

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**DESENVOLVIMENTO DE REAGENTES IMUNOQUÍMICOS
PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS TÓXICOS DO VENENO
DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

Fernanda Lopes Menini

**Ribeirão Preto
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Lopes Menini

**DESENVOLVIMENTO DE REAGENTES IMUNOQUÍMICOS
PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS TÓXICOS DO VENENO
DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira

**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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Menini, Fernanda Lopes.

Desenvolvimento de reagentes imunoquímicos para detecção de antígenos tóxicos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Ribeirão Preto, 2007.

64 p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Francisco Juarez Ramalho-Pinto.

1. *Tityus serrulatus* – 2. Veneno – 3. ELISA – 4. Escorpionismo

Aos meus pais, Jurandir e Dulce, pelo incentivo, confiança e amor.

À minha querida irmã, Eliane, por sempre estar ao meu lado e me apoiar.

Ao Willian, pelo carinho, paciência e amor.

À Bambina, por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao *Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto* pelo incentivo e confiança depositados em mim. Agradeço também pela convivência durante todos esses anos e pela oportunidade para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao *Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira*, agradeço pela co-orientação constante e segura na realização deste trabalho, pelos ensinamentos e discussões, bem como pela revisão do “boneco” e da versão definitiva desta dissertação. Prof. Edú, obrigada por sempre ter estado ao meu lado esclarecendo minhas dúvidas e auxiliando-me na elaboração e realização dos experimentos. Sou imensamente grata por sua disponibilidade, pela paciência, pelas conversas que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional e por ter me ajudado a vencer esta etapa tão importante em minha vida.

Agradeço à *Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim* e ao *Prof. Dr. José Roberto Giglio* por participarem da avaliação deste trabalho e pela atenção e sugestões para a correção desta dissertação.

Às colegas do laboratório *Andressa Rodrigues de Souza* e *Vanessa Migliaccio* pela amizade e companheirismo em todos os momentos. Agradeço em especial às amigas *Denise Brufato Ferraz* e *Fabiana Rodrigues dos Santos* pelas discussões sobre meus experimentos, por me auxiliarem na realização deles, por todos os ensinamentos, conversas, risos, por tantos momentos de alegria que passamos juntas e pelos momentos de dificuldade que vocês sempre me ajudaram a superar. Agradeço também à ex-aluna *Izaltina Silva Jardim* pelas discussões e por todos os ensinamentos que muito me auxiliaram.

Agradeço às amigas *Nayara Delgado André* e *Maria Emília Martins dos Santos* pelo convívio, pela amizade, pelas conversas, desabafos e por sempre poder contar com vocês.

Agradeço aos colegas da pós-graduação: *Viviane Aline Oliveira Silva*, *Larissa Favaro Marchi*, *Felipe Roberti Teixeira*, *Mariana D. C. Ignacchiti*, *Marcele Carolina Colhone* e *Hugo Juarez Pereira Vieira* pela convivência e por me ajudarem sempre que precisei.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Bioquímica: *Maria Ivone Campos Fonseca*, *Victor Diaz Galban*, *Ronaldo Sordi Campanini*, *Yaeco Konno Shimada (Lúcia)* e *Maria Tereza Rodrigues (Teia)*, pelo profissionalismo, dedicação e gentileza com que sempre me atenderam.

Às técnicas *Guiliana Bertozzi Francisco*, *Ana Kátia dos Santos* e *Fabiola Leslie A. C. Mestriner*, do laboratório do Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, agradeço pelas sugestões na padronização do ELISA e pela disponibilidade para leitura dos resultados.

Ao biólogo do serpentário da FMRP, *Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa* e à aluna de iniciação científica *Denise Roberta Borges Rosada*, agradeço pela extração do veneno de *T. serrulatus* e pela preocupação para que sempre houvesse veneno suficiente para realização dos experimentos.

Agradeço ao serviço de farmácia da Unidade de Emergência do HCRP-USP por terem cedido as ampolas de soro antiescorpiônico com prazo para consumo humano expirado, que foram utilizadas em experimentos neste trabalho.

Agradeço ao *Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtgui*, da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, por ceder gentilmente os anticorpos anti-fração tóxica conjugados à peroxidase que auxiliaram na padronização do ensaio.

