complemento no plasma são sintetizadas no fígado pelos hepatócitos e por fagócitos mononucleares. A síntese extra hepática dos componentes do complemento inclui células endoteliais, células epiteliais (rim, pulmão e intestino), fibroblastos, células sinoviais, adipócitos, células cerebrais (astrócitos, microglia e neurônios), células mesenquimais glomerulares dos rins, queratinócitos e macrófagos (ANDREWS et al., 1995a; MORGAN; GASGUE, 1997). As células adiposas, por exemplo, têm sido descritas como o local de síntese mais importante do fator D (adipsina) da via alternativa (ROSEN et al., 1989). Choy (1992), demonstrou que o tecido adiposo produz, além da adipsina, dois outros componentes da via alternativa, C3 e fator B.

A maioria das proteínas do complemento encontra-se de forma inativa ou como pró-enzimas. A ativação deste sistema depende de fatores que alteram a homeostasia e ocorre de maneira sequencial, por um mecanismo em cascata, por três vias: Via Clássica, Via da Lectina e Via Alternativa (**figura 2**).

As vias de ativação do complemento levam à geração das convertases de C3 e, posteriormente, de C5, iniciando a via terminal e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Este complexo, inserido na membrana alvo, leva à ruptura e à lise celular.

O SC é regulado por diversas proteínas solúveis e associadas à membrana celular, que inibem a ativação em múltiplas etapas. Estes mecanismos regulatórios limitam ou impedem a ativação do complemento em condições fisiológicas.

Figura 2. Vias de mobilização do SC. (Adaptado de JANEWAY et al., 2002)

A deficiência de componentes das três vias de ativação do complemento está associada a doenças distintas. Deficiências da via clássica (C1, C4, C2) estão associadas com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) (PICKERING et al., 2000). Deficiência do C3, o componente central da três vias de ativação complemento, está associada com LES, infecções pirogênicas e glomerulonefrite. Pacientes com deficiência do fator D e properdina, componentes da via alternativa, demonstraram susceptibilidade aumentada a infecções por espécies de *Neisseria* (SJOHOLM, 2002). A deficiência da MBL está associada com infecções por bactérias, fungos e vírus tanto em criança quanto em adultos (EISEN; MINCHINTON, 2003). Deficiência dos componentes terminais comuns das três vias pode levar a uma lise deficiente no microorganismo pelo complexo C5b-9, particularmente de espécies de *Neisseria* (JACK et al., 2001). Deficiência de proteínas regulatórias do complemento está associada com angioedema, neste caso inibidor de C1 (JANEWAY et al., 2003) e com LES, glomerulonefrite e infecções bacterianas por deficiência do fator I e H (SJOHOLM, 2002).

Uma vez que uma ativação “inapropriada” do SC ocorre em um grande número de doenças inflamatórias, isquêmicas, além das doenças auto-imunes e por imunocomplexos, podendo ocorrer também como resultado de intervenções terapêuticas (ativação iatrogênica), é evidente a necessidade de agentes terapêuticos efetivos e seguros para prevenir ou reduzir essa ativação *in vivo* (KIRSCHFINK, 1997; SAHU; LAMBRIS, 2000; MORGAN; HARRIS, 2003). Assim a identificação de compostos com ação sobre o SC é bastante relevante, visto que estes compostos poderão ter aplicações clínicas ou mesmo serem usados como ferramentas para o estudo de processos que ocorrem em doenças envolvendo a ativação da cascata do complemento.

Via Clássica

A via clássica é iniciada principalmente pela ligação do componente C1 às imunoglobulinas IgM e IgG complexadas com antígenos. (SCHUMAKER et al., 1987). C1 é composto por uma unidade de C1q, duas unidades de C1r e duas unidades de C1s, associadas de forma não covalente, através de interação com íons Ca^{2+} (KLEIN, 1990). C1q se liga à porção Fc do anticorpo e sofre uma alteração conformacional que expõe o sítio catalítico de C1r. C1r sofre autocatalise e se torna capaz de clivar C1s, que uma vez ativado, pode clivar C4, cujo fragmento maior (C4b) imediatamente se liga à superfície ativadora. A seguir, C2 também é clivado pelo C1s em C2a e C2b e forma-se na superfície ativadora a C3 convertase da via clássica, C4b2b (JANEWAY et al., 2003; KLEIN, 1990; PAUL, 1999; REID; PORTER, 1981).

Via Alternativa

Esta via de ativação do complemento foi descoberta como uma segunda via, ou via “alternativa”, para a ativação do complemento após a via clássica ter sido definida (JANEWAY et al., 2003). A via alternativa é ativada sem a presença de anticorpos, de forma contínua e em níveis basais pela clivagem espontânea de C3 (FEARON, 1981; THURMAN, HOLERS, 2006). A molécula $\text{C3(H}_2\text{O)}$, gerada pela hidrólise espontânea de uma ligação tioéster de C3, liga-se ao fator B, tornando-o susceptível à ação proteolítica do Fator D, que circula como enzima ativa no plasma. O Fator B é clivado em Ba e Bb, e o fragmento Bb permanece ligado ao $\text{C3(H}_2\text{O)}$ formando então a convertase de fase fluída $\text{C3(H}_2\text{O)Bb}$, a qual cliva C3 gerando C3a e C3b (fragmento maior). O C3b formado pode se fixar na superfície ativadora, e ligar-se ao fator B, o qual sofre ação proteolítica do Fator D resultando em Ba e Bb. Assim, forma-se a C3 convertase de membrana (C3bBb) da via alternativa clivando C3 em C3a e C3b (FEARON, 1981; REID, POSTER, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006).

As convertases formadas pela via alternativa além da ativação também podem ser formadas em decorrência da geração de C3b pelas vias clássica e lectina. Este processo corresponde a um mecanismo denominado “alça de amplificação” da ativação do SC (FEARON, 1981; REID, POSTER, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006).

Via Lectina

A ativação do complemento na superfície de patógenos pode ser iniciada independentemente de anticorpos pela ligação da MBL em estruturas de carboidratos presentes nas superfícies de micro-organismos incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas (FUJITA et al., 2004).

A MBL circula como complexo macromolecular em associação com serino-proteases zimogênicas: MASP –1 (MATSUSHITA; FUJITA, 1992), MASP-2 (THIEL et al., 1997), MASP-3 (DAHL et al., 2001) e uma pequena proteína não enzimática MAp19 (STOVER et al., 1999). A ligação em microorganismos presumivelmente induz alterações conformacionais na MBL oligomérica, que são transmitidas para as MASPs. Isto resulta na geração da forma ativa da MASP-2, capaz de gerar a C3 convertase através da clivagem de C4 e C2 de maneira similar ao que ocorre na ativação da via clássica (THIEL et al., 1997; VORUP-JENSEN et al., 2000; MATSUSHITA et al., 2000). Alternativamente, MASP-1 é capaz de clivar diretamente C3 (DAHL et al., 2001; MATSUSHITA; FUJITA, 1995; ROSSI et al., 2001), resultando na ativação da via alternativa (MATSUSHITA; FUJITA, 1995). A função de MAp19 e MASP-3 ainda não foi determinada.

Via terminal

As três vias de ativação convergem para a formação das C3 convertases. Os eventos seguintes se referem à ativação da Via Terminal e formação do complexo de ataque à

membrana (MAC) que pode resultar na formação de poros na membrana celular (COLE; MORGAN, 2003).

As C3 convertases clivam moléculas de C3, e C3b se fixa á superfície ativadora. O C3b ligado à membrana, em associação com as C3 convertases, formam as C5 convertases, C3bBb3b da via alternativa e C4b2b3b das vias clássica e lectina. As C5 convertases clivam C5 em C5a e C5b. O fragmento maior, C5b, é o fragmento iniciador do MAC ligando-se ao C6. Em seguida ocorre a ligação de C7 e o complexo C5b678 se fixa na bicamada lipídica da membrana celular. Com a ligação de C8 o complexo se insere na membrana, ocorrendo em seguida à ligação de vários monômeros de C9 ao complexo e sua polimerização formando poros de aproximadamente 10 nm de diâmetro na membrana e causando a lise osmótica da célula (WARLEY; LEMERCIER, 1993).

FUNÇÕES BIOLÓGICAS DECORRENTES DA ATIVAÇÃO DO SC

A formação de poros que desorganizam a estrutura da membrana celular do patógeno levando à lise é uma função importante do SC, mas não a única. A participação na fagocitose; no processamento de imunocomplexos; no processo inflamatório; na resposta imune, e na homeostase são atividades importantes decorrente da ativação do SC.

A ativação da via clássica, alternativa ou lectina, leva a geração de C3b e iC3b que se ligam covalentemente à superfície das células. C3b e iC3b funcionam como opsoninas, em virtude de ligarem-se especialmente a receptores de células de neutrófilos e macrófagos, levando à aderência do antígeno às células fagocíticas. Os receptores do complemento nos leucócitos funcionam não apenas ligando partículas opsonizadoras, mas também traduzindo sinais que estimulam a capacidade fagocitária dos leucócitos (FRANK; FRIES, 1991).

Os imunocomplexos formam-se continuamente, mas os níveis circulantes podem aumentar significativamente em processos infecciosos. As toxinas e restos de microorganismos mortos formam complexos com os anticorpos e podem ser removidos em decorrência da ativação da via clássica. Ocorre deposição de C3b no imunocomplexo e estes são ligados ao CR1, presente na membrana de hemácias. As hemácias transportam o imunocomplexo até o fígado e baço, onde são desligados da hemácia e ligados em receptores para a porção Fc do anticorpo e receptores CR1 presentes em macrófagos, sendo então fagocitados. Além da remoção dos imunocomplexos, a ativação do complemento pode solubilizar estes imunocomplexos (ICs) ou prevenir a sua agregação e precipitação no plasma e nos tecidos. Isto se deve possivelmente ao fato da deposição de C3b impedir ligações de moléculas de anticorpo a epítomos do antígeno (JANEWAY et al., 2003; KLEIN, 1990; PAUL, 1999).

Receptores para fragmentos de componentes ativados do complemento estão presentes em células do sistema imune (ROSS; MEDOF, 1986) e através da interação com estes receptores o complemento participa na produção de anticorpos (OCHS et al., 1983; ERDEI et al., 1991; LUXEMBOURG; COOPER, 1994) e na resposta imune em geral (FELDBUSH et al., 1984; ERDEI et al., 1991).

Participação do SC no Processo Inflamatório

A ativação do SC é um potente mecanismo para desencadear e amplificar a inflamação. Produtos de ativação de seus componentes estimulam a quimiotaxia e ativação de leucócitos. Os fragmentos C3a, C4a e C5a são chamados anafilatoxinas pela sua capacidade de promover no organismo uma reação similar ao choque anafilático mediado por IgE (FEARON, 1981; JANEWAY et al., 2003). As anafilatoxinas se ligam a receptores de membrana de células envolvidas com a resposta inflamatória. C3a, C5a e, em menor

proporção, C4a promovem a desgranulação e liberação de histamina por mastócitos. O aumento da permeabilidade vascular pode induzir ou aumentar a deposição de imunocomplexos, promover o efluxo de proteínas do plasma, tais como imunoglobulinas e proteínas do SC e conseqüentemente aumentar a resposta inflamatória.

C3a induz contração do músculo do liso e tem receptores em mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos .

C5a é um potente quimiotático para neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos/macrófagos e células microgliais (EMBER et al., 1998); causa liberação de histamina e resposta espasmódica na musculatura lisa (HUGLI et al., 1988). É também quimiotático para macrófagos e causa aumento da adesão e agregação de neutrófilos. Estimula drasticamente o metabolismo oxidativo de neutrófilos, a produção de espécies reativas tóxicas de oxigênio e a liberação de enzimas lisossomais de células fagocíticas (GOLDSTEIN, 1988). É capaz de induzir a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6, e IL-8 (OKUSAWA et al., 1987; SCHOLZ et al., 1990; EMBER et al., 1994).

INTERAÇÃO DE VENENOS ANIMAIS COM SC

A pesquisa de substâncias de origem animal com atividade sobre o complemento é bem documentada na literatura e retrocede aos primórdios dos estudos deste sistema, onde ensaios com venenos levaram a importantes descobertas (ALPER, 1979).

Os primeiros estudos realizados com veneno de cobra, pertencentes ao gênero *Naja*, forneceram algumas das evidências iniciais da complexidade do SC e, em adição, foram importantes na identificação de componentes e na elucidação dos mecanismos envolvidos na mobilização da via alternativa. Desses venenos foi isolado um componente denominado fator de veneno de cobra (CVF), e a seguir caracterizado como uma glicoproteína de 149 kDa

(MÜLLER-EBERHARD; FJELLSTROM, 1971). CVF forma um complexo com o fator B, CVFB, e neste complexo o B é clivado pelo fator D (GOTZE; MÜLLER - EBERHARD, 1971) formando CVFBb, funcionalmente análoga às C3 convertases, com propriedade de clivar C3. Entretanto, o complexo CVFBb (220 kDa) é resistente à inativação por ação dos fatores reguladores do complemento e em decorrência desta resistência permanece no plasma e induz ativação e decorrente depleção do complemento (LACHMANN; HALBWACHS, 1975).

O CVF tem sido isolado e caracterizado de venenos de várias espécies de cobras incluindo *Naja kaouthia* (*Naja naja siamensis*) (EGGERTSEN et al., 1981), *Naja naja* (MÜLLER - EBERHARD; FJELLSTROM, 1971; SHARMA et al., 2001), *Naja atra* (TAKAHASHI; HAYASHI, 1982), e *Naja haje* (VON-ZABERN et al., 1982). Utilizando anti-soro para CVF ou C3, Tambourgi et al. (1994), demonstraram que o veneno de *Naja melanoleuca* contém uma proteína similar ao CVF.

Recentemente, Osipov et al. (2005), isolaram e caracterizaram do veneno de *Naja melanoleuca* duas formas do fator de veneno de cobra, o CVFm1 (142,6 kDa) e CVFm2 (143,1 kDa). As análises *in vivo* demonstraram que as duas formas de CVFm depletaram C3 do SC. Estudos cinéticos utilizando ensaio hemolítico demonstraram que a depleção do complemento pelo CVFm1 é mais rápida que pelo CVFm2.

Outro trabalho realizado recentemente isolou uma glicoproteína denominada Oxiagin com massa molecular de 49,8 kDa do veneno *Naja oxiana* da Ásia Central, a qual inibe a formação da C3 convertase. A oxiagin se liga ao complexo hemácia de carneiro anti-hemácia e inibe a lise do eritrócito e a formação da C3 convertase, pois previne a interação de C2 como C4b (SHOIBONOV et al., 2005).

Existe uma variedade de proteínas isoladas de veneno da família Crotalidae com influência sobre o SC, sendo que muitas possuem atividade proteolítica. No veneno de

Crotalus atrox foram encontradas quatro proteases capazes de gerar anafilatoxinas C3a e C5a a partir de C3 e C5, respectivamente (MAN; MINTA, 1977). Uma proteína “C3-like” que depleda a via alternativa também foi purificada do mesmo veneno (MINTA; MAN, 1980).

Yamamoto et al. (2002) demonstraram que o veneno da serpente *Trimeresurus flavoviridis* apresenta uma alta capacidade de ativar a via alternativa do complemento sérico humano. Posteriormente foi observado que este veneno apresentava uma proteína cuja sequência de aminoácidos é semelhante à de uma serino-protease com atividade anticoagulante, a flavoxobin, purificada do mesmo veneno. A flavoxobin cliva a molécula de C3 em dois fragmentos, levando à ativação da cascata do complemento.

A participação do complemento na lise de hemácia humana induzida pelo veneno da aranha *Loxosceles* tem sido muito estudado nestes últimos anos. Em 1979, Futrell et al. descreveram um modelo *in vitro* para o estudo da hemólise associada com o veneno de *Loxosceles reclusa*. Demonstraram que eritrócitos humanos, incubados com veneno e subsequentemente lavados, eram lisados por soro humano fresco, grupo sanguíneo compatível, mas não pelo mesmo soro inativado por aquecimento. Eritrócitos não tratados com veneno não eram lisados.

Investigações mais recentes (TAMBOURGI et al., 1995) analisaram o papel do SC na lise de eritrócitos induzida pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* e pela proteína purificada de 35 kDa, *in vitro*. Demonstraram que a incorporação desta proteína na superfície do eritrócito, o torna susceptível à lise. Estes autores sugerem que o complemento medeia a lise de eritrócitos humanos e, por extensão, de outros tipos celulares capazes de incorporar o fator lítico do veneno da *Loxosceles intermedia* na superfície celular. Posteriormente, Tambourgi et al. (2000), estudaram o mecanismo da hemólise induzida pelo SC no envenenamento por *Loxosceles*. Toxinas purificadas tornam eritrócitos humanos suscetíveis à lise pelo complemento. As toxinas causam a clivagem de glicoforinas da superfície dos

eritrócitos, facilitando a ativação do complemento e a hemólise. Os autores propoem que a atividade de esfingomielinase das toxinas induz a ativação de metaloproteínases endógenas, as quais clivam as glicoforinas.

Poucos estudos tem sido realizado sobre a ação de venenos de sapo sobre o complemento. Assis et al. (1985), demonstraram atividade anticomplementar de uma fração isolada do veneno de sapo *Bufo marinus paracnemis*. Esta fração quando incubada com soro humano reduzia a atividade lítica das vias clássica e alternativa.

Interação do veneno de escorpião com o SC

A atividade hemolítica do veneno de vários escorpiões é conhecida há muito tempo. Esta atividade é fraca no veneno de *Hadogenes* (GRASSET et al., 1945), no entanto é muito evidente no veneno de *Heterometrus scaber* (OOMEN; KURUP, 1964) e de *Scorpio maurus* (ZLOTKIN et al., 1972a, b). Corrêa et al. (1997) verificaram alterações histopatológicas ao injetar o veneno de *Tityus serrulatus* e a toxina TsTX-I em ratos. Os vasos tornaram-se distendidos e congestionados com material hemolisado.

Nos primeiros estudos realizados com veneno de escorpião, não foi evidenciada ação significativa do veneno dos *Leiurus quinqueiratus* e *Tityus serrulatus* sobre o SC (GEBEL et al., 1979). Entretanto, estudos realizados em nosso laboratório (BERTAZZI et al., 2003), demonstraram que *in vivo* o veneno de *Tityus serrulatus* e a toxina TsTX-I aumentou a atividade lítica das vias clássica e alternativa. *In vitro*, este veneno determina redução significativa da atividade lítica do SC do soro humano determinando conversão eletroforética de C3 e Fator B similar à observada pelo zimosan, um ativador da via alternativa. Em adição, incubação de soro humano com este veneno induz quimiotaxia de neutrófilos, efeito que é abolido pelo aquecimento prévio do soro, demonstrando a participação do SC nesta atividade (BERTAZZI, et al., 2005).

Estas e outras observações referem a participação do SC no processo inflamatório e quadro de edema decorrentes do envenenamento escorpiônico.