Agradeço à *Profa. Dra. Palmira Cupo* por ceder gentilmente os soros de pacientes que sofreram acidente escorpiônico utilizados neste trabalho. Agradeço também à técnica de laboratório *Tânia Maria Beltrami Trevilatto* pelas orientações e discussões sobre a padronização e aplicação do ELISA, que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPS pela ajuda financeira no início deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não estão aqui citadas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	7
Biologia do escorpião e epidemiologia	8
Manifestações clínicas do escorpionismo.....	9
Classificação do escorpionismo.....	10
Tratamento.....	10
O veneno.....	11
Fracionamento do veneno de <i>T. serrulatus</i>	14
Detecção do veneno.....	14
OBJETIVOS	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	20
1.1- Obtenção do Veneno de <i>T. serrulatus</i>	20
1.2- Fracionamento do veneno	20
1.3- Eletroforese - SDS-PAGE.....	21
2. Dosagem de proteínas.....	21
3. Purificação de anticorpos para detecção de antígenos tóxicos do veneno de <i>T. serrulatus</i>	22
3.1- Purificação de anticorpos contra o veneno total de <i>Tityus serrulatus</i>	22
3.2- Cromatografia de imunoafinidade.....	22
3.3- Titulação dos anticorpos contra o veneno total de <i>T. serrulatus</i>	23

3.4- Purificação de anticorpos anti-TstFG50 de <i>Tityus serrulatus</i>	24
3.5- Conjugação dos anticorpos anti-TstFG50 à peroxidase	25
3.6- Titulação dos anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase	26
4. Técnica de <i>western blotting</i> do veneno total de <i>T. serrulatus</i> com anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase	27
5. Padronização do ensaio: ELISA tipo <i>sandwich</i>	28
6. Avaliação da especificidade dos anticorpos purificados em soro humano	29
RESULTADOS	30
Fracionamento do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	31
Perfil eletroforético das proteínas correspondentes ao pico principal da cromatografia de filtração em Sephadex G-50	31
Titulação dos anticorpos purificados contra o veneno total de <i>T. serrulatus</i> para o <i>coat</i> da placa em ensaio ELISA tipo <i>sandwich</i>	34
Titulação dos anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase por ELISA tipo <i>sandwich</i>	34
<i>Western blotting</i> do veneno total de <i>T. serrulatus</i> com anticorpo anti-TstTG50 conjugado à peroxidase	39
ELISA tipo <i>sandwich</i> para titulação do veneno de <i>T. serrulatus</i>	41
Análise dos soros de doadores normais para detecção de antígenos do veneno de <i>T. serrulatus</i> e reprodutibilidade dos resultados	41
Análise dos soros de doadores de uma amostra aleatória da população para detecção de antígenos do veneno de <i>T. serrulatus</i>	42
Determinação da quantidade de veneno de <i>T. serrulatus</i> em soro humano	46
DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina

CDI: carbonildiimidazol

DAB: 3,3'- diaminobenzidina

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ensaio imunoenzimático de adsorção

OPD: o- fenilenediamina

PBS: salina tamponada com fosfato

PEG: polietileneglicol

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TstFG50: fração tóxica do veneno de *T. serrulatus* obtida por cromatografia em coluna

Sephadex G-50

Tween 20: polioxietileno sorbitan monolaurato

RESUMO

Diversos métodos imunoquímicos foram desenvolvidos com o objetivo de detectar e quantificar venenos de animais peçonhentos em líquidos biológicos de vertebrados. No acidente escorpiônico, a detecção de veneno no sangue de pacientes picados por escorpião poderia auxiliar no tratamento, racionalizando o uso do antiveneno específico. No presente trabalho, apresentamos um estudo sobre o desenvolvimento de reagentes imunoquímicos para a detecção de componentes tóxicos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Inicialmente, fracionamos o veneno para obtenção da fração tóxica. Posteriormente, por técnicas cromatográficas, isolamos do soro hiperimune de cavalos anticorpos contra o veneno total e anti-fração tóxica. O anticorpo específico anti-fração tóxica foi conjugado com peroxidase. Esses anticorpos foram utilizados na preparação de kit tipo *sandwich* para captura do antígeno e sua revelação por ensaio de ELISA em soro humano de indivíduos picados por *T. serrulatus*, armazenados na soroteca do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Estes soros haviam sido coletados e classificados no momento do acidente como de casos moderados, graves ou não-classificados, e armazenados a -20° C. Também utilizamos soros de doadores que não haviam tido contato prévio relatado com o veneno. Nossos ensaios apresentaram especificidade de 96 % e limiar de reatividade (*cut-off*) com valor de leitura de 0,170 a 490 nm. Os reagentes desenvolvidos foram capazes de detectar antígenos tóxicos do veneno de *T. serrulatus* já purificados. Entretanto, não é possível esclarecer se os reagentes que purificamos são capazes de detectar antígenos tóxicos presentes no soro de pacientes armazenados na soroteca. Nossa proposta de continuidade do trabalho prevê a realização de ensaios utilizando soro recém-colhido de pacientes que sofreram acidente escorpiônico moderado ou grave.

ABSTRACT

A series of immunochemical methods have been used to detect and quantify venoms in the biological liquids of vertebrates. In the scorpionic accidents, detection of the venom in the blood of patients that have suffered scorpion sting could help in the treatment, making more effective the use of the anti-venom. In the work here presented, we tried to develop immunochemical reagents for the detection of toxic components from *Tityus serrulatus* venom. We began by fractionating of the venom for obtaining of the toxic fraction. Later, by chromatographic techniques, we isolated antibodies from horse hyperimmune serum against the total venom as well as against the toxic fraction. The antibodies against the toxic fraction were then conjugated with horseradish peroxidase. These antibodies were used afterwards to prepare an ELISA assay kit to capture the antigen from sera of individuals that had been stung by *T. serrulatus* scorpions, stored in a serum bank. These sera had been collect and classified at the moment of the scorpionic accident as moderate, severe or non-classified, and stored at – 20° C. We have also collected sera from individuals that had no previous known contact with *T. serrulatus* venom. Our assays displayed a specificity of 96% and threshold of reactivity (cut-off) of 0.170 at 490 nm. The reagents prepared by us were able to detect purified toxic components of *T. serrulatus*, but it is not possible to clarify if they are able to detect these antigens in the sera of patients that had been stored in the sera bank. We propose to follow-up this approach to assay these antigens in the fresh sera from patients that had suffered either moderate or severe accidents in which they had been stung by scorpions.

INTRODUÇÃO

Biologia do Escorpião e Epidemiologia

Os acidentes escorpiônicos causam vítimas em diversas partes do mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais, constituindo um problema de saúde pública, podendo ser fatais principalmente em crianças (GHALIM et al., 2000; ISMAIL, 1995). Os escorpiões são animais pequenos, pertencentes ao filo dos artrópodes, classe Arachnida, ordem Scorpiones, apresentando o corpo dividido em duas partes, cefalotórax e abdomen. Os escorpiões apresentam um segmento após o abdômen denominado metassoma ou cauda e, ao término deste, o télson, órgão inoculador de veneno onde ficam alojadas as glândulas, liberando o veneno no momento da picada. (Site: www.butantan.gov.br). Em geral, os escorpiões apresentam hábitos noturnos. Durante o dia escondem-se sob madeiras, troncos, entulhos, tijolos e, durante a noite, saem em busca de alimentos, como baratas, grilos, cupins, aranhas. A espécie *T. serrulatus* é bem adaptada a ambientes domiciliares, escondendo-se em roupas, sapatos, buracos, ralos, etc. A reprodução nesta espécie ocorre por partenogênese, ou seja, os óvulos se desenvolvem sem a fertilização do macho, uma vez que não existem nesta espécie. O período de gestação é variável, durando cerca de quatro meses e meio em *T. serrulatus* (CRUZ, 1994).