Pessini et al. (2003), verificaram leucocitose com neutrofilia no sangue e na cavidade peritoneal de camundongos injetados com o veneno de *Tityus serrulatus* e com a TsTX-I, bem como redução de proteína sérica total e albumina, e aumento de proteína C-reativa, IL-6 e IL-1 α , alterações estas que caracterizam uma reação de fase aguda. Os edemas pulmonar e cerebral são complicações freqüentes em vítimas, principalmente crianças, e podem muitas vezes levar a óbito. Estes edemas podem ser explicados, pelo menos em parte, pela liberação de substâncias vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular (AMARAL; REZENDE, 1990, 1997). Portanto, o SC pode ter um papel relevante amplificando ou desencadeando o processo inflamatório, intensificando o edema pulmonar e cerebral, através da geração de anafilatoxinas, causando o aumento da permeabilidade vascular e estimulando a quimiotaxia.

O estudo do envolvimento do SC no envenenamento por *Tityus serrulatus*, pode levar a um maior entendimento do processo inflamatório desencadeado e ao desenvolvimento de uma estratégia terapêutica mais efetiva. Além disso, toxinas presentes no veneno com ação sobre o SC, depois de isoladas e caracterizadas, poderão ser importantes ferramentas para o estudo do SC e de processos patológicos nos quais o mesmo esteja envolvido.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica parcial de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o SC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as frações (I a XIII) através da cromatografia em CM-celulose-52 do veneno de *T. serrulatus*;
- Isolar o(s) componente(s) com atividade sobre o SC do soro humano;
- Determinar o peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas isoladas,
- Determinar parte da estrutura primária através do sequenciamento N-Terminal e espectrometria de massa;
- Verificar se o(s) componente(s) ativo(s) apresentam atividade proteolítica, utilizando – se como substrato: fibrinogênio e caseína;
- Avaliar os efeitos do(s) componente(s) ativo(s) sobre a atividade lítica do complemento sérico humano *in vitro*, através de ensaio hemolítico estático para as vias clássica/lectina e alternativa;
- Verificar a ação do(s) componente(s) ativo(s) sobre os componentes C3 (componente central das vias de ativação) e fator B (via alternativa) do SC, através de análise imunoquímica;
- Avaliar o efeito do(s) componente(s) ativo(s) sobre a atividade quimiotática do soro para neutrófilos humanos.

Material e Métodos

3.1 REAGENTES

- Ácido acético glacial – Merck
- Acrilamida - Sigma Chem. Co.
- Agarose - Sigma Chem. Co.
- Anfólito de 3,5 a 10,0 –Amersham Biosciences
- Azul de Bromofenol - Pharmacia Biotech
- β -mercaptoetanol - Amersham Biosciences
- Bicarbonato de Amônio - Merck
- Bis-Acrilamida - Sigma Chem. Co.
- Cloreto de Cálcio - Merck
- Coomassie Brilliant Blue G-250 - Sigma Chem. Co.
- Cloreto de Sódio – J.T. Baker
- EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético) - Sigma Chem. Co.
- EGTA (Ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético)- Sigma Chem. Co.
- Persulfato de amônio – Pharmacia Biotech
- Reagente de Bradford – BioAgency
- SDS (dodecil sulfato de sódio) - Sigma Chem. Co.
- Sulfato de Magnésio - Synth
- TEA (trietanolamida) - Merck
- Triton X-100 – Merck

Os demais reagentes não mencionados na lista foram todos de grau analítico.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica Digital - Ohaus
- Centrífuga Eppendorf 5415R
- Centrífuga Sorvall Biofuge primo R
- Coletor de Frações *SUPERFRAC* conectado a duas Unidades Controladoras (Ótica e Ultravioleta UV-1) e Registrador *REC 102 Pharmacia Biotech* -
- Condutivímetro *CD-20 Digimed*
- Cuba de acrílico para eletroforese - Sigma-Aldrich
- Espectrofotômetro computadorizado U-2001- Hitachi
- Freezer -70°C - Forma Scientific
- Fonte de corrente eletroforética EPS 3500XL- Pharmacia Biotech
- Liofilizador de mesa Flexy-Dry – FTS Systems
- pHmetro - Incibrás.
- Sistema de cromatografia Líquida Äkta™ UPC equipado com 2 bombas, detector ultravioleta (UV), detector de condutividade, coletor de frações, acoplados a um microcomputador- Amersham Biosciences
- Sistema de focalização isoeletrica equipado com MultiTemp II e Multphor II– Pharmacia Biotech
- Sistema de Ultrapurificação de Água Milli-Q® - Millipore Corporation, USA

3.3 VENENO DE *Tityus serrulatus* (VTs)

O veneno do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* Lutz e Mello Campos (1922), extraído por estímulo elétrico do tálson do animal, liofilizado e armazenado a – 20°C, foi comprada da *Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA* - Belo Horizonte, MG, Brasil.

3.4 ANIMAIS

Foram utilizadas coelhas albinas New Zealand, adultas jovens com aproximadamente 3 kg de peso que foram sangradas periodicamente para obtenção de hemácias utilizadas no estudo da via alternativa.

Carneiros merinos adultos machos foram sangrados periodicamente para obtenção das hemácias utilizadas no estudo da via clássica/lectina.

Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP.

O projeto foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP (protocolo nº 03.1.1025.53.2).

3.5 PURIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO VTs

A figura 3 resume o protocolo estabelecido para a purificação do(s) componente(s) ativo(s) do VTs. As metodologias empregadas estão detalhadas nos itens 3.5.1 a 3.5.5.

Figura 3. Protocolo de purificação do(s) componente(s) ativo(s) do VTs. As estrelas em laranja e verde representam as amostras que apresentaram atividade sobre SC (metodologia apresentada no item 3.9). Obs. A Coluna Mono-Q (troca-aniônica) é composta por uma matriz hidrofílica de poliestireno/divinil benzeno ligado a amônio quaternário (Amersham Biosciences). Coluna DEAE-sepharose de troca – aniônica; DEAE-sepharose composta por Dietilaminoetil.

3.5.1 Cromatografia em CM-Celulose-52 do VTs

O VTs foi extraído e cromatografado segundo modificações do método descrito por Arantes et al. (1989).

Amostra de 248 mg do VTs foi suspensa em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L, pH 7,8 a 4 °C. A suspensão foi centrifugada a 12.100 x g, por 10 min a 4 °C, numa centrífuga Eppendorf 5415R. O sobrenadante foi retirado e o resíduo novamente suspenso em 1,0 mL de tampão gelado e centrifugado. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos, a mistura deixada em repouso por 24 horas a 4 °C e novamente centrifugada a 12.100 x g por 10 min. A seguir, foi separado o sobrenadante de 3,7 mL para ser aplicado à coluna, sendo que 20 µL do mesmo foram diluídos em 980 µL de tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L para a leitura da absorvância em 280 nm.

Uma coluna de 2,5 cm x 63,0 cm foi preparada com CM-celulose-52 microgranular (Whatman) seguido-se as instruções do fabricante. Após preparo a resina foi equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L, pH 7,8, deaerada e colocada na coluna.

O veneno bruto (fração solúvel) foi aplicado à coluna e eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L, pH 7,8 a um fluo de 20,5 mL/h. a eluição das proteínas retidas pela resina foi feita por gradiente convexo de concentração de tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L a 1,0 mol/L.

A determinação da concentração do tampão foi obtida experimentalmente, através de uma curva padrão traçada com concentrações molares conhecidas do tampão.

Com base no perfil cromatográfico determinado pela leitura em absorvância em 280nm as frações foram reunidas, sendo posteriormente liofilizadas.

3.5.2 Filtração em Sephacryl S-200 da Fração I

Cerca de 8 mg da fração I foram suspensos em 0,5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, centrifugadas a 11270 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi aplicado a uma coluna pré-empacotada de Sephacryl S-200 (2,6 x 60 cm - Amersham Biosciences) equilibrada e eluída com o mesmo tampão, a um fluxo de 0,4 mL/min. As frações (1,2 mL) foram obtidas utilizando o sistema de cromatografia Äkta UPC (Amersham Biosciences), sendo composto por detectores ultravioleta e condutivímetro, 2 bombas, coletor de frações e acoplado a um microcomputador.

3.5.3 Diálise e Ultrafiltração

As subfrações I-1 e I-4 cromatografadas em Sephacryl S-200 foram colocadas em tubos de diálise com poro de 3500 Da (Fisherbrand®), que permitem a passagem de solutos de baixo peso molecular, e dialisadas contra os tampões Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,8 (I-1) ou Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1 (I-4) por 24 horas a 4°C com 4 trocas de 1L. Após a diálise, as amostras foram concentradas para um volume final de 1,0 mL em Sistema Amicon® utilizando uma membrana de NMWL ≥ 3.000 (retém moléculas com peso molecular ≥ 3.000).

3.5.4 Cromatografia da Subfração I-1 em DEAE-Sepharose

A subfração I-1 (2,0 mg) obtida da filtração da Sephacryl S-200 foi submetida a uma cromatografia em DEAE – Sepharose (2,0 x 30 cm). A eluição das proteínas retidas nas condições de equilíbrio foi feita por um gradiente convexo de concentração de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,8 + NaCl 0,6 mol/L e monitorada pela leitura da absorvância das frações (2 mL) em 280 nm.

As subfrações obtidas foram concentradas em Sistema Amicon (NMWL $\geq$ 30.000) para um volume de 1,0 mL e, em seguida, adicionado de PBS e novamente concentrado. A operação foi repetida mais 3 vezes, para remoção do Tris-HCl + NaCl.

3.5.5 Cromatografia da Subfração I-4 em coluna Mono – Q

A subfração I-4 (0,5mg) foi submetida a uma cromatografia de troca-iônica (aniônica forte) em coluna Mono–Q de 0,5 x 5 cm (Amersham Pharmacia Biotech), sob um fluxo de 1,0 mL/min em sistema de alta pressão Äkta UPC-900 (Amersham Biosciences). A fase móvel inicial foi tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1 e posteriormente foi estabelecido um gradiente de Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1 + NaCl 1,0 mol/L.

3.6 DESSALINIZAÇÃO EM COLUNA DE SEPHADEX G-25

A fração I e as subfrações obtidas das purificações da fração I foram filtradas em coluna pré-empacotada de Sephadex G-25 (5 x 5 cm) para trocar o sal presente nas amostras por tampão PBS pH 7,4, necessário para o estudo sobre o sistema complemento, como descrito nos item 3.9. As filtrações foram realizadas em sistema de cromatografia Äkta UPC, sendo monitoradas a absorvância em 280 nm e a condutividade do tampão em mS/cm.

3.7 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), empregando-se o kit da Bioagency[®] (*Bio-Rad Protein assay*).

3.8 ENSAIOS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES ISOLADOS

3.8.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) com Agentes Desnaturantes

A PAGE com SDS foi realizada segundo método descrito por Laemmli (1970), empregando 13,5 % (gel de separação) e 5 % (gel de concentração) de acrilamida, foram preparadas em tampão 0,375 mol/L Tris-HCl (pH 8,8) e 0,1 % de SDS e tampão 0,125 mol/L de Tris-HCl (pH 6,8) e 0,1 % de SDS, respectivamente. O tampão do eletrodo (pH 8,3) continha 0,025 mol/L de Tris e 0,192 mol/L de glicina e 0,1 % de SDS.

As amostras foram dissolvidas em tampão 0,0625 mol/L de Tris-HCl (pH 6,8), 2% de SDS, 10 % de glicerol (v/v) e 0,001 % de azul de bromofenol (como corante) na proporção (1:1) na ausência e na presença de β -mercaptoetanol. As amostras que continuam no tampão β -mercaptoetanol foram fervidas a 100°C por 5min. A eletroforese foi realizada com uma voltagem de 90 V e uma corrente de 20 mA por gel, até que o corante azul de bromofenol alcançasse o final do gel.

As proteínas foram coradas por uma hora ou mais com uma solução contendo 0,2 % de Coomassie Brilliant Blue R-350 em água: metanol, 1:1 (v/v) e descorados em ácido acético a 7% (v/v); ou coradas pelo método de coloração com nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985).

3.8.2 PAGE sem Agentes Desnaturantes

A PAGE sem agentes desnaturantes foi realizada pelo método de Reisfield et al. (1962) com modificações, segundo descrito por Arantes et al. (1989).

O gel foi preparado a 10% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida:acrilamida, 0,8:30,0); tamponado a pH 4,5 com acetato de potássio 0,05 mol/L e contendo 0,5% (v/v) de TEMED e

0,1% (m/v) de persulfato de amônio. O tampão do eletrodo foi β -alanina: ácido acético 0,035 mol/L, pH 4,5. O sistema de eletroforese utilizado foi para minigéis (Sigma).

As amostras foram dissolvidas em 10 μ L de solução saturada de sacarose.

A eletroforese foi realizada com uma voltagem de 100 V e uma corrente de 20 a 25 mA por gel. Decorrido o tempo adequado, determinado pela presença do corante fucsina básica no centro da placa, o gel foi retirado da mesma, mergulhado em água e, em seguida, corado por uma hora com uma solução de Coomassie Brilliant blue R-350 a 0,2% (m/v) em metanol: água, 1:1(v/v); ou coradas pelo método de coloração com nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985).

3.8.3 Focalização Isoelétrica

A eletrofocalização dos componentes ativos da fração I foi realizada segundo método de Vesterberg (1972), modificado como descrito a seguir.

3.8.3.1 Preparo do gel

O gel foi preparado a 7% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida 0,8:30), contendo 10% de sacarose (m/v), 1% de anfólito 3,5 a 9,0 (v/v), 0,15% de TEMED (v/v) e 0,07% de persulfato de amônio (m/v).

3.8.3.2 Aplicação das amostras e focalização isoeletrica

O gel foi colocado sobre uma placa de porcelana refrigerada ligada a um banho termostatizado a 4°C. A placa de porcelana foi previamente umedecida com glicerol, para melhorar a refrigeração do gel. Duas tiras (Amersham Biosciences) 2 x 13 cm foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em um solução de NaOH 1,0 mol/L e o ânodo em ácido fosfórico 1,0 mol/L. Os eletrodos de platina

foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema então fechado. A fonte foi ajustada para valores máximos de 200 V, 30 mA e então realizada uma pré-focalização por 30 min. As amostras foram então aplicadas no centro do gel, e a focalização prosseguiu por 6 horas a 1500 V, 10 mA e 2 W.

3.8.3.3 Detecção das proteínas e determinação do gradiente de pH

Após a focalização isoeletrica, foram desprezados 0,5 cm das laterais do gel, sendo então seccionado tiras de 1,0 x 2,0 cm do mesmo e colocados em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de água Milli-Q (Millipore), para leitura do pH após 2 horas em repouso. Estas tiras foram cortadas nas laterais do gel intercaladamente, de forma a obter valores de pH para cada 0,5 cm do gel.

O restante do gel contendo as amostras foi então colocado em solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) por 30 min e, em seguida, corado por nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985).

3.8.4 Análise Seqüencial dos Resíduos de Aminoácidos da região N-Terminal

O seqüenciamento automatizado (Shimadzu PPSQ-20) utilizando-se a degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), foi realizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, na Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, sob responsabilidade da Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

A solução de proteína foi aplicada numa membrana de vidro (Wako, Japão) na concentração de 200 picomoles e, em seguida, levada à câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal foi removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilintiazolinona (ATZ). O ATZ-aminoácido foi automaticamente transferido para uma forma de feniltiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH-aminoácido) e esta

foi transferida para um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência onde a identificação foi realizada por comparação á cromatografia de um padrão de PTH-aminoácidos.

Reagentes e solventes foram transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático, através de um micro-processador, permitindo seqüências automáticas com alta sensibilidade entre 10 a 500 picomoles de proteína. Os reagentes utilizados foram: feniltiocinato (PITC) a 5% em n-heptano, trimetilamina (TMA) a 12,5 % em água, ácido trifluoracético (TFA) com ditionitrito (DTT) a 0,002%, TFA a 25% em água com DTT a 0,01%, acetonitrila com DTT a 0,001%, n-heptano, etilacetato, 1-clorobutano, acetonitrila a 20% em água.

3.8.5 Seqüenciamento de aminoácidos dos peptídeos trípticos internos através de Espectrometria de massa

Todas as análises e informações obtidas da seqüência por espectrometria de massa foram feitas pelo Prof. Dr. José César Rosa do Centro de Química de Proteínas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

ESI-MS/MS: As proteínas separadas por SDS-PAGE foram submetidas a uma digestão *in situ* por tripsina, com 0,5 µg de tripsina (Promega Co). Os peptídeos trípticos das amostras foram preparados em *micro-tip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, PerSeptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. A amostra foi carregada em *micro-tip* individual, purificada de sais e outros componentes hidrofílicos com 3 x 100 µL de ácido fórmico a 0,2%, sendo eluída da resina em 30 µL de uma solução de metanol a 60% em ácido fórmico 5%. A amostra foi diretamente infundida no espectrômetro de massa neste solvente. Os peptídeos trípticos foram analisados em um espectrômetro de massas do tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK), utilizando uma origem eletrospray do tipo *nanoflow*. As condições

experimentais utilizadas foram: voltagem do cone de 30 V, voltagem do capilar de 2,8 KV e a temperatura do cone de 100°C. A amostra foi introduzida através de uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300 nL/min. Os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e processados com o software MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*). Alguns peptídeos trípticos foram selecionados e submetidos a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*), que promove a fragmentação do íon selecionado, originando fragmentos de íons tipo *b* e *y* que foram utilizados para a dedução das respectivas seqüências de aminoácidos dos peptídeos.

3.8.6 Análise da Seqüência e Alinhamento

As seqüências obtidas foram comparadas através do sistema BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e as seqüências semelhantes foram alinhadas usando Multalin (CORPET, 1988).

3.8.7 Ensaio para Degradação de Fibrinogênio

Esta reação foi realizada segundo a técnica descrita por Edgar e Prentice (1973), com algumas modificações. Soluções de 10 µl de fibrinogênio bovino (0,5 mg/mL em Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,0) foram incubadas com diferentes concentrações dos componentes ativos do VTs (2,5, 1,2, 0,6, e 0,3 µg) a 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida utilizando-se 10 µl de tampão Tris-HCl 0,06 mol/L, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β-mercaptoetanol a 10% (v/v), SDS a 2% e azul de bromofenol 0,05%, e levadas a banho-maria a 100°C por 5 min. Em seguida as amostras foram analisadas em SDS-PAGE a 12 %.

O mesmo procedimento foi realizado incubando 2,5 µg dos componentes ativos da fração I com 5 µg de fibrinogênio a diferentes intervalos de tempo (0 e 30 min, 1, 2, 4, 12 e 24 horas). Variou-se se também a temperatura de incubação (4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 50°C).

A atividade fibrinogenolítica também foi avaliada pré-incubando 2,5 µg dos componentes ativos em soluções tampões em diferentes faixas de pH, por 15 min e, logo após a amostra foi adicionada de 5 µg de fibrinogênio por 4 horas a 37°C.

A ação de inibidores na atividade fibrinogenolítica foi investigada pré-incubando 2,5 µg dos componentes ativos (5,0 µl) com 5,0 µl de EDTA, EGTA, 1,10 fenantrolina, aprotinina, β-mercaptoetanol a 20 mM e PMSF (2 mM), seguindo o procedimento descrito acima.

3.8.8 Ensaio de Investigação de Atividade Caseinolítica

Um gel foi preparado a 7% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida 0,8:30), contendo 5% de caseína (m/v), 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,15% de TEMED (v/v) e 0,07% de persulfato de amônio (m/v).