No Brasil, estudos da década de 60 mostraram que os escorpiões eram encontrados principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (BUCHERL, 1969). Atualmente, segundo dados do Ministério da Saúde, a ocorrência de acidentes é de cerca de 8000 casos/ano, sendo o maior número de notificações provenientes dos estados de Minas Gerais e São Paulo. A partir de 1988 houve um aumento significativo no número de casos e isso se deveu principalmente à implantação da notificação compulsória dos acidentes por animais peçonhentos no país, implantada pelo Ministério da Saúde. Os acidentes escorpiônicos no Brasil são atribuídos principalmente a três espécies pertencentes ao gênero *Tityus*: *T. serrulatus* ou escorpião amarelo, *T. bahiensis* ou escorpião marrom e *T. stigmurus*, sendo o *T.*

serrulatus responsável pelos acidentes de maior gravidade (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Manifestações Clínicas do Escorpionismo

Os sintomas provocados pelo envenenamento escorpiônico são variáveis devido à diversidade de sistemas do organismo em que a toxina estabelece seus efeitos. As manifestações clínicas podem ser divididas em locais e sistêmicas. As manifestações locais são caracterizadas pelo predomínio de dor no local da picada podendo evoluir com parestesias e irradiação da dor. As manifestações sistêmicas são caracterizadas por náuseas, vômitos, sialorréia, hipo ou hipertermia, sudorese, dispnéia, taquipnéia, edema agudo, agitação, sonolência, confusão mental, taquicardia e/ou bradicardia, hipo ou hipertensão arterial, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca e choque. As alterações cardíacas são caracterizadas por alterações em eletrocardiograma sugestivas de miocardite e/ou infarto e aumento dos níveis no soro das enzimas creatinoquinase (CK), lactatodesidrogenase (LD) e suas frações cardíacas CK-MB e LD₁ (CUPO et al., 1994), (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001), (GUERON et al., 1992). Estudos demonstraram que horas após o envenenamento houve um aumento, no soro dos pacientes, de troponina I, proteína essencial para contração do músculo cardíaco e da musculatura estriada esquelética, que é dosada como marcador específico de lesão cardíaca. As lesões cardíacas provocadas pelo envenenamento escorpiônico são reversíveis, na maioria das vezes, dentro da primeira semana após o acidente, sugerindo que tais lesões são causadas pela descarga adrenérgica aguda que ocorre nos casos de envenenamento mais severos. (CUPO et al., 2002), (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Classificação do Escorpionismo

De acordo com as manifestações clínicas, os casos de acidentes escorpiônicos podem ser classificados como leves, moderados e graves. Nos casos leves a dor no local da picada está presente em praticamente todos os casos, o que leva o paciente a procurar o serviço médico o mais breve possível e, em alguns casos a dor pode vir acompanhada de parestesia. Nos casos moderados a dor no local também é presente, acompanhada de manifestações sistêmicas mais brandas como sudorese, náuseas, vômitos, taquicardia, taquipnéia e hipertensão arterial. Nos casos graves as manifestações sistêmicas estão presentes em maior intensidade como vômitos profusos e freqüentes, sudorese profusa, períodos de agitação alternados com sonolência, hipotermia, taqui ou bradicardia, hipertensão arterial, taquipnéia, edema agudo pulmonar e choque cardiocirculatório. (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001), (CUPO et al., 2003).

A gravidade do quadro clínico apresentado após o acidente escorpiônico está relacionada com a idade do paciente, o tempo entre a picada e o atendimento médico, o local da picada, os níveis de veneno presentes no soro da vítima e a sensibilidade individual em resposta ao veneno. (CUPO et al., 2002). Estudos mostraram que pacientes que chegam ao hospital com manifestações sistêmicas de envenenamento por *T. serrulatus* apresentam altas concentrações de veneno no plasma, em relação aos pacientes que apresentaram apenas dor no local da picada. Isto sugere que a gravidade do acidente escorpiônico por *T. serrulatus* está relacionado com as concentrações de veneno no plasma. (REZENDE et al., 1996).

Tratamento

Os pacientes vítimas de acidente escorpiônico devem receber tratamento o mais rápido possível. O tratamento consiste em combater os sintomas de envenenamento e dar suporte às condições vitais do paciente. O tratamento sintomático visa aliviar a dor por meio de

anestésicos sem vasoconstritor injetados no local da picada ou pelo uso de analgésicos. Nos casos de vômitos, a desidratação e distúrbios hidroeletrólíticos devem ser tratados de acordo com o caso, juntamente com o uso de anti-emético. O tratamento específico consiste na administração de soro antiescorpiônico (SAEEs) ou antiaracnídico (SAAr) aos pacientes que apresentarem formas graves ou moderadas. O soro deve ser administrado o mais rápido possível, por via endovenosa e na quantidade estipulada de acordo com a gravidade do acidente. (CUPO et al., 2003), (DEHESA-DÁVILA; POSSANI, 1994), (FREIRE-MAIA et al., 1994), (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Estudos mostraram que crianças vítimas de acidente escorpiônico que apresentaram manifestações adrenérgicas tiveram somente reações anafiláticas cutâneas após a terapia com antiveneno. Entretanto, aquelas que não apresentaram manifestações adrenérgicas tiveram reações anafiláticas severas após a terapia. Isto sugere que a liberação de catecolaminas provocada pelo veneno de *T. serrulatus* após a picada previne as reações anafiláticas imediatas que podem ocorrer após a terapia com antiveneno. (AMARAL, 1994)