No momento do uso, foram feitos orifícios no gel e aplicado um volume 10 µL dos componentes ativos do VTs, o gel foi deixado em câmara úmida por 8 horas a 4°C. Posteriormente, foi incubado a 37°C por 24 horas. A atividade foi evidenciada através de um halo transparente que contrasta com o fundo azul do gel corado por Coomassie Brilante Blue, representando a atividade do componente ativo do VTs.

3.9 ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA COMPLEMENTO

3.9.1 Obtenção de Soro Humano Normal (SHN) como Fonte de Complemento

Sangue humano foi obtido por punção venosa de cinco voluntários de ambos os sexos com idade variada entre 18 e 22 anos. O sangue foi deixado em repouso à temperatura

ambiente por 1 hora e, após este tempo, centrifugado sob refrigeração (4 °C) por 10 min a 480 x g. O “pool” aliqotado em tubos Eppendorf foi estocado a -70 °C até o momento da utilização.

3.9.2 Preparação das Amostras

Todas as amostras utilizadas para os ensaios sobre o SC foram dessalinizadas em coluna de Sephadex G25, com descrito no item 3.6, e eluídas nos tampões adequados. As amostras também foram filtradas previamente em membrana estéril de 0,22 µm. Os componentes ativos do VTs foram aquecidos a 100°C por 15 min, em seguida centrifugados a 11270 x g a 4°C e filtrados em membranas estéreis de 0,22 µm.

3.9.3 Avaliação da Atividade Lítica das Vias Clássica/Lectina (VC/L)

3.9.3.1 Colheita de Sangue de Carneiro e Preparo de uma Suspensão

Padronizada de Hemácia

Foi colhido sangue de dois carneiros através de punção da veia jugular, em igual volume de Solução de Alséver (HOFMAMM; MAYER, 1977) como anticoagulante. As hemácias dos carneiros foram lavadas duas vezes em PBS, em seguida reunidas e lavadas uma terceira vez em solução de fixação de complemento (CFD; ácido dietilbarbitúrico 0,0155 mol/L, barbital sódico 0,0045 mol/L, cloreto de sódio 0,725 mol/L, cloreto de magnésio 0,00415 mol/L, cloreto de cálcio 0,00125 mol/L e azida sódica 0,005 mol/L) (HARRISON; LACHMANN, 1986) e ressuspensas em CFD. A suspensão de hemácia foi padronizada para densidade óptica de 0,70 – 0,80 em espectrofotômetro pela absorvância em 700 nm, quando diluída 40 vezes. Esta suspensão foi utilizada para preparo do complexo hemácia- anticorpo anti- hemácia (EA).

3.9.3.2 Preparo do Complexo Hemácia de Carneiro Anti-Hemácia (EA)

O anticorpo anti-hemácia de carneiro (hemolisina) foi diluído em CFD e misturado com igual volume da suspensão da hemácia de carneiro a 10%. Esta mistura foi mantida a 4°C por 15 min com agitação ocasional e padronizada para densidade óptica de 0,70 – 0,80 em espectrofotômetro pela absorvância em 700 nm, quando diluída 1,4 vezes.

3.9.3.3 Ensaio Hemolítico Estático

SHN (60 µL) foi diluído em CFD contendo gelatina a 1% (CFD/gel) na proporção de 1:12 ou 1:75 e incubado a 37°C com diferentes concentrações da fração I, subfrações (30 µL) em diferentes tempos (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min). Como controle soro normal foi incubado com CFD/gel ou com as subfrações aquecidas a 100°C por 15 min. Decorrido o tempo pré-determinado foi adicionada suspensão de complexo hemácia de carneiro anti-hemácia (EA, 60 µL) incuba-se a 37°C por mais 30 min. Após o tempo de incubação os tubos foram resfriados em banho de gelo, adicionados de 150 µL de PBS gelado, e centrifugados a 800 x g. A porcentagem de lise foi determinada pela leitura da absorvância do sobrenadante em 412nm. Como 100% de lise foi considerada a absorvância da suspensão de hemácias lisadas em água, nas mesmas proporções do ensaio.

Para a construção dos gráficos e a determinação dos valores de CR₅₀ (concentração capaz de reduzir 50% da atividade lítica do complemento) foi realizada regressão não linear entre os pontos. A partir dessa curva, foram calculados os valores de log CR₅₀.

3.9.4 Avaliação da Atividade Lítica da Via Alternativa (VA)

3.9.4.1 Colheita de Sangue de Coelhos e preparo de Suspensão Padronizada de Hemácias

Sangue de duas coelhas foi colhido com solução de Alséver na proporção de 1:1, e processadas conforme descrito (POLHILL et al., 1978). O sangue foi filtrado separadamente em gaze estéril, incubado por 15 min a 37°C em igual volume de tampão de trietanolamina (TEA) contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) e centrifugado por 10 min a 480 x g. As hemácias foram ressuspensas em TEA - contendo íons magnésio (Mg^{2+}), lavadas três vezes nesta solução e ressuspensas em solução de Alséver e estocadas a 4°C, sendo utilizadas até, no máximo, 15 dias. No momento de uso, alíquotas da suspensão de hemácia de cada coelho foram reunidas e lavadas 2 vezes em tampão TEA-EGTA- Mg^{2+} , ressuspensas, e a suspensão (250 μ L de suspensão de hemácia de coelho + 750 μ L de TEA-EGTA- Mg^{2+}) acertada em espectrofotômetro a 700 nm, para absorvância de 0,70 - 0,75.

3.9.4.2 Ensaio Hemolítico Estático

O ensaio hemolítico foi realizado de acordo com método de Mayer (1971). SHN (60 μ L, 1:5 em TEA-EGTA- Mg^{2+}) foi incubado a 37°C por intervalos de tempos de (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) com diferentes concentrações da fração I ou subfrações (30 μ L). Como controle soro normal foi incubado com TEA-EGTA- Mg^{2+} . Decorrido o tempo pré-determinado foi adicionada suspensão de hemácia de coelho (60 μ L) incubando-se a 37°C por 30 min. Após o tempo de incubação os tubos foram resfriados em banho de gelo, adicionados de 150 μ L de PBS gelado e centrifugados. A porcentagem de lise foi determinada pela leitura da absorvância do sobrenadante em 412 nm. Como 100% de lise foi determinada a absorvância da suspensão de células lisadas em água, nas mesmas proporções do ensaio.

Para a construção dos gráficos e a determinação dos valores de CR₅₀ (concentração capaz de reduzir 50% da atividade lítica do complemento) foi realizada regressão não linear entre os pontos. A partir dessa curva, foram calculados os valores de log CR₅₀.

3.9.4.3 Ensaio Hemolítico Cinético

O ensaio hemolítico cinético (AWALD et al., 1961; FERRIANI, 1991) baseia-se na determinação do $t_{1/2}$, definido como o tempo gasto (minutos) para que ocorra 50% de lise de uma suspensão de hemácias em condições padronizadas. Para estes ensaios o SHN (200 µL) foi pré-incubado a 37°C com a subfração I-4 ou as proteínas MQ-5 ou MQ-7 (30, 45 ou 60 min), e em seguida adicionado em cubetas mantidas no compartimento termostatizado (37°C) do espectrofotômetro (DU®-70-Beckman) por um período de 30 segundos. Transcorrido este tempo, foram acrescentados 400 µL da suspensão de hemácia de coelho, padronizadas e previamente mantida em banho à 37°C. Imediatamente após esta adição foi acionado o registrador gráfico do espectrofotômetro monitorando-se a cinética de lise através da medida da variação da absorvância em 700 nm. Neste ensaio foi utilizado soro humano diluído 1:6.

3.9.5 Análise Imunoeletrorética de C3 e Fator B

3.9.5.1 Preparo das Amostras

SHN (50 µL, 1:2 CFD/gel) foi pré-incubado por 40 min a 37°C com 25 µL da fração I, subfração I-1 ou I-4, as proteínas MQ-5 ou MQ-7 ou CFD/gel (controle negativo). Decorrido o tempo de incubação foi adicionado EDTA 0,1 mol/L à mistura e seguindo – se análise por imunoeletrforese bidimensional. Como controle positivo, zimosan (2 mg) foi incubado com 400 µL de SHN (1:2) a 37°C por 40 min, e em seguida o soro foi centrifugado por 10 min a 480 x g e adicionado de EDTA para uma concentração final de 0,01mol/L.

3.9.5.2 Imunoeletroforese Bidimensional

A imunoeletroforese bidimensional foi realizada de acordo com o método de Clarke e Freeman (1968), usando placas de vidro 5,5 x 7,5 x 0,2 cm e agarose 1,3% em tampão de imunoeletroforese (IEF) contendo Tris 0,025 mol/L, glicina 0,027 mol/L, barbital 0,02 mol/L, EDTA 0,01 mol/L, pH 8,8. As amostras (como descritas no item 3.9.5.1) correram na primeira dimensão por 2 horas a 140 V e 5 mA/placa em uma área de 1,5 x 7,5 cm de agarose (1,4 mL). Para a segunda dimensão as placas foram completadas (5,5 x 7,5 cm) com 5 mL de agarose 1,3 % contendo 1% de anticorpo anti-C3 humano (Calbiochem). A eletroforese foi conduzida por 9 horas usando 140 V e 5 mA/placa. As placas foram secas a 37 °C, coradas com corante Ponceau 0,5 % e descoradas em ácido acético 3%.

3.9.5.3 Imunoeletroforese

Imunoeletroforese (SCHEIDEGGER, 1955) foi realizada empregando gel de agarose a 1,3% em tampão IEF, pH 8,8. Sobre as placas (2,5 x 7,5 cm) foram colocados 4 mL de solução agarose. A eletroforese foi desenvolvida por 2 horas a uma corrente de 5 mA/placa e 140 V. Anticorpo anti – fator B humano (fornecido pela Profa. Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi, do departamento de física e química da FCFRP-USP) foi aplicado na canaleta central e as placas foram mantidas por 48 horas em câmara úmida, para desenvolvimento das linhas de precipitação. Depois de lavadas em PBS, as placas foram secas e coradas com Coomassie Brilliant blue G- 250 em água: metanol, 1:1 (v/v) e descorados em ácido acético a 3 % (v/v).

3.9.6. Quimiotaxia de Neutrófilo

O ensaio foi realizado com as colaborações da Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott e da farmacêutica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

SHN (diluído duas em CFD, 0,2 mL) foi incubado com a subfração I-4 ou as proteínas MQ-5 e MQ-7 previamente filtradas em membrana estéreis de 0,22 µm e, em seguida foram incubadas por 40 min a 37°C. Em adição, SHN incubado com zimosan (1,0mg) e SHN incubado com CFD foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Em um controle adicional inativado a 56°C por 30 min foi incubado com zimosan (1mg). Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados e aquecidos a 56°C por 30 min para inativação do complemento residual. A quimiotaxia foi avaliada *in vitro* por técnica de Boyden modificada (1962), utilizando câmaras de migração feitas em acrílico. O compartimento inferior das câmaras foi preenchido com 0,2 mL do soro diluído 5 vezes em solução de Hanks/gelatina, e coberto com filtros de 13 mm de diâmetro e poros de 3 µm (SSWP 01300, Millipore Corp., Bedford, USA). O poço superior foi preenchido com 0,3 mL de uma suspensão de neutrófilo humano, contendo 2×10^6 células/mL, e as câmaras foram incubadas a 37°C por 30 min, em atmosfera umidificada. Terminada a incubação, os filtros foram removidos, fixados em propanol-2, corados com hematoxilina de Harris, desidratados em propanol-2, clareados em xileno e montadas entre lâmina e lamínula com auxílio de Entellan (Merck). A migração de neutrófilo foi determinada pela técnica *leading front* (ZIGMOND; HIRSCH, 1973), medindo-se a maior distância em micrômetros atravessada por três células por campo com uma objetiva de 100x. Foram examinados pelo menos 10 campos por filtro.

3.9.7 Atividade Hemolítica Direta

Suspensões de hemácias de carneiro sensibilizada com anticorpo ou de coelho obtidas como descrito, foram incubados com a 10 µg da subfração I-4 ou com as proteínas MQ-5 ou MQ-7, por 1 hora a 37°C. Células lisadas com água (100% de lise) ou incubadas com PBS (0% de lise) foram usadas como os controles. Após incubação os tubos foram centrifugados por 10 min a 800 x g, e a absorvância do sobrenadante foi lido a 412 nm.

3.9.8 Análise dos Dados

A montagem dos gráficos, cálculo das médias, desvios padrões e erro padrão das médias foram realizados com auxílio dos softwares *Axum 6.0*[®] para *Windows*[™].

Para o teste de significância foi realizado ANOVA e pós-teste (Tukey's) com níveis de significância em **p<0,01 e *p<0,05. Estes testes estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism, versão 3.00 para Windows.

Resultados

4.1. Fracionamento do VTs em CM-Celulose-52

A fração solúvel do VTs foi cromatografada em coluna de CM-celulose-52, como descrito no item 3.5.1. Forneceu 12 frações que foram denominadas: I, II-III, IV, V, VI, VII-VIII, IX, X, XI, XIIA, XIIB e XIII (figura 4). A porcentagem de recuperação para esta cromatografia foi de 97,01% (Tabela I), em termos de $A_{280\text{nm}}$. Pode-se observar através do cromatograma que houve uma boa separação dos componentes do VTs.

Figura 4. Perfil cromatográfico da fração do veneno bruto solúvel (248 mg) fracionado em CM-celulose-52. Coluna de 2,4 x 63,0 cm, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 7,7. Fluxo: 26,7 mL/h; volume coletado por tubo: 3,0 mL; temperatura: 4°C. A amostra foi inicialmente eluída com 150 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L, pH 7,8, iniciando-se a seguir um gradiente convexo de concentração do mesmo tampão de 0,01 a 1,0M.

TABELA I - Recuperação das frações obtidas da cromatografia da fração solúvel do VTs em CM-celulose-52.

Frações Obtidas	% do Eluído *
I	24,05
II-III	11,52
IV	0,82
V	3,61
VI	1,39
VII-VII	18,64
IX	11,27
X	4,04
XI	2,31
XII-A	1,89
XII-B	2,56
XIII	14,91
Recuperação Total	94,02

* A recuperação foi calculada pela absorvância em 280 nm.

A **figura 5** mostra a análise das frações I, II-III, IV, V, VI, VII-VIII, IX, X, XI, XIIA, XIIIB e XIII obtidas da cromatografia em CM-celulose, por PAGE na ausência de SDS. A fração XIII (TsTX-I) apresentou banda eletroforética única, indicando sua pureza já na primeira cromatografia, conforme padronizado por Arantes et al. (1989). As demais frações apresentaram-se heterogêneas.

Figura 5. Análise das frações obtidas da cromatografia em CM-celulose-52 por PAGE sem agentes desnaturantes. Tampão: β -alanina/HAc 0,035 mol/L, pH 4,5. Pré-corrida de 0,5 h a 100 V e de 29 a 20 mA. Corrida de 1 hora e 10 min a 100 V e de 25 a 3,8 mA. Coloração: Coomassie Brilliant Blue R-350 (0,2% em água:metanol, 1:1, v/v). Descoloração: com ácido acético a 7% (v/v).

1. Fucsina básica	6. Fração VI (19 μ g)	11. Fração XII-A (24 μ g)
2. Fração I (20,8 μ g)	7. Fração VII-VIII (21 μ g)	12. Fração XII-B (38 μ g)
3. Fração II-III (41,5 μ g)	8. Fração IX (20 μ g)	13. Fração XIII (7 μ g)
4. Fração IV (42 μ g)	9. Fração X (15 μ g)	14. VTs (30 μ g)
5. Fração V (39 μ g)	10. Fração XI (22 μ g)	

4.2 Efeito das frações obtidas do cromatografia em CM-celulose-52 sobre a Atividade Lítica do SC

Das doze frações (I a XIII) obtidas do fracionamento do VTs em CM-celulose-52, a fração I foi a que apresentou efeito significativo sobre o SC.

A **figura 6A e B** mostra o resultado de um ensaio representativo (3 experimentos) de avaliação da atividade lítica da via clássica/lectina (VC/L) e via alternativa (VA) após incubação de SHN com diferentes concentrações da fração I. A fração I, pré-incubada com soro nas condições e concentrações utilizadas determina redução da atividade lítica de ambas as vias, apresentando um CR_{50} de 30,2 μ g para VC/L e 167,0 μ g para VA.

A **figura 7A e B** mostra o efeito do tempo de incubação da fração I com SHN sobre a atividade lítica das VC/L e VA utilizando 60,0 μ g (VC/L) e 190 μ g (VA) da fração I. A fração I pré-incubada com soro nestas condições induziu a redução da atividade lítica de 50% nos tempos de 42,3 min e 52,2 min, para as VC/L e VA, respectivamente.

Investigou-se a atividade da fração I sobre o fator B do SC do soro com esta fração por imunoeletroforese empregando-se anticorpo anti-fator B humano, e avaliando-se as alterações induzidas no perfil eletroforético desta proteína (**figura 8A e B**). Os resultados revelaram que a fração I (100 μ g) induz mudanças na mobilidade eletroforética do fator B. Estas mudanças foram similares ao observado após incubação de SHN com zimosan. A migração eletroforética do fator B não foi alterada em soro incubado com tampão.

Figura 6A e B. Redução da atividade lítica das vias VC/L (A) e VA (B) pela fração I em diferentes concentrações. Soluções da fração I em CFD (VC/L) ou TEA/EGTA/Mg²⁺ (VA) foram pré-incubados por 60 min a 37°C com SHN (1:12) e em seguida realizado o ensaio hemolítico. Os controles deste ensaio foram: absorvância das hemácias lisadas com água (100% de lise) e absorvância das hemácias incubadas com tampão (0% de lise). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos, cada um executado em duplicata. O valor CR_{50} foi calculado a partir de uma regressão não linear.

Figura 7A e B. Redução da atividade lítica das vias VC/L (A) e VA (B) pela fração I em diferentes tempos. Soluções da fração I em CFD (60,0 μg , VC/L) ou TEA/EGTA/ Mg^{2+} (190,0 μg , VA) foram pré-incubados por diferentes tempos (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) com SHN e em seguida realizado o ensaio hemolítico. Os controles deste ensaio foram: absorvância das hemácias lisadas com água (100% de lise) e absorvância das hemácias incubadas com tampão (0% de lise). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos, cada um executado em duplicata.

Figura 8A e B. Análise imunoeletroforética do fator B do SHN incubado com a fração I. SHN foi incubado com 100 μ g da fração I (**a**), zimosan (**b**, controle positivo) e CFD (**c**, controle negativo) por 40 min a 37°C. No centro da canaleta foi colocado anti-fator B humano. Depois de lavadas com PBS, as placas foram secas e coradas com Coomassie Brilliant Blue G- 250 em água: metanol, 1:1 (v/v) e descoradas em ácido acético a 3% (v/v). Lâminas 2,5 x 5,0 cm, cobertas com agarose a 1,3% em tampão IEF pH 8,8. Condições de corrida: 2 horas; 36 a 42V e 10mA.

O efeito da fração I sobre o componente C3 do complemento foi investigado por imunoeletroforese bidimensional do SHN incubado com esta fração empregando-se anticorpo anti-C3 humano, e avaliando-se as alterações induzidas no perfil eletroforético desta proteína (**figura 9**) Como se pode observar, a fração I induziu uma modificação na migração eletroforética de C3 semelhante à obtida pelo zimosan.