A terapia com o antiveneno após o acidente escorpiônico mostrou-se eficiente quanto à redução dos níveis de veneno no soro, sendo que 1 hora após sua administração os antígenos do veneno circulante foram neutralizados. As manifestações tais como dor local e vômitos diminuíram logo após a terapia com o antiveneno, entretanto, alguns sinais e sintomas persistiram, isto porque o antiveneno não é capaz de neutralizar os antígenos do veneno que já estão ligados aos seus receptores nos canais de sódio. (REZENDE et al., 1995a), (REZENDE et al., 1998)

O Veneno

O veneno escorpiônico pode ser obtido por estimulação elétrica entre o quarto e o quinto segmento da cauda do animal (**figura 1**). As primeiras gotas de veneno são geralmente

transparentes, seguidas de gotas branco-leitosas e viscosas. O veneno puro não se dissolve completamente em água destilada nem em solução fisiológica, restando um fino precipitado que pode ser separado por centrifugação. Esta fração insolúvel não é tóxica, constituída por mucoproteínas e restos de membranas. A fração solúvel, e tóxica, do veneno escorpiônico é constituída por uma mistura de peptídeos básicos de baixo peso molecular, sais inorgânicos, lipídios e nucleotídeos. (BUCHERL, 1969), (SANTOS, 1994).

Diniz e Gonçalves (1960) demonstraram que o veneno de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* não apresenta atividade proteolítica, fosfolipásica, hemolítica, acetilcolinesterásica, e não consome fibrinogênio. Os autores demonstraram ainda que o veneno possui atividade hialuronidásica e aumenta a permeabilidade capilar possibilitando um aumento de sua toxicidade uma vez que a difusão e absorção do veneno é facilitada, e ainda, causa estimulação da musculatura lisa. Diniz et al. (1966) demonstraram que o veneno de *T. serrulatus* parece também conter um componente com ação nas fibras pós-ganglionares parasimpáticas, com efeito mediado por acetilcolina, sendo responsável por alguns dos sintomas observados na intoxicação. O veneno do escorpião *T. serrulatus* possui atividade neurotóxica, seus efeitos estão relacionados principalmente com a ação que exerce sobre os canais de sódio e potássio, sendo que não apresenta diferenças bioquímicas e farmacológicas quando coletados em regiões geográficas brasileiras distintas. (POSSANI et al., 1992)



Figura 1 - Extração do veneno de *T. serrulatus* por estimulação elétrica. Extração de veneno de *T. serrulatus* realizada no serpentário do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. A estimulação elétrica é realizada entre o quarto e quinto segmentos da cauda do animal e após a estimulação a gota de veneno é liberada.

Fracionamento do veneno de *T. serrulatus*

Gomez e Diniz (1966) realizaram separação parcial dos componentes tóxicos do veneno de *T. serrulatus* através de cromatografia em gel de filtração e resina de troca iônica. Em 1967, um dos componentes tóxicos do veneno de *T. serrulatus* foi parcialmente caracterizado e denominado tityustoxina (GOMEZ, 1967). Coutinho Netto (1975) fracionou o veneno de *T. serrulatus* com nova metodologia e caracterizou parcialmente o componente tóxico, denominando tityustoxina, como sendo uma proteína básica, contendo 61 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica, com peso molecular de 6995 e ponto isoelétrico de 8,25. Muitos outros pesquisadores fizeram uso de técnicas diversas para fracionar o veneno de *T. serrulatus*. Sampaio et al. (1983) isolaram e caracterizaram parcialmente cinco proteínas tóxicas do veneno do escorpião *T. serrulatus*. Arantes et al. (1992) demonstraram que a tityustoxina (GOMEZ) representa uma mistura de proteínas e a tityustoxina (COUTINHO NETTO) é um componente minoritário da tityustoxina (GOMEZ). Chávez-Olórtegui et al. (1994) fracionaram o veneno de *T. serrulatus* através de cromatografia de filtração em Sephadex G-50 e obtiveram cinco picos após leitura das frações, sendo que o terceiro e maior deles, apresentou atividade tóxica quando injetado em camundongos.