Figura 9A, B e C. Análise imunoeletroforética do C3 do SHN incubado com a fração I. SHN foi incubado com CFD (A, controle negativo), 100 µg da fração I (B) e zimosan (C, controle positivo) por 40 min a 37°C. As placas formam secas a 37°C e coradas com corante Ponceau 0,5% e descoradas com ácido em ácido acético 3%. As setas representam a primeira e segunda dimensões. Lâminas 5,5 x 7,5 x 0,2 cm cobertas com agarose a 1,3% em tampão IEF pH 8,8. Condições de corrida da 1ª dimensão: 2 horas; 46 a 28 V e 15 mA; segunda dimensão: 9 horas; 23 a 30 V; 15mA.

4.3 Filtração da Fração I em Coluna de Sephacryl S-200

Dez frações foram obtidas da filtração em Sephacryl S-200 com PBS pH 7,4, e denominadas I-1 a I-10 (**figura 10**). A porcentagem de recuperação para esta filtração foi de 99,9 % (**Tabela II**), em termos de ABS em 280nm (mABS). A **figura 11** mostra o resultado obtido da eletroforese com SDS das subfrações I-1 a I-10 obtidas da filtração. O método utilizado foi eficiente na separação dos componentes da fração I, apresentou ótima recuperação e revelou-se bastante reprodutível.

Para detectar qual das subfrações obtidas apresentava efeito sobre a VC/L, foram selecionados três tubos de cada pico, dos quais foram recolhidos 30 µL/ tubo e incubados com SHN por 30 min a 37°C, e em seguida realizado o ensaio hemolítico. Podemos observar na **figura 10** que as subfrações I-1, I-4 e I-5 apresentaram atividade sobre a VC/L, sendo este efeito mais intenso para as duas primeiras subfrações.

A **figura 12A** mostra o resultado de um ensaio representativo (3 experimentos) da atividade lítica da VC/L após incubação de SHN com diferentes concentrações da subfração I-1. Esta subfração pré-incubada com soro nas condições e concentrações utilizadas determina redução da atividade lítica, apresentando um CR_{50} de 0,22 µg. O efeito da fração I sobre o componente C3 do complemento sérico foi avaliado por imunoeletroforese bidimensional empregando-se anticorpo anti-C3 humano. A **figura 12B, C e D** mostra os resultados obtidos. Como pode ser observado, a subfração I-1 induziu mudanças significativas na migração eletroforética do componente C3 semelhante ao obtido pelo zimosan.

Figura 10. Filtração Fração I (8 mg) em coluna Sephacryl S-200. A coluna pré-empacotada Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences) de 1,6 x 60,0 cm, foi equilibrada com tampão PBS pH 7,4, com fluxo de 0,4 mL/min, frações de 1,2 mL/tubo foram coletadas, utilizando Sistema Äkta Prime. 30 uL de cada tubo foram pré-incubados com SHN 1:75 por 30 min a 37°C, e em seguida realizado o ensaio hemolítico.

TABELA II - Recuperação das Subfrações obtidas da filtração em Sephacryl S-200 da Fração I.

Subfrações Obtidas	Área do pico/área Total (%) *
I-1	4,00
I-2	10,00
I-3	12,30
I-4	11,05
I-5	5,30
I-6	41,05
I-7	5,48
I-8	6,56
I-9	2,2
I-10	1,96
Recuperação	99,9

* Em termos de mABS em 280 nm

Figura 11. Análise por SDS-PAGE das sufrações obtidas da filtração da fração I em Sephacryl S-200. Gel de 6,0 x 8,0 cm x 0,75 mm, contendo gel de concentração a 5% (pH 6,8) e gel de resolução a 15% (pH 8,8) em acrilamida. Corrida: 1 hora e 40min, 90 V e 34 a 12 mA. Corado pelo método de coloração com nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985). P.P.M= a) Albumina Bovina, 66.000; b) Ovalbumina, 45.000; c) Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; d) Anidrate carbônica, 29.000; e) Tripsinogênio, 24.000; f) Inibidor de Tripsina, 20.000; g) α - Lactoalbumina, 14.200.

1. I-1 (2 μ g)	4. I-4 (6 μ g)	7. I-7 (2 μ g)	10. I-10 (1 μ g)
2. I-2 (2 μ g)	5. I-5 (3 μ g)	8. I-8 (2 μ g)	11. P.P.M
3. I-3 (3 μ g)	6. I-6 (3 μ g)	9. I-9 (2 μ g)

Figura 12A. Redução da atividade lítica das VC/L pela subfração I-1. Soluções da subfração I-1 em CFD foram pré-incubadas (30 min a 37°C) com SHN 1:75 e em seguida realizado o ensaio hemolítico. O valor CR_{50} foi calculado a partir de uma regressão não linear. **Análise imunoelctroforética do C3 do SHN incubado com a subfração I-1.** SHN foi incubado com CFD (**B**); 50 μg da subfração I-1 (**D**) ou zimosan (**C**) por 60 min a 37°C. As placas foram secas a 37°C, coradas com corante Ponceau 0,5% e descoradas com ácido em ácido acético 3%. As setas representam a primeira e segunda dimensões. Lâminas 5,5 x 7,5 x 0,2 cm cobertas com agarose a 1,3% em tampão IEF pH 8,8. Condições de corrida da 1^a dimensão: 2 horas; 24 a 23 V e 15 mA; segunda dimensão: 9 horas; 43 a 40 V; 15mA.

A **figura 13A e B** mostra o efeito da incubação de SHN com a subfração I-4 sobre a atividade lítica da VC/L em diferentes concentrações e tempos. Nestas condições a subfração I-4 determinou redução da atividade lítica concentração e tempo dependente, apresentando um CR_{50} de 0,44 μ g.

O estudo da VA foi feito empregando ensaio hemolítico cinético. As **Tabelas III e IV** mostram os resultados de um experimento. Como pode ser observado, ocorre um aumento no valor de $t_{1/2}$ do soro pré-incubado com subfração I-4, em relação ao controle, evidenciando uma redução da atividade lítica da VA de complemento. Este efeito foi dependente da concentração e do tempo de pré-incubação (30, 45 e 60 min). As **Tabelas III e IV** mostram redução da atividade lítica em relação ao controle de 32 a 68,3%, nas concentrações de 6,25 μ g a 50 μ g, respectivamente, e redução de 43,7% (30min), 46,7% (45 min) e 56% (60min) utilizando uma concentração de 12,5 μ g.

Figura 13. Redução da atividade lítica da VC/L pela subfração I-4 em diferentes concentrações (A) e tempos de pré-incubação (B) com SHN. A subfração I-4 foi pré-incubada em diferentes concentrações (30 min) ou tempos (0 a 35 min, 1,5µg) com SHN 1:75 a 37°C e em seguida realizado o ensaio hemolítico. Os controles deste ensaio foram: absorvância das hemácias lisadas com água (100% de lise) e absorvância das hemácias incubadas com tampão (0% de lise). Os valores representam a média de dois experimentos, cada um executado em duplicata. O valor CR_{50} foi calculado a partir de uma regressão não linear.

TABELA III - Redução da Atividade lítica da VA pela subfração I-4 em diferentes concentrações.

	Média $t_{1/2}$ (min) $\pm$ EPM	Redução da atividade lítica (%)*
Controle	2,28 $\pm$ 0,2	-
I-4 (6,25 μ g)	3,35 $\pm$ 0,2	32,0
I-4 (12,5 μ g)	4,00 $\pm$ 0,1	43,0
I-4 (25,0 μ g)	6,90 $\pm$ 0,1	67,0
I-4 (50,0 μ g)	7,20 $\pm$ 0,2	68,3

SHN (1:6) foi pré-incubado com tampão TEA/EGTA/Mg²⁺/gelatina (controle negativo) ou diferentes concentrações da subfração I-4 por 30 min a 37°C, e em seguida realizado o ensaio hemolítico cinético. Os valores representam a média de dois experimentos, cada um executado em duplicata.

TABELA IV - Redução da Atividade lítica da VA pela subfração I-4 em diferentes tempos de incubação.

Tempo (min)	Controle Média $t_{1/2}$ (min) $\pm$ EPM	Subfração I-4 Média $t_{1/2}$ (min) $\pm$ EPM	Redução da atividade lítica (%)*
30	2,31 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,1	43,7
45	3,20 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,2	46,7
60	4,40 $\pm$ 0,1	9,9 $\pm$ 0,1	56,0

SHN (1:6) foi pré-incubado com tampão TEA/EGTA/Mg²⁺/gelatina (controle negativo) ou em diferentes tempos (30, 45 e 60 min) com a subfração I-4 (12,5 μ g) a 37°C, e em seguida realizado o ensaio hemolítico cinético. Os valores representam a média de dois experimentos, cada um executado em duplicata.

* Representa a média dos valores de $t_{1/2} \pm$ EPM dos experimentais transformados em percentagem de redução de atividade lítica (tomando-se a média dos $t_{1/2}$ dos controles como 100%).

4.4 Cromatografia da Subfração I-1 em DEAE-Sepharose

A **figura 14A** mostra o perfil cromatográfico da subfração I-1 fracionada em coluna de DEAE-Sepharose. Obtiveram-se 5 subfrações denominadas DE-1 a DE-5, que, em seguida, foram concentradas para 1,0 mL em Sistema Amicon (membrana de NMWL ≥ 30.000) e dialisadas contra PBS, por 2 dias com 4 trocas/dia. A recuperação foi de 84,8% em relação ao material aplicado (**Tabela V**). Após dessalinização foi investigado o efeito destas frações sobre a atividade hemolítica da VC/L. As subfrações DE-2, DE-3 e DE-4 mostram atividade sobre a VC/L (**Tabela VI**). A composição da subfração DE-2 em condições não redutoras e redutoras pode ser observada por eletroforese com SDS (**figura 14B e C**). Esta fração corresponde a 13,4 % da subfração I-1 (**Tabela V**) foi a que mostrou maior atividade sobre o SC (**Tabela VI**).

Figura 14 (A). Cromatografia da subfração I-1 em coluna de DEAE-Sepharose (2 x 30cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1mol/L, pH 7,8, (1,4 mL/min e 2,0mL/tubo). Eluição: gradiente convexo de concentração de Tris-HCl 0,1mol/L + NaCl 0,6 mol/L, a partir de 40 mL. **(B e C)** Análise por SDS – PAGE (10,5%) das subfrações. A 20 μ L de cada amostra foram adicionados 10 μ L de tampão da amostra (TA). Corrida: 1 hora 25 min, 90 V, 32 a 8 mA. Gel corado por coloração de Nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985). OBS. P.P.M. (a) Miosina 247.000, (b) β galactosidade 127.000, (c) Soro Albumina 83.000 e (d) Ovalbumina 43.000.

B: 1. DE-1 (1 μ g) 5. DE-5 (1 μ g)
 2. DE-2 (2 μ g) 6. DE-6 (1 μ g)
 3. DE-3 (4 μ g) 7. P.P.M
 4. DE-4 (3 μ g)

C: 1. I-1 (5 μ g) 5. DE-2 com β merc (2 μ g)
 2. DE-2 sem β merc (2 μ g)
 3. P.P.M
 4. TA c/ β merc.

TABELA V - Recuperação das Subfrações obtidas da cromatografia da subfração I-1 em DEAE-Sepharose.

Frações Obtidas	% do Eluído *
DE-1	8,3
DE-2	13,4
DE-3	19,4
DE-4	12,7
DE-5	31,0
Recuperação Total	84,8

*A recuperação foi calculada pela absorvância em 220 nm.

TABELA VI - Redução da Atividade lítica da VC/L pelas subfrações obtidas da cromatografia da subfração I-1 em coluna de DEAE-Sepharose.

Amostra	Massa (μg)	Redução da Atividade Lítica (%)
DE-1	1,40	12,0
	0,70	5,0
	0,30	1,0
	0,15	0,0
DE-2	1,60	93,0
	0,80	85,0
	0,40	72,0
	0,20	44,5
DE-3	2,00	90,3
	1,00	69,0
	0,50	45,0
	0,25	16,0
DE-4	4,00	85,6
	2,00	78,5
	1,00	62,3
	0,50	2,0
DE-5	1,50	15,0
	0,75	5,2
	0,37	3,2
	0,18	1,0

Obs. SHN (1:75) foi incubado por 30 min com as amostras e, em seguida, realizado o ensaio hemolítico. Os controles foram feitos como descrito no item 3.9.3.3.

4.5 Cromatografia da Subfração I-4 em Coluna Mono-Q

A **figura 15** representa a cromatografia da Subfração I-4 em coluna Mono – Q equilibrada e eluída inicialmente com tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1 e com gradiente de 1,0 mol/L de NaCl. Sete subfrações foram obtidas deste fracionamento e denominadas MQ-1 a MQ-7. Os picos de absorvância estão bem separados, e o mesmo perfil foi obtido em outros cromatogramas similares, com as respectivas frações, evidenciando que o método possui ótima resolução e reprodutibilidade. A porcentagem de recuperação (área do pico/área total – mABS_{280nm}) é apresentada na **Tabela VII**. Os picos de absorvância estão bem separados e simétricos, e o mesmo perfil foi obtido em outros cromatogramas com as respectivas frações, evidenciando que o método possui ótima resolução e reprodutibilidade. A análise SDS-PAGE das subfrações obtidas da purificação em coluna Mono-Q (**figura 16**) mostra um elevado grau de pureza, para as subfrações MQ-1, MQ-4, MQ-5 e MQ-7.

As sete subfrações (500 µL) foram dessalinizadas em coluna Sephadex G-25, equilibrada com PBS, pH 7,4, filtradas em membranas de 0,22 µm e, em seguida, foi analisado o efeito sobre a atividade hemolítica da VC/L, após pré-incubação com SHN por 30 min a 37°C, em diferentes concentrações. Verificou-se uma redução da atividade lítica, para as proteínas MQ-5 e MQ-7 apresentando valores de CR₅₀=0,42 µg e CR₅₀=0,44 µg, respectivamente. As mesmas amostras, depois de fervidas por 15 min a 100°C não apresentaram efeito sobre VC/L (**figura 17**). O estudo da atividade sobre a VA foi feito empregando ensaio hemolítico cinético. A **Tabela VIII** mostra os valores de t_{1/2} de um experimento e porcentagem de redução de atividade lítica (tomando-se a média dos t_{1/2} dos controles como 100%). Como pode ser observado, ocorre um aumento no valor de t_{1/2} do soro pré-incubado com proteínas MQ-5 e MQ-7, em relação ao controle, evidenciando uma redução da atividade lítica da VA. Este efeito foi evidenciado de forma concentração dependente.

Figura 15. Cromatografia da subfração I-4 (0,5 mg) em Coluna Mono-Q em Sistema de Cromatografia Líquida Äkta UPC. A coluna pré-empacotada Mono-Q (Amersham Biosciences) de 0,5 x 5,0 cm, foi equilibrada e as frações eluída inicialmente com Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1, e em seguida iniciou-se gradiente com Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1 + NaCl 1,0 mol/L (Tampão B). O fluxo foi de 1 mL/min e volume das frações de 1mL/tubo.

TABELA VII - Recuperação das Subfrações obtidas da cromatografia em coluna Mono-Q da fração I-4.

SUBFRAÇÕES OBTIDAS	Área do pico/área Total (%) *
MQ-1	35,67
MQ-2	10,88
MQ-3	7,08
MQ-4	5,23
MQ-5	7,64
MQ-6	2,28
MQ-7	16,08
Recuperação	85,08

* Em termos de mABS em 280 nm

Figura 16. Análise por SDS – PAGE (15%) das subfrações obtidas da Cromatografia da I-4. Corrida 1 hora 43 min, 90 V, 33 a 8 mA. Foram recolhidos 10 µl de cada pico obtido da cromatografia e adicionado 5 µl do tampão da amostra (3vezes concentrado) e aplicado no PAGE. Gel corado por coloração de nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985). P.P.M= **a)** Albumina Bovina, 66.000; **b)** Ovalbumina, 45.000; **c)** Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; **d)** Anidrate carbônica, 29.000; **e)** Tripsinogênio, 24.000; **f)** Inibidor de Tripsina, 20.000; **g)** α - Lactoalbumina, 14.200.

1. MQ-1 (4µg)	6. MQ-6 (1µg)
2. MQ -2 (4µg)	7. MQ -7 (4µg)
3. MQ -3(5µg)	8. I-4 (30 µg)
4. MQ -4 (4µg)	9. P.P.M
5. MQ -5 (5 µg)

Figura 17. Redução da atividade lítica da VC/L pela incubação de SHN com as proteínas MQ-5 e MQ-7 obtidas da cromatografia em coluna Mono-Q. Soluções das subfrações MQ-5 ou MQ-7 (filtradas em membrana estéril 0,22 μm) ou fervidas (15 min a 100°C) e filtradas em membranas estéril 0,22 μm em PBS foram pré-incubadas por 30 min a 37°C com SHN (1:75) e, em seguida, realizado o ensaio hemolítico. Os controles deste ensaio foram: absorvância das hemácias lisadas com água (100% de lise) e absorvância das hemácias incubadas com tampão (0% de lise). O valor CR_{50} foi calculado a partir de uma regressão não linear.

TABELA VIII - Redução da Atividade lítica da VA após incubação do SHN com as proteínas MQ-5 e MQ-7 em diferentes concentrações.

	Massa (μg)	Média $t_{1/2}$ (min) $\pm$ EPM	Redução da Atividade Lítica (%) [*]
Controle	-	3,20 $\pm$ 0,1	
	1,0	3,54 $\pm$ 0,1	9,6
MQ-5	5,0	4,29 $\pm$ 0,3	25,4
	10,0	5,92 $\pm$ 0,1	54,0
MQ-7	1,0	3,65 $\pm$ 0,2	12,3
	5,0	4,25 $\pm$ 0,2	24,7
	10,0	5,77 $\pm$ 0,3	55,4

SHN (1:6) foi pré-incubado com tampão TEA/EGTA/Mg²⁺/gelatina (controle negativo) ou diferentes concentrações das proteínas MQ-5 e MQ-7 por 30 min a 37°C, e em seguida realizado o ensaio hemolítico cinético.

* Representa a média dos valores de $t_{1/2} \pm$ EPM dos experimentais transformados em percentagem de redução de atividade lítica (tomando-se a média dos $t_{1/2}$ dos controles como 100%.)

A tabela **IX** mostra que a subfração I-4, MQ-5 e MQ-7, quando incubadas com suspensões de hemácia de coelho ou hemácia de carneiro sensibilizada com anticorpo não apresentam atividade hemolítica direta. Os valores obtidos foram semelhantes ao do controle negativo.

Em seguida foi investigada a ação da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre o componente C3 do SC por incubação destas frações com SHN seguida de análise por imunoeletroforese bidimensional, avaliando as alterações induzidas no perfil eletroforético desta proteína (**figura 18A, B e C**). Os resultados revelaram que a subfração I-4 (**e**, 12,5 µg) e as proteínas MQ-5 (**b**, 2,5µg) e MQ-7 (**c**, 2,5 µg) induzem mudanças na mobilidade eletroforética de C3. Estas mudanças foram similares às observadas após incubação de SHN com zimosan (**a**, controle positivo). A migração eletroforética de C3 não foi alterada em soro incubado com tampão (**d**, controle negativo).

O efeito da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre o componente fator B do complemento foi estudado por incubação destas frações com SHN seguida de análise por imunoeletroforese empregando-se anticorpo anti-fator B humano e avaliando-se as alterações induzidas no perfil eletroforético desta proteína. A **figura 19A, B e C** mostra o perfil eletroforético do fator B, no qual SHN foi incubado com tampão (**a**, controle negativo), com 12,5µg da subfração I-4 (**b**), proteínas MQ-5 (**d**) e MQ-7 (**e**) e zimosan (**c**). Como pode ser observado, as subfrações induziram modificações na migração eletroforética de C3 semelhantes às obtidas com zimosan.

TABELA IX – Avaliação da atividade hemolítica direta da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre suspensão de hemácia.

	Massa (µg)	Hemácia de carneiro sensibilizada com anticorpo	Hemácia de coelho
100% de Lise	-	0,900 ± 0,0005	0,891 ± 0,0007
0% de Lise	-	0,021 ± 0,0004	0,032 ± 0,0005
I-4	5,0	0,013 ± 0,0001	0,046 ± 0,0003
MQ-5	5,0	0,026 ± 0,0007	0,022 ± 0,0008
MQ-7	5,0	0,034 ± 0,0010	0,021 ± 0,0002

* Representa a média dos valores ± EPM. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C, em seguida lida a 412 nm. Os controles deste ensaio foram: absorvância das hemácias lisadas com água (100% de lise) e absorvância das hemácias incubadas com tampão (0% de lise)

Figura 18A, B e C. Análise imunoeletroforética do C3 do SHN incubado com a subfração I-4 e as proteínas MQ-5 e MQ-7. SHN foi incubado com zimosan (a), 2,75 μ g da subfração MQ-5 (b), 2,75 μ g da subfração MQ-7 (c), CFD (d) e 12,5 μ g subfração I-4 (e) por 40 min a 37°C. As placas formam secas a 37°C e coradas com corante Ponceau 0,5% e descoradas com ácido em ácido acético 3%. As setas representam a primeira e segunda dimensões. Lâminas 5,5 x 7,5 x 0,2 cm cobertas com agarose a 1,3% em tampão IEF, pH 8,8. Condições de corrida da 1ª dimensão: 2 horas; 49 a 51 V e 15 mA; segunda dimensão: 9 horas; 43 a 40 V; 15 mA.

Figura 19A, B e C. Análise imunoelctroforética da atividade da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre o fator B. SHN foi incubado com CFD (a, controle negativo), 12,5 µg subfração I-4 (b), zimosan (c, controle positivo), 2,75 µg da subfração MQ-5 (d), 2,75 µg da subfração MQ-7 (e) por 40 min a 37°C. No centro da canelata foi colocado anti-fator B humano. Depois de lavadas com PBS, as placas foram secas e coradas com Coomassie Brilliant BlueG- 250 em água: metanol, 1:1 (v/v) e descorados em ácido acético a 3% (v/v). Lâminas 2,5 x 5,0 cm, cobertas com agarose a 1,3% em tampão IEF pH 8,8. Condições de corrida: 2 horas; 37 a 46V e 15mA.

A habilidade da subfração I-3 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 em gerar fatores quimiotáticos no soro em consequência da ativação do SC foi investigada através do ensaio de quimiotaxia de neutrófilo, após da incubação de SHN com as subfrações por 40 min a 37°C (**figura 20**). O soro foi diluído ao adicionado no compartimento inferior da câmara de Boyden e o compartimento superior foi preenchido com suspensão de neutrófilo.

A subfração I-4 e os componentes isolados MQ-5 e MQ-7 pré-incubados com SHN induziram migração de neutrófilo semelhante ao observado pelo soro ativado por zimosan. As subfrações apresentaram efeito mais intenso na concentração de 10µg. Aquecimento prévio do soro por 30 min a 56°C, aboliu completamente a atividade quimiotática induzida pelo zimosan. A subfração I-4, MQ-5 e MQ-7 incubadas com CFD na ausência de soro não foram capazes de induzir quimiotaxia (dados não apresentados).

Figura 20. Quimiotaxia de neutrófilos induzida por SHN pré – incubado com as subfração I-4 e proteínas MQ-5 e MQ-7. Suspensão de neutrófilo foi adicionada ao compartimento superior das câmaras e, e em seguida, incubadas a 37°C por 30 min em atmosfera umidificada. SHN foi previamente incubado com CFD (controle negativo), zimosan (controle positivo) ou as proteínas MQ-5, MQ-7 ou I-4 (filtradas em membranas estéreis de 0,22μm). A migração de neutrófilo foi determinada pela técnica *leading front* (ZIGMOND; HIRSCH, 1973). Valores são a média ± EPM de dois experimentos cada um realizado em duplicata. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, níveis de significância em relação aos controles.

4.6 Caracterização Bioquímica da MQ-5 e MQ-7

4.6.1 Determinação do peso molecular através de SDS-PAGE e Determinação do Ponto isoeletrico (pI) por Focalização Isoelétrica

Os pesos moleculares das proteínas MQ-5 e MQ-7 foram determinados por SDS-PAGE. Foram utilizadas duas amostras, uma reduzida com β -mercaptoetanol e outra sem β -mercaptoetanol (**figura 21A**). Os pesos moleculares aproximados da MQ-5 e MQ-7 foram determinados através da curva padrão traçada considerando-se a distância de migração em função dos valores de pesos moleculares das proteínas utilizadas como padrões, conforme mostra a **figura 21B**. O peso molecular aparente da MQ-5 foi o mesmo que da MQ-7 na ausência de β -mercaptoetanol (24.500) e na presença de β -mercaptoetanol (33.100).

Após a focalização isoeletrica, realizada como descrito no item 3.8.3, a MQ-5 e a MQ-7 apresentaram banda única indicando um pI de 4,2 (**figura 22**).

Figura 21. (A) Análise por SDS – PAGE (15%) das subfrações obtidas da Cromatografia da I-4. Corrida 1 hora 39 min, 90 V, 33 a 12 mA. Gel corado por coloração de nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985). **(B) Curva padrão para a determinação do peso molecular da MQ-5 e MQ-7.** P.P.M= a) Albumina Bovina, 66.000; b) Ovalbumina, 45.000; c) Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; d) Anidrate carbônica, 29.000; e) Tripsinogênio, 24.000; f) Inibidor de Tripsina, 20.000; g) α - Lactoalbumina, 14.200.

1. VTs (50 μ g, sem β -mercaptoetanol)	6. P.P.M
2. Fração I (40 μ g, sem β -mercaptoetanol)	7. MQ-5 (4 μ g, com β -mercaptoetanol)
3. I-4 (10 μ g, sem β -mercaptoetanol)	8. MQ-7 (5 μ g, com β -mercaptoetanol)
4. MQ -5 (4 μ g, sem β -mercaptoetanol)	9. Tampão da amostra com β -mercaptoetanol
5. MQ-7 (5 μ g, sem β -mercaptoetanol)	

Figura 22. Determinação do pI das proteínas MQ-5 e MQ-7 através de focalização isoeletrica. Gel de poliacrilamida (7%) contendo 2% de anfólito pH 3,5 a 10,0 (Amersham Biosciences). Pré-focalização: 30 min, 124 a 201 V, 10 a 9,9 mA, 2 W; Focalização: 6 horas, 188 a 1440 V, 10 a 2,2 mA. Gel corado por coloração de nitrato de prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1985).

4.7 Investigação de Atividade Enzimática

Para verificar se as proteínas MQ-5 e MQ-7 apresentavam atividade proteolítica, foram utilizados como substratos fibrinogênio e caseína.

4.7.1 Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio

No teste de degradação do fibrinogênio (item 3.8.7), a cadeia α foi degradada mais rapidamente que a β , enquanto que a γ permaneceu inalterada, o que foi claramente observado pela análise por SDS-PAGE em gel a 12% (**figura 23**). Nesta mesma figura pode-se observar que a degradação das cadeias α e β foi dose dependente, tanto para a MQ-5 (**A**) quanto para a MQ-7 (**B**). Na **figura 24**, a atividade fibrinogenolítica da MQ-5 e MQ-7 foi avaliada em diferentes intervalos de tempo. A partir de 30 min a cadeia α já estava parcialmente degradada, sendo totalmente degradada após 1 hora de incubação. A cadeia β foi totalmente degradada a partir de 4 h, mas a cadeia γ permaneceu praticamente inalterada.

A temperatura ótima de incubação das proteínas MQ-5 e MQ-7 com o fibrinogênio também foi avaliada. Como pode ser observado na **figura 25**, ambas as subfrações tornaram-se inativas a 50°C, no entanto a 37°C as cadeias α e β foram degradadas. A atividade fibrinogenolítica das subfrações foi mais eficiente na faixa de pHs 7,0 a 9,0, conforme pode ser observado na **figura 26**.

Foi investigada a influência de alguns agentes inibidores da atividade proteolítica (EDTA, EGTA, Aprotinina, 1,10 fenantrolina, PMSF e β -mercaptoetanol) sobre a atividade das proteínas estudadas e o resultado pode ser observado na **figura 27**. O EGTA, EDTA, 1,10 fenantrolina e β -mercaptoetanol inibiram completamente a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, enquanto que o PMSF parece ter inibido parcialmente essa atividade. A aprotinina não foi capaz de inibir a atividade proteolítica das proteínas MQ-5 (**A**) e MQ-7 (**B**).

Figura 23. Análise por SDS-PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B). Tempo de incubação: 4 horas. Para este ensaio 10 μ L de fibrinogênio a 0,5mg/mL foram incubados com diferentes concentrações da MQ-5 e MQ-7. Corrida 1 hora 25 min, 90 V, 33 a 10 mA. As setas representam as cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio. P.P.M= a) Albumina Bovina, 66.000; b) Ovalbumina, 45.000; c) Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; d) Anidrase carbônica, 29.000; e) Tripsinogênio, 24.000; f) Inibidor de Tripsina, 20.000; g) α - Lactoalbumina, 14.200.

A:	1. MQ-5 (2,5 μ g)	6. MQ5 (1,2 μ g) + fibrinogênio
	2. MQ5 (1,2 μ g)	7. MQ-5 (0,6 μ g) + fibrinogênio
	3. MQ-5 (0,6 μ g)	8. MQ-5 (0,3 μ g) + fibrinogênio
	4. MQ-5 (0,3 μ g)	9. Fibrinogênio controle
	5. MQ-5 (2,5 μ g) + fibrinogênio	10. P.P.M
B:	1. MQ-7 (2,5 μ g)	6. MQ7 (1,2 μ g) + fibrinogênio
	2. MQ-7 (1,2 μ g)	7. MQ-7 (0,6 μ g) + fibrinogênio
	3. MQ-7 (0,6 μ g)	8. MQ-7 (0,3 μ g) + fibrinogênio
	4. MQ-7 (0,3 μ g)	9. Fibrinogênio controle
	5. MQ-7 (2,5 μ g) + fibrinogênio	10. P.P.M

Figura 24. Análise por SDS SDS – PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B). Para este ensaio 10 μ L de fibrinogênio a 0,5mg/mL foram incubados com 2,5 μ g MQ-5 ou MQ-7 por diferentes intervalos de tempo. Corrida 1 hora 27 min, 90 V, 32 a 9 mA. As setas representam as cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio. P.P.M= a) Albumina Bovina, 66.000; b) Ovalbumina, 45.000; c) Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; d) Anidrase carbônica, 29.000; e) Tripsinogênio, 24.000; f) Inibidor de Tripsina, 20.000; g) α - Lactoalbumina, 14.200.

A:	1. MQ-5 (2,5 μ g)	6. MQ-5 + Fibrinogênio – 4 horas
	2. MQ-5 + Fibrinogênio – 0 min	7. MQ-5 + Fibrinogênio – 12 horas
	3. MQ-5 + Fibrinogênio – 30 min	8. MQ-5 + Fibrinogênio – 24 horas
	4. MQ-5 + Fibrinogênio – 1 hora	9. fibrinogênio controle
	5. MQ-5 + Fibrinogênio – 2 horas	10.P.P.M
B:	1. MQ-7 (2,5 μ g)	6. MQ-7 + Fibrinogênio – 4 horas
	2. MQ-7 + Fibrinogênio – 0 min	7. MQ-7 + Fibrinogênio – 12 horas
	3. MQ-7 + Fibrinogênio – 30 min	8. MQ-7 + Fibrinogênio – 24 horas
	4. MQ-7 + Fibrinogênio – 1 hora	9. fibrinogênio controle
	5. MQ-7 + Fibrinogênio – 2 horas	10.P.P.M

Figura 25. Análise por SDS-PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B). Tempo de incubação: 4 horas. Para este ensaio 10 μ L de fibrinogênio a 0,5 mg/mL foram incubados com 2,5 μ g MQ-5 ou MQ-7 a diferentes temperaturas. Corrida 1 hora 29 min, 90 V, 33 a 9 mA. As setas representam as cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio. P.P.M= a) Albumina Bovina, 66.000; b) Ovalbumina, 45.000; c) Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; d) Anidrate carbônica, 29.000; e) Tripsinogênio, 24.000; f) Inibidor de Tripsina, 20.000; g) α - Lactoalbumina, 14.200.

A:	1. MQ-5 (2,5 μ g)	5. MQ-5 + Fibrinogênio (37°C)	9. P.P.M
	2. MQ-5 + Fibrinogênio (4°C)	6. MQ-5 + Fibrinogênio(50°C)	
	3. MQ-5 + Fibrinogênio (20°C)	7. MQ-5 (2,5 μ g)	
	4. MQ-5 + Fibrinogênio (30°C)	8. Fibrinogênio controle	
B:	1. MQ-7 (2,5 μ g)	5. MQ-7 + Fibrinogênio (37°C)	9. P.P.M
	2. MQ-7 + Fibrinogênio (4°C)	6. MQ-7 + Fibrinogênio (50°C)	
	3. MQ-7 + Fibrinogênio (20°C)	7. MQ-7 + Fibrinogênio (76°C)	
	4. MQ-7 + Fibrinogênio (30°C)	8. Fibrinogênio controle

Figura 26. Análise por SDS-PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B). Tempo de incubação: 4 horas. Para este ensaio 10 μ L de fibrinogênio a 0,5mg/mL foram incubados com 2,5 μ g MQ-5 ou MQ-7 em diferentes valores de pH (citrato de sódio pH 5,0 e 6,0; Tris-HCl pH 7,0 e 8,0; acetato de sódio pH 9,0 e 10,0 todos a 0,5mol/L). Corrida 1 hora 29 min, 90 V, 33 a 9 mA. As setas representam as cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio.

A:	1. MQ-5 (2,5 μ g)	5. MQ-5 (pH 8,0) + Fibrinogênio
	2. MQ-5 (pH 5,0)+ Fibrinogênio	6. MQ-5 (pH 9,0) + Fibrinogênio
	3. MQ-5 (pH 6,0)+ Fibrinogênio	7. MQ-5 (pH 10,0) + Fibrinogênio
	4. MQ-5 (pH 7,0) + Fibrinogênio	8. Fibrinogênio controle

B:	1. MQ-7 (2,5 μ g)	5. MQ-7 (pH 8,0) + Fibrinogênio
	2. MQ-7 (pH 5,0)+ Fibrinogênio	6. MQ-7 (pH 9,0) + Fibrinogênio
	3. MQ-7 (pH 6,0)+ Fibrinogênio	7. MQ-7 (pH 10,0) + Fibrinogênio
	4. MQ-7 (pH 7,0) + Fibrinogênio	8. Fibrinogênio controle

Figura 27. Análise por SDS – PAGE (12%) dos produtos de degradação do fibrinogênio pela MQ-5 (A) e MQ-7 (B). Tempo de incubação: 4 horas a 37°C . Para este ensaio 2,5 μ g foi pré-incubada por 1 hora com 5 μ L dos respectivos inibidores e em seguida, 10 μ L fibrinogênio foram adicionados a essa mistura. Corrida 1 hora 28 min, 90 V, 32 a 8 mA. As setas representam as cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio. P.P.M= a) Albumina Bovina, 66.000; b) Ovalbumina, 45.000; c) Desidrogenase Gliceraldeído-3-Fosfato, 36.000; d) Anidrate carbônica, 29.000; e) Tripsinogênio, 24.000; f) Inibidor de Tripsina, 20.000; g) α - Lactoalbumina, 14.200.

A:	1. MQ-5 (2,5 μ g)	5. MQ-5 + 1,10fenantrolina + Fibrinogênio	9. MQ-5 + Fibrinogênio
	2. MQ-5 + Fibrinogênio controle	6. MQ-5 + Aprotinina + Fibrinogênio	
	3. MQ-5 + EGTA+ Fibrinogênio	7. MQ-5 + PMSF + Fibrinogênio	
	4. MQ-5 + EDTA + Fibrinogênio	8. MQ-5 + β -mercapot.+ Fibrinogênio	
B:	1. MQ-7 (2,5 μ g)	5. MQ-7 + 1,10fenantrolina + Fibrinogênio	9. P.P.M
	2. MQ-7 + Fibrinogênio controle	6. MQ-7 + Aprotinina + Fibrinogênio	
	3. MQ-7 + EGTA+ Fibrinogênio	7. MQ-7 + PMSF + Fibrinogênio	
	4. MQ-7 + EDTA + Fibrinogênio	8. MQ-7 + Fibrinogênio	

4.7.2 Atividade proteolítica sobre a caseína

A capacidade das proteínas MQ-5 e MQ-7 em degradar caseína foi avaliada por PAGE contendo 5% de caseína, com descrito no item 3.8.8.

A **figura 28** apresenta a curva dose resposta da atividade proteolítica das proteínas MQ-5 e MQ-7 sobre a PAGE contendo caseína. Como pode ser observado nesta figura, o aumento da concentração das enzimas acarretou aumento do diâmetro do halo de lise, mostrando uma relação linear entre a concentração e atividade da enzima e o halo da enzima.

Figura 28. Atividade proteolítica sobre a caseína utilizando-se diferentes concentrações das proteínas MQ-5 e MQ-7. A atividade proteolítica sobre a caseína foi expressa através do diâmetro do halo de lise (mm) $\pm$ EPM. Experimento realizado em duplicata.

4.8 Determinação da Estrutura Primária Parcial da MQ-5 e MQ-7

4.8.1 Análise da Sequência N-terminal

A sequência N-terminal da MQ-5 e MQ-7 foi realizada com o intuito de comparar as sequências obtidas com as demais proteínas isoladas do VTs e, posteriormente, poder desenhar os “primes” adequados para, a partir da biblioteca de cDNA da glândula do VTs, obter a sequência completa das proteínas. Para a MQ-5 foram realizados 13 ciclos e para MQ-7 14 ciclos (**Tabela X**).

TABELA X- Sequência N-terminal das proteínas MQ-5 e MQ-7.

Ordem	MQ-5	MQ-7
1	A	T
2	T	E
3	C	N
4	L	C
5	A	I
6	V	V
7	E	V
8	P	E
9	A	Y
10	P	Y
11	E	I
12	V	V
13	A	C
14		D

4.8.2 Análise da Seqüência e Alinhamento

As seqüências obtidas foram analisadas usando o programa Multalin versão 5.4.1 (CORPET, 1988) e podemos observar que a MQ-5 e MQ-7 apresentam similaridade na região N-terminal (**figura 29**). O alinhamento destas proteínas com as demais toxinas isoladas do VTs também não mostrou nenhuma homologia.

Figura 29. Alinhamento dos N-terminais das proteínas MQ-5 e MQ-7. As seqüências das proteínas, obtidas pela técnica de degradação de Edman,, foram comparadas entre si pelo programa Multalin. Os aminoácidos em vermelho representam alto grau de consenso (>90%) entre as seqüências em azul similaridade.

4.8.3. Determinação das seqüências de aminoácidos de peptídeos internos

A **figura 30** representa o espectro de massa dos peptídeos trípticos obtidos do espectrômetro de massa do tipo eletrospray triplo-quadrupolo da proteína MQ-7.

As proteínas MQ-5 e MQ-7 foram obtidas inicialmente da digestão tríptica *in situ* da SDS-PAGE contendo as bandas de 24.500 Da e, em seguida, submetida ao espectrômetro de massa eletrospray (ESI-MS/MS) e a massa dos peptídeos trípticos foram determinadas. Os peptídeos trípticos selecionados para obtenção da seqüência de aminoácidos foram: íons m/z 555,0 [1109,0 da], m/z 639,5 [1278,0 da] e m/z 721,9 [1442,8 da]. Os mesmos foram submetidos a CID-MS/MS, que promove a fragmentação dos íons, originando fragmentos de íons b e y dos quais foi deduzida a seqüência de aminoácido do fragmento (**Tabela XI**). Os dados da MQ-5 não foram apresentados visto que, ambas apresentam espectros de massa similares em padrão de fragmentação. Portanto, os dados da MQ-5 não foram apresentados, visto que, será necessária nova análise.

O alinhamento das seqüências internas da MQ-7 obtidas da espectrometria de massa com outras proteínas isoladas do veneno de *Tityus* através do NCBI, utilizando-se o BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), não mostraram similaridades.

Figura 30. Perfil de espectrometria de massa ESI-MS/MS dos peptídeos trípticos da MQ-7 Os círculos em vermelho indicam os peptídeos trípticos que foram selecionados para fragmentação por CID-MS/MS e suas respectivas massas moleculares.

TABELA XI - Representa a sequência de aminoácidos obtidos através dos peptídeos trípticos da MQ-7.

Fragmento Trípticos (m/z)	Massa molecular (M + H⁺)	Sequência de Aminoácidos
555,0	1109,0	LLGVTTFTEK
639,5	1278,0	[XX] DLLFLLTAR
721,9	1442,8	EQATDDSDYNER

[XX] pode ser representado pelos pares DT,CL e ES.

Discussão

O envenenamento por picadas de *Tityus serrulatus* é um problema importante de saúde pública na região sudeste do Brasil, principalmente devido ao alto nível de infestação domiciliar e à severidade do quadro clínico desencadeado pelo veneno. Apesar das diferenças zoológicas, entre as diversas espécies de escorpiões perigosos, o veneno escorpiônico provoca sintomas similares em humanos e animais experimentais. Pacientes envenenados pelo VTs apresentam manifestações como dor, febre, vômitos, agitação psicomotora, prostração, sudorese, taquicardia, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, edema pulmonar e choque. Tendo em vista que o veneno deste escorpião desencadeia um processo inflamatório agudo, sistêmico e local (MAGALHÃES et al., 1999; PESSINI et al., 2003; FUKUHARA et al., 2003) e que o SC é um potente desencadeador e amplificador da inflamação, analisamos neste trabalho o possível mecanismo pelo qual as toxinas isoladas da fração do VTs estão atuando sobre componentes específicos do SC. Este estudo dará continuidade à investigação do efeito do VTs e suas toxinas sobre o SC, já realizado por nosso grupo.

A pesquisa de substâncias de origem animal com atividade sobre o complemento é bem documentada na literatura. O SC pode ser ativado por vários venenos animais, como de aranha (*Loxosceles*), serpentes (da família Elapidae, Crotalidae e Viparidae), abelhas e vespas (DIAS da SILVA, et al., 1995). No entanto, estudos realizados por Gebel et al. (1979) não evidenciaram um efeito significativo do veneno de escorpião *Leiurus quinquestriatus* e *Tityus serrulatus* sobre o SC. Em contraste, nós demonstramos que a injeção do VTs e da toxina TsTX-I em ratos, afeta a atividade lítica das VC/L e VA (BERTAZZI et al., 2003). A discrepância entre os resultados pode ser explicada pelo método usado e as quantidades de veneno analisadas.

Os primeiros trabalhos para purificação do VTs foram os realizados por Diniz e Gonçalves (1956, 1960), utilizando eletroforese em papel e gel de amido. Posteriormente, Gomez e Diniz (1996) obtiveram a partir do VTs duas frações tóxicas, utilizando extração do

veneno bruto com água, filtração em gel de Sephadex G-25, seguida de cromatografia em CM-celulose.

Um método mais eficiente e rápido para isolamento das toxinas do VTs foi desenvolvido por Arantes et al. (1989), através da cromatografia em CM-celulose-52, utilizando tampão bicarbonato de amônio, pH, 7,8, onde se obtém treze frações, das quais a fração XIII foi considerada pura e igual à TsTX- γ (POSSANI et al., 1977), atualmente denominada TsTX-I ou Ts1 (para nomenclatura ver SAMPAIO et al., 1983; BECHIS et al., 1984; ARANTES., 1983)

O primeiro passo para purificação do(s) componente(s) do VTs foi a cromatografia da fração solúvel do veneno conforme descrito por Arantes et al. (1989), obtendo-se doze frações (**figura 4**). Durante o processo de purificação, a atividade sobre o SC foi monitorada por avaliação da atividade hemolítica das VC/L e VA e por investigação da ativação de C3 e fator B por imunoeletroforese com emprego de anticorpos específicos e utilizando como controle positivo a incubação de SHN com zimosan, um ativador clássico da VA.

Das doze frações analisadas sobre o SC, a fração I foi a que apresentou atividade sobre o SC. Esta fração representa 24,05 % do material eluído, em termos de absorvância em 280 nm, (**Tabela I**). A eletroforese em gel de poliacrilamida sem SDS mostrou que a fração I apresentara mais de uma proteína, indicando a heterogeneidade da mesma (**figura 5**).

Os efeitos de diferentes concentrações e tempos de incubação da fração I sobre a atividade lítica das VC/L e VA foram determinados *in vitro*, usando soro humano como fonte de complemento. A fração I reduziu de forma dose-dependente (**figura 6A e B**) e tempo-dependente (**figura 7C e D**) a atividade lítica da VC/L e VA, com um CR₅₀ de 30,2 μ g (observado em 42,3 min) e 167 μ g (observado em 52,3 min) para VC/L e VA, respectivamente. Para investigar o mecanismo de ação da fração I do VTs sobre o SC, SNH foi incubado com a fração e os componentes C3 e fator B foram submetidos a eletroforese,

empregando anticorpos específicos. As imunoeletroforeses demonstraram clivagem do fator B e C3 no soro incubado com a fração I, a qual foi similar à induzida pela incubação de SNH com zimosan (**figura 8 e 9**). Os resultados obtidos mostram que a fração induz a ativação do SC durante o período de pré-incubação (SNH + fração I), levando, conseqüentemente, ao consumo dos componentes do complemento. Durante o ensaio hemolítico, realizado após a incubação, observa-se redução de hemólise. Um efeito similar foi observado nos estudos dos venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. cotiara*), que são capazes de induzir, de forma dose-dependente o consumo de complemento (FARSKY et al., 1997). Resultados similares foram também observados nos estudos dos venenos de serpentes dos gêneros *Micrurus* (*M. ibiboboca* e *M. spixii*) e *Naja* (*N. naja*, *N. melanoleuca* e *N. nigricollis*), que ativam o complemento presente no SHN de forma dose-dependente e causam alteração da migração eletroforética de C3. Estes venenos injetados em camundongos induziram um aumento na permeabilidade vascular e edema, mas não possuem substâncias produtoras de hemorragia. Estes componentes podem estar gerando anafilatoxinas através da ativação do SC (TAMBOURGI et al., 1994).

A fração I foi filtrada em coluna Sephacryl S-200, e forneceu 10 componentes (I-1 a I-10, **figura 10**). Cada tubo obtido da filtração foi imediatamente avaliado quanto à possível ação sobre a atividade da VC/L. Dos tubos analisados, os que reduziram a atividade lítica da VC/L correspondem às subfrações I-1, I-4 e I-5 (**figura 10**), sendo este efeito mais intenso para I-1 e I-4. Este método foi eficiente na separação dos componentes da fração I como mostra a SDS-PAGE (**figura 11**) e apresentou um ótimo rendimento de 99,9% (**Tabela II**). Considerando a atividade da fração I sobre o SC, na primeira etapa deste trabalho o objetivo foi estabelecer a metodologia adequada e isolar o componente de alto peso molecular presente no VTs. Foram avaliadas várias metodologias, empregando cromatografia líquida de alta

eficiência, filtração, ultrafiltração e troca-iônica, tendo sido avaliadas mais de 20 técnicas diferentes.

Este trabalho resultou na definição do protocolo de purificação do componente de alto peso molecular, o qual consistiu de cromatografia em CM-celulose-52, seguida de filtração em Sephacryl S-200 e finalmente cromatografia em DEAE-Sepharose.

A fração I, obtida da cromatografia em CM-celulose da fração do VTs solúvel em bicarbonato de amônio, pH 7,8 (**figura 4**), foi filtrada em coluna Sephacryl S-200 obtendo-se dez frações (I-1 a I-10). As subfrações I-1 e I-4 reduziram a atividade da VC/L de forma concentração-dependente. A subfração I-1 apresentou um CR_{50} de 0,2 μ g, foi inicialmente selecionada para o estudo (**figura 12**). Esta subfração induziu clivagem de C3 semelhante ao obtido quando SHN é incubado com zimosan (**figura 12**). Estes resultados mostram que VTs contém componente(s) com propriedade de induzir a ativação do SC. A subfração I-1 foi então cromatografada em DEAE-Sepharose utilizando tampão Tris-HCl 0,1mol/L, pH 7,8, e obtendo-se 5 subfrações (DE-1 a DE-5, **figura 14**). A análise por SDS-PAGE revelou que o processo aumentou o grau de pureza dos componentes de alto peso molecular, presentes nas subfrações DE-2 e DE-3 (**figura 14**). As subfrações DE-2, DE-3 e DE-4 reduziram atividade lítica da VC/L de forma concentração-dependente, sendo este efeito mais intenso para a DE-2 (**Tabela VI**). A análise da subfração DE-2 por SDS-PAGE na presença de β -mercaptoetanol mostrou a presença de um componente majoritário de aproximadamente 90.000 Da, indicando que a amostra nativa é composta de subunidades ligadas por ponte dissulfeto. No entanto, foi possível visualizar outros 5 componentes de menor intensidade. Esses compostos podem fazer parte do complexo ativo de alto peso molecular (DE-2, $M_r > 247.000$ Da). Portanto, o componente de alto peso molecular parece ser composto por um complexo, ou agregado, de 6 proteínas com pesos variando de 243.000 a 90.000 Da (**figura 14**).

A subfração I-4, obtida da filtração em Sephacryl S-200 (**figura 10**), apresentou efeito sobre a atividade lítica da VC/L de forma dependente da concentração e do tempo de incubação ($CR_{50} = 0,44 \mu\text{g}$) (**figura 13**), o mesmo sendo observado para a VA (**Tabela III e IV**). A análise imunoeletroforética (**figuras 18 e 19**) mostrou que a subfração I-4 induziu alterações no perfil eletroforético de C3 e fator B semelhantes às observadas pela fração I.

O terceiro passo de purificação envolveu a cromatografia da subfração I-4 em coluna de troca-iônica Mono-Q (**figura 15**), com eluição por tampão Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,1, com gradiente de NaCl 1,0 mol/L. As sete subfrações obtidas foram concentradas e dessalinizadas por ultracentrifugação, para um volume de 200 μL em tampão PBS. A análise por SDS-PAGE revelou componentes com elevado grau de pureza, presentes nas subfrações MQ-5 e MQ-7 (**figura 16**). Ambas proteínas reduziram a atividade lítica da VC/L de forma dependente da concentração (**figura 17**), apresentando um CR_{50} de 0,41 e 0,44 μg , respectivamente. Resultados similares foram obtidos para VA (**Tabela VIII**). Portanto, este efeito não se deve a uma ação direta destas proteínas sobre as hemácias (**Tabela IX**). Além disso, as proteínas MQ-5 e MQ-7 foram capazes de induzir mudanças no perfil eletroforético de C3 e fator B, semelhante às obtidas pela incubação de SHN com zimosan, corroborando com a hipótese de ativação sobre SC (**figuras 18 e 19**).

A porcentagem de recuperação da terceira etapa de purificação em coluna Mono-Q foi de 85,08% e as subfrações MQ-5 e MQ-7 correspondem a 7,64 e 16,08% do material eluído, respectivamente (**Tabela VII**). O protocolo de purificação utilizado mostrou reprodutibilidade, rendimento elevado, e sem perdas de atividade do material isolado.

A etapa subsequente para investigar o mecanismo de ação consistiu em avaliar a capacidade da subfração I-4 e das proteínas MQ-5 e MQ-7 em gerar fatores quimiotáticos no soro em consequência da ativação do SC. A incubação de SNH com a subfração I-4 e as proteínas MQ-5 e MQ-7 induziram migração de neutrófilo semelhante àquela observada pela

incubação de soro com zimosan, demonstrando que as subfrações induzem ativação do SC com clivagem subsequente de C3 e C5, gerando os fragmentos ativos C3a e C5a (**figura 20**), durante o período de pré-incubação de SNH com as subfrações (40 min a 37°C), sendo estas as responsáveis pela quimiotaxia. As subfrações foram pré-incubadas com CFD e não induziram quimiotaxia de neutrófilo, eliminando a possibilidade de um efeito direto destas proteínas sobre as células. A possibilidade de que a ativação do SC tenha ocorrido em decorrência da eventual presença de produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS), nas soluções de proteínas do VTs, já que o mesmo é capaz de ativar os componentes das vias clássica/lectina e alternativa (SNYDERMAN; PIKE, 1975; VUKAYOLOVICH, 1992), foi investigada. As proteínas MQ-5 e MQ-7, depois de aquecidas a 100°C e filtradas em membrana estéril de 0,22 µm, não apresentaram atividade sobre a VC/L, o que teria ocorrido se houvesse LPS presente, cuja atividade é resistente nestas condições. Resultados similares foram obtidos por Bertazzi et al. (2005), no qual VTs quando fervido, perdeu a atividade sobre os componentes C3 e fator B. Estes fatos corroboram com a hipótese de que o VTs contém ativadores sobre o SC.

As principais conseqüências da ativação do sistema complemento incluem diversas atividades biológicas, tais como: facilitar a eliminação de ICs mediar a lise pelo complexo de ataque a membrana, aumentar a fagocitose por monócitos e neutrófilos e desencadear e amplificar a resposta inflamatória. Durante a ativação do complemento são liberados produtos que têm potente atividade biológica, incluindo habilidade de aumentar a permeabilidade vascular e ativar células para liberação de histamina, resultando na vasodilatação e quimiotaxia de células inflamatórias para o sítio da lesão (EMBER; HUGLI, 1997), podendo intensificar o edema pulmonar, que juntamente com as alterações cardíacas, são as principais causas da letalidade no envenenamento por escorpião. C5a pode, ampliar resposta inflamatória por induzir a produção de proteínas inflamatórias (MIP)-2 de macrófago,

quimioatração de neutrófilos induzida por citocinas, proteína quimioatraente de monócito (MCP)-1, TNF, IL-1 e IL-6 (CZERMARK et al., 1999).

O edema pulmonar é a complicação mais freqüente em vítimas de envenenamento escorpiônico, especialmente crianças (SOFER; GUERON, 1988; ISMAIL et al., 1992; AMARAL et al., 1993), e pode levar muitas vezes ao óbito. Pelo menos dois fatores estão envolvidos no edema pulmonar, induzido pelo veneno de escorpião. O primeiro seria cardiogênico, por falência cardíaca causada pela disfunção ventricular esquerda ou por desordens hemodinâmicas (SOFER; GUERON, 1990; ABROUG et al, 1991; AMARAL et al., 1991; HERING et al., 1993; FREIRE-MAIA; De MATOS, 1993; AMARAL; REZENDE, 1997). O segundo seria humoral, devido à liberação secundária de substâncias vasoativas, que podem aumentar a permeabilidade vascular e o extravasamento de líquido do interior das vênulas e capilares para os alvéolos (AMARAL et al., 1993; CUPO et al. 1994; AMARAL; REZENDE, 1997).

O veneno desencadeia uma resposta inflamatória de fase aguda, com o aumento de velocidade de hemossedimentação (VHS), interleucinas, proteínas totais, proteínas de fase aguda (proteína C reativa, α_2 -macroglobulina), redução de albumina (proteína negativa de fase aguda) e leucocitose local e sistêmica, em ratos (PESSINI et al., 2003).

A presença de componentes com ação sobre o SC tem sido demonstrada em uma variedade de venenos animais (DIAS da SILVA et al., 1995; EGGERTSEN et al., 1980; TAMBOURGI et al., 1994; TAMBOURGI et al., 1995). As famílias de serpentes como as Elapidae, Crotalidae, Viperidae contêm um grande número de componentes que atuam sobre este sistema. Algumas substâncias atuam clivando diretamente um componente particular do complemento, outras interagem com componentes do complemento, resultando em complexos similar ao CVF, por exemplo, capaz de ativar a cascata do complemento.

Os componentes MQ-5 e MQ-7 poderão estar ativando o complemento através da formação de um complexo com fator B, ou através de uma ação enzimática direta/ indireta.

Vários trabalhos têm reportado a ação de proteases com ação sobre componentes do complemento. Do veneno *Bothrops asper* foi isolada uma metaloprotease denominada BaP1 (GUTIERREZ et al., 1995). Esta é uma α fibrinogenase com fraca atividade hemorrágica e peso molecular de 24.000. Posteriormente, Farsky et al., (2000) demonstraram que a metaloprotease BAP-1 é capaz de induzir quimiotaxia de neutrófilo de rato e que tal fenômeno é mediado por agente(s) derivado(s) da ativação do sistema complemento.

A flavoxobin isolada do veneno de serpente *Trimeresurus flavoviridis*, é uma serino-protease com atividade coagulante e responsável pela ativação do SC em humanos. A flavoxobin consiste de 236 aminoácidos com um peso molecular de 25.744, que cliva seletivamente C3 na porção Arg726-Ser727 em C3b e C3a, que é o alvo natural da C3 convertase, sendo um potente ativador SC *in vivo*, e causando o consumo do complemento (YAMAMOTO et al., 2002).

Existe uma variedade de proteínas isoladas de veneno da família Crotalidae com influência sobre o SC, sendo que muitas possuem atividade proteolítica. No veneno de *Crotalus atrox* foram encontradas quatro proteases anticomplementares. Foi sugerido que as mesmas geravam anafilatoxinas C3a e C5a a partir de C3 e C5, respectivamente (MAN; MINTA, 1977). Uma proteína “C3-like” que depleta a via alternativa também foi purificada do mesmo veneno (MINTA; MAN, 1980).

Uma protease denominada M5 foi isolada do veneno de serpente *Crotalus molossus molossus*, apresentando peso molecular de 25.000 e pI 7,6. A M5 apresenta atividade fibrino(geno)lítica, caseinolítica, inibe a atividade hemolítica do complemento de cobaias de forma dose-dependente e hidrolisa completamente C2, C3 e C4 humanos (CHEN; RAEL, 1997).

Um outro mecanismo de ativação do SC é a presença de um componente denominado CVF, um ativador clássico do complemento, que tem sido isolado de várias espécies de cobra (EGGERTSEN et al., 1981; MÜLLER-EBERHARD; FJELLSTROM, 1971; TAKAHASHI; HAYASHI, 1982, VON ZABERN et al., 1982; SHARMA et al., 2001). CVF é uma glicoproteína estrutural e funcionalmente semelhante ao componente C3 do complemento, apresentando peso molecular de aproximadamente 150.000 (EGGERTSEN et al., 1981; VOGEL; MULLER-EBERHARD, 1984). O CVF se assemelha ao C3b (forma ativa do C3), formando o complexo CVFB, e neste complexo o B é clivado pelo fator D, formando o complexo CVFBb que é uma C3/C5 convertase que ativa C3 e C5. Este complexo é resistente à inativação por ação dos fatores reguladores do complemento (VOGT et al., 1974; VOGEL; MÜLLER-EBERHARD, 1982; HENSLEY et al., 1986; VOGEL, 1991) levando a depleção do SC.

Dando continuidade ao trabalho, ensaios foram realizados para verificar se as proteínas MQ-5 e MQ-7 apresentavam atividade proteolítica, utilizando diferentes substratos como fibrinogênio e caseína. O primeiro teste de atividade proteolítica mostrou que as subfrações MQ-5 e MQ-7 são capazes de clivar as cadeias de fibrinogênio. A cadeia α foi hidrolisada predominantemente, enquanto a cadeia β foi hidrolisada quando o fibrinogênio foi incubado com concentrações maiores da MQ-5 e MQ-7 ou tempos de incubação maiores. A cadeia γ permaneceu inalterada (**figura 23 e 24**).

A MQ-5 e MQ-7 foram ativas sobre as cadeias α e β do fibrinogênio em pHs 7,0 a 9,0 e somente sobre a cadeia α em pHs 6,0 e 10,0 (**figura 26**). Apresentaram atividade ótima à 37°C (**figura 25**).

A **figura 27** mostra os efeitos de agentes inibidores da atividade proteolítica da MQ-5 e MQ-7 sobre o fibrinogênio. A dependência de metal destas proteases para a atividade enzimática foi demonstrada pela inibição exercida pelo EGTA, EDTA e 1,10 fenantrolina.

Entretanto, PMSF e aprotinina não afetaram a atividade proteolítica das enzimas. A MQ-5 e MQ-7 não devem ser serino-proteases, haja vista que a aprotinina e o PMSF não foram capazes de inibir a atividade fibrinogenolítica das mesmas. A inibição da atividade proteolítica observada na presença de β -mercaptoetanol é, provavelmente, consequência da desnaturação da proteína e desestruturação de seu sítio catalítico. Estes resultados sugerem que MQ-5 e MQ-7 são metaloproteases.

Almeida et al. (2002) detectaram enzimas com atividade gelatinolítica no veneno de escorpião *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Cerca de 40% da atividade proteolítica avaliada em SDS-PAGE-gelatina de ambos venenos foi inibida na presença de PMSF, mas não por iodocetamida, pepstatina ou fenantrolina. Os autores sugerem que estas enzimas são serino-proteases. Devemos levar em consideração que a metodologia empregada por Almeida et al. (2002) foi diferente da utilizada neste trabalho e os autores testaram apenas os venenos brutos, sendo que a atividade proteolítica não foi 100% inibida por nenhum dos inibidores usados.

O segundo teste mostrou que as proteínas também são capazes de clivar caseína de forma concentração dependente, confirmando sua atividade proteolítica (**figura 28**).

O peso molecular aproximado da MQ-5 e MQ-7 foi de 24.500 na ausência de agente redutor (β -mercaptoetanol) e 33.100 na presença desse agente (**figura 21**). Esta diferença poder ser explicada pelo fato de a migração da molécula na eletroforese ser também dependente do atrito da proteína com a malha de acrilamida. Portanto, na presença de β -mercaptoetanol, a proteína sofreu uma desnaturação mais efetiva, levando ao desenovelamento da proteína, aumento do atrito com a malha do gel e consequente redução de sua migração em relação á proteína sem β -mercaptoetanol. O pI da MQ-5 e MQ-7 (**figura 22**) foram iguais e com valores de 4,2, demonstrando o caráter ácido. A focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida confirma mais uma vez o alto grau de pureza das amostras. Com a obtenção das seqüências N-terminais iniciais da MQ-5 e MQ-7, pudemos verificar que ambas

apresentaram similaridade entre si (**figura 29**). Por espectrometria de massas foi possível obter o perfil dos peptídeos trípticos (“peptide mass fingerprint”) da MQ-5 e MQ-7 que também mostraram-se similares (dados da MQ-5 não foram apresentados). Foram selecionados três fragmentos trípticos da MQ-7 (**figura 30**) e analisados por CID-MS/MS. As seqüências de aminoácidos dos fragmentos m/z 555,0, 639,5 e 721,9 foram LLGVTTTFTEK, [XX]DLLFLLTAR (no qual, [XX] pode ser representado pelos pares DT, CL e ES) e EQATDDSDYNER, respectivamente (**Tabela XI**).

Estes resultados revelaram aproximadamente 20% da estrutura primária da MQ-7. O alinhamento destas seqüências obtidas por espectrometria de massa e degradação automatizada de Edman (N-terminal) em bancos de dados com seqüências de aminoácidos depositados no NCBI utilizando-se o BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), não apresentou homologia relevante com as proteínas isoladas do gênero *Tityus*. Estas seqüências servirão para desenhar os primers e, através da biblioteca de cDNA da glândula do veneno de *Tityus serrulatus*, obter o(s) gene(s) codificador(es) das proteínas MQ-5 e MQ-7. O seqüenciamento do cDNA das proteases será realizado no laboratório do Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis, do Departamento de Farmacologia (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que já possui a biblioteca de cDNA da glândula venenífera do escorpião *Tityus serrulatus*.

A MQ-5 e MQ-7 são muito semelhantes, mas seria necessário analisar a seqüência completa para determinar a percentagem de homologia entre as mesmas. A MQ-5 e MQ-7 poderiam ter sofrido mudanças pós-transdacionais, que não afetaram a região do sítio de ligação, já que ambas apresentam a mesma atividade enzimática e espectros de massa similares em padrão de fragmentação. Portanto, a MQ-5 e MQ-7 nos estudos avaliados sobre o SC, atividade proteolítica e na caracterização bioquímicas, como pI e peso molecular, apresentaram efeitos e características bioquímicas muito semelhantes. O que diferenciou entre

estas duas proteases foram o tempo de eluição em coluna Mono-Q, o N-terminal e a porcentagem no VTs de 0,2 (MQ-5) e 0,4% (Mono Q-7).

A presença de duas formas do fator de veneno de cobra (CVFm1 e CVFm2) já foi descrita na literatura, por Osipov et al., (2005), isoladas do veneno de *Naja melanoleuca*. Suas massas moleculares obtidas por espectrometria de massa – MALDI foram de 142,6 kDa (CVFm1) e 143,1 kDa (CVFm2). Estas proteínas em gel de poliacrilamida com SDS, apresentaram muita similaridade, demonstrando serem constituídas por três subunidades de 70, 50 e 30 kDa. A determinação por espectrometria de massas –MALDI da subunidade de 30kDa da CVFm1 e CVFm2 mostrou diferenças nos peptídeos trípticos, o que sugeriu diferença na seqüência de aminoácidos. Nos estudos sobre o SC, a CVFm1 mostrou-se mais ativa que a CVFm2.

Este trabalho mostrou que as proteínas MQ-5 e MQ-7 ativam o SC, reduzindo a atividade lítica das VC/L e VA do SHN. A ação sobre a VA, independentemente da VC, fica evidenciada quando se emprega um ativador específico desta via, no caso hemácias não sensibilizadas de coelho e solução tampão contendo EGTA, a qual bloqueia a ativação da VC/L pela quelação de íons Ca^{2+} .

Várias evidências corroboram com a ativação do SC por estas proteínas: o efeito observado é abolido pela inativação do soro a 56 °C por 30 min (BERTAZZI et al., 2005); a incubação de SHN com as MQ-5 e MQ-7 determina clivagem de C3 e de fator B similar à observada quando o soro é incubado com zimosan, classicamente conhecido como ativador de VA (SNYDERMAN; PIKE, 1975), e induz a quimiotaxia de neutrófilos.

Já que uma possível ação enzimática pode ser considerada, estudos adicionais são necessários para verificar se o efeito observado decorre de uma ação direta ou indireta das proteínas sobre os componentes do complemento. Estas proteínas poderão clivar diretamente C3 ou formar complexos entre as proteínas do SC, de maneira análoga ao CVF, sem descartar

a possibilidade de atuarem em outros componentes do soro que desencadeiam a ativação do complemento.

Portanto, o mecanismo exato da ação da MQ-5 e MQ-7 ainda precisa ser investigado, mas, certamente, estas proteases serão um valioso instrumento não só para o estudo do SC, mas também para a compreensão das reações sistêmicas que ocorrem durante o envenenamento, como o edema pulmonar/cerebral e o processo inflamatório. Por outro lado, os eventuais componentes isolados do VTs, com ação sobre complemento, poderão servir como modelo para o estudo de drogas a serem utilizadas na rejeição de transplantes, em algumas doenças auto-imunes e neurodegenerativas e no controle da inflamação, processos onde o SC tem participação importante.

CONCLUSÕES

1. Este trabalho mostrou que o VTs possui proteínas que são capazes de ativar o SC. Estes resultados são discordantes de dados da literatura que mostram ausência de atividade do veneno deste escorpião sobre o SC.
2. O componente de alto peso molecular formado por um complexo protéico apresentou atividade sobre a VC/L e induziu clivagem de C3.
3. Os componentes do VTs (MQ-5 e MQ-7) interferem com as VC/L e, de forma independente, também com a VA do SC.
4. Nas condições deste trabalho, a MQ-5 e a MQ-7 apresentaram valores de $CR_{50} = 0,42 \mu\text{g}$ e $CR_{50} = 0,44 \mu\text{g}$, respectivamente.
5. A ação das proteínas MQ-5 e a MQ-7 sobre o SHN determina a clivagem de C3 e de fator B e gera fatores quimiotáticos do SC que levam à ativação de neutrófilos.
6. As proteínas MQ-5 e MQ-7 são muito similares, apresentando o mesmo peso molecular (24.500) e pI (4,2), contudo apresentam diferenças na sequência N-terminal e no tempo de eluição durante a cromatografia.
7. As duas proteínas são metaloproteases capazes de clivar as cadeias de fibrinogênio e de hidrolisar caseína.
8. No envenenamento escorpiônico, o SC pode ter um papel relevante amplificando ou desencadeando o processo inflamatório, intensificando o edema pulmonar e cerebral, através da geração de anafilatoxinas, causando o aumento da permeabilidade vascular e estimulando a quimiotaxia. O estudo do envolvimento do SC no envenenamento por *Tityus serrulatus*, pode levar a um maior entendimento do processo inflamatório desencadeado e ao desenvolvimento de uma estratégia terapêutica mais efetiva.

9. As proteínas isoladas do veneno com atividade sobre o SC poderão ser importantes ferramentas para o estudo do SC e de processos patológicos nos quais o mesmo esteja envolvido.

ABROUG, F.; BOUJDARIA, R.; BELGHITH, M.; NOUIRA, S.; BOUCHOUCHA, S. Cardiac dysfunction and pulmonary edema following scorpion envenomation. **Chest**, Chicago, v. 100 (4), p.1057-9, 1991.

ALMEIDA, F.M.; PIMENTA, A.M.C.; DE FIGUEIREDO, S.G.; SANTORO, M.M; MARTIN-EUCLAIRE; M.F.; DINIZ C.R.; DE LIMA M.E. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p.1041-5, 2002.

ALPER, C.A. Snakes and the Complement System. In: LEE, C.Y. (ed.). **Snake venoms**. New York, Springer, 1979. p. 863-80, Handbook Experimental Pharmacology, 52.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped blast and PSI-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, London,. v.25, p.3389–3402, 1997.

AMARAL, C.F.S.; LOPES, J.A.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Eletrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. **Am J Cardiol**, New York, v. 67, p.655-7, 1991.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N. A. Acidentes por escorpiões, **Arq Brás Méd**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 4, p. 212-6, 1990.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A. Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in the pathogenesis of pulmonary edema after scorpion envenoming. **Toxicon**, Oxford, v. 35, p.997-8, 1997.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary oedema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **Am J Cardiol**, New York, v. 71, p.242-5, 1993.

ANDREWS, P.A.; ZHOU, W.; SACKS, S.H. Tissue synthesis of complement as a immune regulator. **Mol Med Today**, Cambridge, v. 1, p.202-7, 1995.

ARANTES, E. C. Multiplicidade de proteínas tóxicas no veneno do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*. Isolamento da TsTX-IV, uma nova TsTX-I. Ribeirão Preto, 1983. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V; GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 8, p.907-16, 1989.

ARANTES, E.C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A. e GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1199, p.69-75, 1994.

ASSIS, A.I.; BARBOSA, J.E.; DE CARVALHO, I.F. Anticomplementary fraction from the poison secretion of the paratoid gland of the toad (*Bufo marinus paracnemis* Lutz) **Experientia**, Basel, v. 41, p.940-2, 1985.

AUSTYN, J.M.; WOOD, K.J. Inflammatory mediators and soluble effector mechanism. Cap. 9. In: **Principles of cellular and molecular immunology**. p.501-79, 1994.

AWALD et al., 1961. In: FERRIANE, V.P.L. Complemento sérico na infância: evolução da atividade lítica e níveis de C3, C4 e fator B em criança de 3 a 14 anos. Ribeirão Preto, 1991. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BECHIS, G.; SAMPIERI, F.; YUAN, P.M.; BRANDO, T.; MARTIN, M.F.; DINIZ, C.R.; ROCHAT, H. Amino acid sequence of Toxin VII, a β toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 122, p.1146-53, 1984.

BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; TALHAFFERRO, V.L.; AZZOLINI, A.E.; CROTT, L.C.P.; ARANTES, E.C. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int Immunopharmacol**, Amsterdam, v. 5, p. 1077-84, 2005.

BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; AZZOLINI, A.E.; TALHAFFERRO, V.L.; LAZZARINI, M.; ARANTES, E.C. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system *in vivo*. **Toxicon**, Oxford, v. 41, p.501-8, 2003.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. **J Exp Med**, New York, v. 15, p.453-66, 1962.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, New York, v. 72, p.248-54, 1976.

BUCARETCHI, F.; BARACAT, E.C.; NOGUEIRA, R.J.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F.A.; FONSECA, M.R.; TOURINHO, F.S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v. 37, p.331-6, 1995.

- BUCHERL, W. Acúleos que matam. São Paulo, **Revista dos tribunais**, p.153, 1979.
- CAMPOS, J.A.; SILVA, O.S.; LOPEZ, M.; FREIRE-MAIA, L. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion sting in children. In: **Natural Toxins**. EAKER, D.; WADSTROM, T., (Eds)., Pergamon Press, Oxford, p.61-8, 1980.
- CELESTE HENRIQUES, M.; GAZZINELLI, G.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V. Effect of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. **Toxicon**, Oxford, v. 5, p.175-9, 1968.
- CHEN, T.; RAEL, E.D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus* molossus venom that attacks complement. **Int J Biochem Cell Biol**, London, v. 29, p.789-99, 1997.
- CHOY, L.N.; ROSEN, B.S.; SPIEGELMAN, B.M.; SPIEGELMAN, B.M. Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose cells. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 267, n. 18, p.12736-41, 1992.
- CLARKE, M.H.G.; FREEMAN, T. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. **Clin Sci**, London, v. 35, p.403, 1968.
- COLE, D.S.; MORGAN, P.B. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clinical Science**, Washington, v. 104, p.455-66, 2003.
- CORRADO, A.P.; ANTONIO, A.; DINIZ, C.R. Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*) an unusual sympathetic postganglionic stimulant. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v. 164, p.253-8, 1968.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, London, v.16, n.22, p.10881-90, 1988.
- CORRÊA, M.M.; SAMPAIO, S.V.; LOPES, R.A.; MANCUSO, L.C.; CUNHA, O.A.B.; FRANCO, J.J. e GIGLIO, J.R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 7, p.1053-67, 1997.
- COUTINHO NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina. Ribeirão Preto, 1975. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD JR, V. (ed.) **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, 198-208.

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.; OLIVEIRA, J.S.M.; HERING, S. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Rev Inst Med Trop**, Brasil, v. 36 (1), p.67-76, 1994.

CZERMARK, B.J.; SARMA, V.; BLESS, N.M; SCHMAL, H.; FRIEDL, H.P.; WARD, P.A. In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha. **J Immunol**, Baltimore, v. 162, p.2321-5, 1999.

DIAS da SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V.; CAMPOS, A.C.M.R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Complement activation by animal venoms. **J Toxicol Toxin Rev**, New York, v. 14, n. 3, p.375-400, 1995.

DAHL M.R.; THIEL S.; MATSUSHITA M.; FUJITA T.; WILLIS A.C.; CHRISTENSEN T.; VORUP-JENSEN T.; JENSENIUS J.C. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**, Cambridge, v. 15, p. 127-35, 2001.

DINIZ, C.R.; GONÇALVES, J.M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone eletrophoresis. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 41, p.470-7, 1960.

DINIZ, C.R.; GONÇALVES, J.M. Some chemical and pharmacological properties of brazilian scorpion venoms In: **Venoms**, BUCKLEY, E.E.; PORGES, N.(Eds). Washington; A.A.A.S. Press., p.131-44, 1956.

DINIZ, C.R.; TORRES, J.M. Release of an acetylcholine-like substance from guinea pig ileum by scorpion venom. **Toxicon**, Oxford, v. 5, p.277-81, 1968.

EDGAR , W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb Res**, New York, v.2, p.85-95, 1973.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Europ J Biochem**, Berlin, v. 1, p.80-91, 1967.

EGGERTSEN, G.; LIND, P.; SJOQUIST, J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja n. siamensis*). **Mol Immunol**, Oxford, v.18, p. 125–33, 1981.

EGGERTSEN, G.; FOHLMAN, J.; SJOQUIST, J. In vitro studies on complement inactivation by snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v.18, p.87–95, 1980.

EINHORN, V.F.; HAMILTON, R.C. Action of venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus* on release of noradrenaline from sympathetic nerve endings of the mouse vas deferens. **Toxicon**, Oxford, v. 15, p.403, 1977.

EISEN D.P.; MINCHINTON, R.M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.37, p.1496, 2003.

EMBER, J.A.; HUGLI, T.E. Complement factors and their receptors. **Immunopharmacology**, New York, v. 38, p. 3-151, 1997.

EMBER, J.A.; JAGELS, M.A.; HUGLI, T.E. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In: VOLANAKIS, J.E.; FRANK, M.M. **The human complement system in health and disease**. Marcel Dekker, New York, p.241-84, 1998.

EMBER, J.A.; SANDERSON, S.D.; HUGLI, T.E.; MORGAN, E.L. Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 144, p.393-403, 1994.

ERDEI, A.; FÜST, G.; GERGELY, J. The role of C3 in the immune response, **Immunol Today**, Amsterdam, v. 12, p.332-7, 1991.

FARSKY, S.H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, Oxford, v.35, p.185-93, 1997.

FEARON, D.T. Complement as a mediator of inflammation. In: FAUCI, A.S. (ed), **Clinics in Immunology and allergy**, v. 1, n.2., 1981.

FELDBUSH, T.L.; HOBBS, M.V; BALLAS, Z.K.; WEILER, J.M. Role of complement in the immune response. **Fed Proc**, Washington, v. 43, p. 2548–52, 1984.

FERRIANI, V.P.L. Complemento sérico na infância: evolução da atividade lítica e níveis de C3, C4 e fator B em criança de 3 a 14 anos. Ribeirão Preto, 1991. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

FISHER, F.G.; BOHN, H. The toxins of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis*. **Hoppe-Seylers Z Physiol Chem**, Berlin, v. 306, p.269-72, 1957.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.C.; GUTIERREZ, J.M.; CORREA A.P.; RUCAVADO A.; GASQUE P. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment, **Mediat Inflamm**, Oxford, v. 9, p.213–21, 2000.

FRANK, M.M.; FRIES, L.F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunol Today**, Amsterdam, v. 322, n. 9, p.322-6, 1991.

FREIRE-MAIA, L.; AZEVEDO, A.D.; COSTA VAL, V.P. Respiratory arrhythmias produced by purified scorpion toxin in the rat. **Toxicon**, Oxford, v. 11, p.255-7, 1973.

FREIRE-MAIA, L.; DE MATOS, I.M. Heparin or a PAF antagonist (BN-52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Toxicon**, Oxford, v. 31, p.1207-10, 1993.

FUJITA T.; MATSUSHITA M.; ENDO Y. The lectin-complement pathway its role in innate immunity and evolution. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 198, p.185-202, 2004.

FUKUHARA, Y.D.M.; REIS, M.L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q.; DONADI, E.A. Increased plasma levels of IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-a in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, Oxford, 41, p.49–55, 2003.

FUTRELL, J.M; MORGAN, B.B; MORGAN, P.N. An *in vitro* model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, Oxford, 17, n. 4, p. 355-362, 1979.

GEBEL, H.M; FINKE, J.H.; ELGERT, K.D.; CAMBELL, B.J.; BARRETT, J.T. Inactivation of complement by *Loxosceles reclusa* spider venom. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 28, p.756-62, 1979.

GOLDSTEIN, I.M. In: GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. (ed.). **Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates**. Raven Press Ltd, p.55–74, 1988.

GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Mem Inst Butantan Simp Internac**, São Paulo, v. 33, p. 899-902, 1966.

GOMEZ, M.V. Purificação e caracterização da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*. Belo Horizonte, 1967. Tese (Doutorado) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M.; ZINN-JUSTIN, S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **J Toxicol Toxin Rev**, New York, v. 17, p.131-59, 1998.

GOTZE O.; MÜLLER-EBERHARD H.J. The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation. **J Exp Med**, New York, v. 134 , n. 4, p.90-108, 1971.

GRASSET, D.; SCJACOFSSMA, A.; HODGSON, J.A. Immunological studies on scorpions. **J Immunol**, Baltimore, v. 51, p.231-48, 1945.

GUTIERREZ, J.M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, Oxford, v. 33, n. 1, p.19-29, 1995.

GWEE, M.C.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHEAH, L.S.; WONG, P.H.T.; GONG, J.P.; KINI, R.M. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. **J Toxicol Tox Rev**, New York, v. 15, p.37-57, 1996.

HARRISON, R.A.; LACHMANN, P.J. Complement Technology. Chapter 39. In: **Handbook of Experimental Immunology**. By D.M. Weir, Editor 4th Edition. Blackwell Scientific Publications. v. 1, p.39.1-39.49, 1986.

HENSLEY, P.; O'KEEFE, M.C.; SPANGLER, C.J.; OSBORNE, J.C. JR.; VOGEL, C.W. The effects of metal ions and temperature on the interaction of cobra venom factor and human complement factor B. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 26, p.11038-44, 1986.

HERING, E.S.; JURCA, M.; VICHI, F.L.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P. Reversible cardiomyopathy in patients with severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*: evolution of enzymatic, electrocardiographic and echocardiographic alterations. **Ann Trop Paediatr**, London, v. 13, p.173-82, 1993.

HEUKESHOVEN J.; DERNICK R. Simplified method for staining of protein in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 6, p.103-12, 1985.

HOFMAMM, L.G.; MAYER, M.M. Immune Hemolysis and Complement Fixation. In Williams, C.A.; Chase, M.W. (ed) **Methods in Immunology and Immunochemistry**, New York, Academic Press, p.140, 1977.

HUGLI, T.E.; GERARD, C.; KAWAHARA, M. et al. **Mol Cell Biochem**, Washington, v. 41, p.59-66, 1988.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**, Oxford, v. 33, p.825-58, 1995.

ISMAIL, M.; FATANI, A.J.Y.; DABEES, T.T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors. **Toxicon**, Oxford, v. 30 (10), p.1257-79, 1992.

JACK, D.L.; KLEIN, N.J.; TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis, **Immunol Rev** Copenhagen, v.180, p.86-99, 2001.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. O sistema complemento e a imunidade inata. In: JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. (ed.). **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed, 2002, p.63-83.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed., c.8, p.8:31-8:34, 8:44, 8:45, 9:18, 2003.

KIRSCHFINK, M. Controlling the complement system in inflammation. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 38 (1-2), p.51-62, 1997.

KLEIN, J. Complement. In: **Immunology**. Blackweel scientific publications, Boston, p.188-226, 1990.

LACHMANN P.J; HALBWACHS L. The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 21, n. 1, p.109-14, 1975.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". **Nature**, London, v. 227, p.680-5, 1970.

LIKES, K.; BANNER Jr., W.; CHAVEZ M. *Centruroides exilicauda* envenomation in Arizona. **Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 141, p.634-47, 1984.

LOURENÇO, W.R.; VON EICKSTEDT, V.R.D. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.C.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr., V. (ed.). **Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 182-97, 2003.

LUTZ, A.; MELLO CAMPOS, O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gênero *Tityus serrulatus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica**, v. 3, p. 25-6, 1922.

LUXEMBOURG, A.T.; COOPER, N.R. Modulation of signaling via the B cell antigen receptor by CD21, the receptor for C3dg and EBV. **J Immunol**, Baltimore, v. 153, p. 4448-56, 1994.

MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M.E.; AMARAL, C.F.; REZENDE, N.A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI, F.; GAZINELLI, R.T.; CUNHA- MELO, J.R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p.155-64, 1999.

MAN, D.P.; MINTA, J.O. Purification, characterization and analysis of the mechanism of action of four anti-complementary factors in *Crotalus atrox* venom. **Immunochemistry**, Oxford, v.14, p. 521-7, 1977.

MARTIN, M.F.; BECHIS, G.; EL AYEB, M.; SAMPIERI, F.; BRANDO, T.; DINIZ, C.R. e ROCHAT, H. Purification and characterization of eight toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 23, p.594, 1985.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **J Exp Med**, New York, v. 176, p.1497-1502, 1992.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. **Immunobiology**, New York, v. 194, p.443-8, 1995.

MATSUSHITA, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C.; TERAJ, I.; FUJITA, T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. **J Immunol**, Baltimore, v. 165, p.2637-42, 2000.

MAYER, M.M. Complement and complement fixation. In: Chales, C. **Experimental Immunchemistry**. USA, Thomas Publisher, 1971. Chapter 4, p.133-40, 1971.

MINTA, J.O.; MAN, D.P. Immunological, structural and functional relationship between an anti-complementary protein from *Crotalus atrox* venom, cobra venom factor and human C3. **Immunology**, Oxford, v. 39, p.503–9, 1980.

MIRANDA, F.; KUPEYAN, C.; ROCHAT, H.; ROCHAT, C.; LISSITZKY, S. Purification of animal toxins, isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* (Hector), *Buthus occitamus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. **Eur J Biochem**, Berlin, v. 16, p.514-23, 1970.

MOHAMED, A. H. Notes on the toxin of egyptian scorpion. **Biochem J**, Londres, v. 38, p.284-5, 1944.

MORGAN, B.P.; GASGUE, P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 107, p.1-7, 1997.

MORGAN, B.P.; HARRIS, C.L. Complement therapeutics; history and current progress. **Mol Immunol**, Oxford, v. 40, p. 159-70, 2003.

MORGAN, B.P.; Van den BERG, C.W.; HARRIS, C.L. “Homologous restriction” in complement lysis: roles of membrane complement regulators. **Xenotransplantation**. Singapore, n.12, p.258-65, 2005.

MOSS, J.; KAZIC, T.; HENRY, D.P.; KOPIN, J.J. Scorpion venom induced discharge of catecholamines accompanied by hypertension. **Brain Research**, Amsterdam, v. 54, p.381-5, 1973.

MÜLLER-EBERHARD, H.J.; FJELLSTROM, K.E. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. **J Immunol**, Baltimore, v. 107, n. 6, p.1666-72, 1971.

OCHS, H.D.; WEDGWOOD, R.J.; FRANK, M.M.; HELLER S.R.; HOSEA, S.W. The role of complement in the induction of antibody responses. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 53, p.208-16, 1983.

OKUSAWA, S.; DINARELLO, C.A.; YANCEY, K.B.; ENDRES, S.; LAWLEY, T.J.; FRANK, M.M.; BURKE, J.F.; GELFAND, J.A. C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma. **J Immunol**, Baltimore, v. 139, p. 2635-40, 1987.

OOMEN, P.K.; KURUP, P.A. Protein and amino acid contents and physiological properties of the venom of the South Indian Scorpion, *Heterometrus scaber*, Ind. **J Exp Biol**, London, v. 2, p.78-80, 1964.

OSIPOV, A.V.; MORDVINTSEV, D.Y.; STARKOV, V.G.; GALEBSKAYA, L.V.; RYUMINA, E.V.; BEL'TYUKOV, P.P.; KOZLOV, L.V.; ROMANOV, S.V.; DOLJANSKY, Y.; TSETLIN V.I.; UTKIN Y.U. *Naja melanoleuca* cobra venom contains two forms of complement-depleting factor (CVF). **Toxicon**, Oxford, v. 46, p.394-403, 2005.

PAUL, W.E. Complement. In: **Fundamental Immunology**. Lippincott – Ravens Publishers. 4. ed., c. 29, 1999, p.967-95.

PESSINI, A. C.; SOUZA, A. M.; FACCIOLO, L. H.; GREGÓRIO, Z.M.O.; ARANTES, E.C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **Intern Immunopharm**, Amsterdam, v. 3, p.765-74, 2003.

PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p.1495-1504, 2001.

PICKERING, M.C.; BOTTO, M.; TAYLOR, P.R.; LACHMANN P.J. ; WALPORT, M.J. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis, **Adv Immunol**, New York, v. 76, p.227, 2000.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, JR, R.B. Kinect assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. I. Experimental and mathematical analysis. **I Immunol**, Oxford, v. 121,n. 1, p.363-70, 1978.

POSSANI, L.D.; ALAGON, A.C.; FLETCHER JR., P.L.; ERICKSON, B.M. Purification and properties of mamalian toxins from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 180, p.394-403, 1977.

POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. **Eur J Biochem**, Berlin, v. 264, p.287-300, 1999.

POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; MOCHCA-MORALES, J.; SVENDSEN, I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz e Mello. **Carlsberg Res Commun**, New York, v. 46, p.195-205, 1981.

REID, K.B.M.; PORTER, R.R. The proteolytic activation systems of complement. **Annual review of biochemistry**, Pablo Alto, v. 50, p.433-64, 1981.

REISFIELD, R.A.; LEWIS, W.J.; WILLIAMS, D.F. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, London, v. 195, p.281-3, 1962.

ROSEN, B.S.; COOK, J.Y.; YAGLON, J.; GROVES, D.L.; VOLANAKIS, J.E.; DAMM, D.; WHITE, T.; SPIEGELMAN, B.M. Adipsin and complement factor D activity: An Immune-relates in obsesity. **Science**, Washington, v. 244, n. 23, p.1483-7, 1989.

ROSS, G.; MEDOF, M.E. Membrane complement receptors specifics for bound fragments of C3. **Adv Immunol**, New York, v. 37, p.217-67, 1986.

ROSSI, V.; CSEH, S.; BALLY, I.; THIELENS, N.M.; JENSENIUS, J.C.; ARLAUD, G.J. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 276, p.40880-7, 2001.

SAHU, A.; LAMBRIS, J.D. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. **Immunopharmacology**, New York, v. 49, p.133-48, 2000.

SAMPAIO, S.V.; COUTINHO-NETO, J.; ARANTES, E.C.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; GIGLIO, J.R. TsTX-VII, a new toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom able to induce the releasa of neurotransmitters from rat brain synaptosomes not blocked by tetrodotoxin. **Biochem Mol Biol**, Sydney, v. 41, n. 6, p.1255-63, 1997.

SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 21, p.265-77, 1983.

SCHEIDEGGER, J.J. Use micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. **Int Archs Allergy Appl Immunol**, Switzerland, v. 7, p.103, 1955.

SCHOLZ, W.; McCLURG, M.R.; CARDENAS, G.J.; SMITH, M.; NOONAN, D.J.; HUGLI, T.E.; MORGAN, E.L. C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. **Clin Immunol Immunopathol**, New York, v. 57, p.297-307, 1990.

SCHUMAKER, V.N.; ZÁVODSZKY, P.; POON, P.H. Activation of the first component of complement . **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 5, p.21-42, 1987.

SHARMA, S.; JABEEN, T.; SINGH, R.K.; BREDEHORST, R.; VOGEL, C.W.; BETZEL C.; SINGH, T.P. Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, Copenhagen, v.57, p.596-8, 2001.

SHOIBONOV, B.B.; OSIPOV, A.V.; KRYUKOVA, E.V.; ZINCHENKO, A.A.; LAKHTIN, V.M.; TSETLIN, V.I.; UTKIN, Y.M. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first

reprolysin inhibiting the classical pathway of complement. **Mol Immunol**, Oxford, v. 42, p.1141-5, 2005.

SIMARD, J.M.; WATT, D.D. Venoms and Toxins. In: **The Biology of Scorpions**. POLIS, G.A.(Ed). Standford: Standford Univ. Press, p.414-4, 1990.

SJOHOLM, A.G. Deficiencies of mannose-binding lectin, the alternative pathway, and the late complement components. In: ROSE, N.R.; HAMILTON, R.G.; DETRICK, B. (ed.). **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, ASM Press, Washington (2002), p.847.

SNYDERMAN, R.; PIKE, M.C. Interaction of complex polysaccharides with the complement system: effect of calcium depletion on terminal component consumption. **Infect Immun**, Washington, v.11, n.2, p.273-9, 1975.

SOFER, S.; GUERON, M. Vasodilatadors and hypertensive encephalopathy following scorpion envenomation in children. **Chest**, Chicago, v. 97, p.118-20, 1990.

SOFER, S.; GUERON, M. Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *L. quinquestriatus*: hemodinamic and neurological aspects. **Toxicon**, Oxford, v. 26, p.931-9, 1988.

STOVER, C.M.; THIEL, S.; THELEN, M.; LYNCH, N.J.; VORUP-JENSEN, T.; JENSENIUS, J.C.; SCHWAEBLE, W.J. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **J Immunol**, Baltimore, v. 162, p.3481-90, 1999.

TAKAHASHI H.; HAYASHI K. Purification and characterization of anticomplement factor (cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom, **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.701, p.102-10, 1982.

TAMBOURGI, D.V.; Dos SANTOS, M.C.; FURTADO, M. F.; De FREITAS, M.C.; Da SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **Br J Pharmacol**, London, v .112, n. 3, p.723-7, 1994.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VON EICKTGEDT, V.R.D.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH,V.L.; DA SILVA, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J Immunology**, Baltimore, v. 155, n. 9, p.4459-66, 1995.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; de ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte

surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, New York, v. 95, n. 2, p.683-91, 2000.

THIELS, S.; VARUP-JENSEN, T.; JENSENIUS, J.C. A second serine protease associated with manna-binding lectin that activates complement. **Nature**, London, v. 386, n. 3, p.506-10, 1997.

THURMAN, J.M.; HOLERS, V.M. Alternative complement pathway in human disease . **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, p.1305-10, 2006.

TOLEDO, D.V.; NEVES, A.G.A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comp Biochem Physiol**, London, v. 55B, p.249-53, 1976.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of protein in polyacrilamide gels. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v. 257, p.11, 1972.

VITAL BRAZIL, O.; NEDER, A.C.; CORRADO, A.P. Effects and mechanism of action of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. **Pharm Res Comm**, New York, v. 5, n. 2, p.137-50, 1973.

VOGEL C.W. Cobra venom Factor: The complement-activating protein of cobra venom. Reptile venoms and toxins. In: Antony TTu, ed. **Handbook of Natural Toxins**, v. 5, New York: Marcel Dekker, 1991; p.147-88.

VOGEL CW.; MÜLLER-EBERHARD H J. The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 257, p.8292-9, 1982.

VOGEL, C.W.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Cobra venom factor: improved method for purification and biochemical characterization. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v. 73, p.203-20, 1984.

VOGT, W.; DIEMINGER, L.; LYNEN, R.; SCHMIDT, G. Alternative pathway for the activation of complement in human serum. Formation and composition of the complex with cobra venom factor that cleaves the third component of complement. **Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem**, Berlin, v. 355, p.171-83, 1974.

VON ZABERN, I.; PRZYKLENK, H.; VOGT, W. Chain sctructure of cobra venom factor from *Naja naja* and *Naja haje* venom. Scand. **J Immunol**, Baltimore,. v. 15, p.287-94, 1982.

VORUP-JENSEN, T.; PETERSEN, S.V.; HANSEN, A.G.; POULSEN, K.; SCHWAEBLE, W.; SIM, R.B.; REID, K.B.; DAVIS, S.J.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2, **J Immunol**, Baltimore, v. 165, p.2093–2100, 2000.

VUKAYOLOVICH, S.W. Interactions of LPS with serum complement. In: RYAN, J.L.; MORRISON, D.C. (ed.). **Bacterial endotoxic lipopolysaccharides**, v. II. CRC Press, Boca Raton, Fla., p.213-35, 1992.

WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med England**, v. 344, p.1058-66, 2001a.

WALPORT, M.J. Complement. Second of two parts. **N Engl J Med England**, v. 344, p.1140–4, 2001b.

WARLEY, K.; LEMERCIER, C. 1993. The complement system. In: SIM, E. (ed.). **Humoral factors**. Oxford University Press, Oxford, cap. 5.5, p.121-50.

WILSON, W.H. The physiological action of scorpion venom. **J Physiol**, Londres, v. 31, p.48-59, 1904.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.; HATTORI, S.; KIM, S.T. Flaxoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (hadu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, Oxford, v. 107, n. 1, p.111-7, 2002.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **J Exp Med**, New York, v. 137, p.387–410, 1973.

ZLOTKIN, E.; LEOVITS, N.; SHULOV, A. Toxic effects of the venom of the scorpion. *Scorpio maurus palmatus* (Scorpionidae). **Riv Parassitol**, Roma, v. 33, p.217-23, 1972 a.

ZLOTKIN, E.; LEOVITS, N.; SHULOV, A. Hemolytic action of the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 10, p.537, 1972 b.