Detecção do veneno

O fracionamento do veneno de *T. serrulatus* e a caracterização de seus componentes tóxicos possibilitaram o desenvolvimento de métodos para detecção do veneno no soro de pacientes vítimas de acidente escorpiônico. Muitos trabalhos foram descritos sobre a quantificação de antígenos tóxicos de diversos animais peçonhentos pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Theakston et al. (1977) foram os pioneiros a descrever a detecção de veneno e anticorpo específico em pacientes que sofreram acidente

ofídico. Coulter et al. (1980) desenvolveram um ensaio imunoenzimático relativamente rápido para detecção do veneno de serpente. Barral-Neto et al. (1990) realizaram um ELISA tipo *sandwich* para detecção do veneno de *Bothrops jararaca* nos fluidos corpóreos de camundongos. Ensaios desenvolvidos para detecção de antígenos específicos das serpentes *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta* mostraram-se eficientes na detecção do antígeno circulante em paciente acidentalmente envenenados por uma das serpentes citadas (CHÁVEZ-OLORTÉGUI et al., 1993).

Rezende et al. (1995b) padronizaram a quantificação de antígenos tóxicos do veneno de *T. serrulatus* pela técnica de ELISA, desenvolvida por Chavez-Olortégui et al. (1994). Os autores quantificaram os antígenos tóxicos em pacientes que chegaram ao serviço de saúde após terem sofrido o acidente e que trouxeram os escorpiões sendo identificados como *T. serrulatus*. Observaram que o método foi eficiente na detecção de antígenos em paciente que apresentaram manifestações sistêmicas, entretanto não apresentou diferenças entre os pacientes que apresentaram somente dor no local da picada em relação aos pacientes do grupo controle.

Rezende et al. (1996) quantificaram antígenos tóxicos do veneno de *T. serrulatus*, presentes no soro de pacientes que sofreram acidente escorpiônico, pela técnica de ELISA e analisaram a relação da concentração de veneno no plasma com as manifestações do envenenamento. Os autores observaram que pacientes com manifestações sistêmicas de envenenamento apresentaram altos níveis de veneno, $15,07 \pm 2,67$ ng/ml. Já os pacientes com somente dor no local da picada apresentaram níveis baixos de veneno $2,14 \pm 0,75$ ng/ml, não havendo diferença significativa em relação aos pacientes do grupo controle ($1,23 \pm 0,23$ ng/ml). Estes dados sugerem que a gravidade do envenenamento escorpiônico por *T. serrulatus* está relacionada com as concentrações de veneno no plasma.

Krifi et al. (1998) desenvolveram um método pela técnica de ELISA para quantificar o veneno de dois escorpiões encontrados na África do Norte em pacientes envenenados e relacionaram os níveis de veneno detectado com os sintomas clínicos e a gravidade do envenenamento. Os níveis de veneno detectados foram de: $2,65 \pm 0,81$ ng/ml nos casos leves, $9,79 \pm 4,08$ ng/ml nos casos moderados e $21,7 \pm 6,51$ ng/ml nos casos graves.

A detecção da concentração de veneno no plasma pode ser utilizada para estudo da cinética de neutralização do veneno pelo antiveneno específico, racionalizando o uso do mesmo e poderia ajudar na confirmação diagnóstica de envenenamento por *T. serrulatus*. Como a técnica de ELISA descrita por Rezende et al., (1995b) levou aproximadamente 2 horas para ser concluída, o uso deste método para confirmação diagnóstica e classificação do quadro de envenenamento antes do início da soroterapia com antiveneno não seria possível, pois este tempo poderia ser fatal. Estudos mostraram que pacientes que sofreram acidente escorpiônico por *T. serrulatus* e receberam antiveneno específico tiveram os antígenos circulantes do veneno neutralizados. O antígeno do veneno presente no soro destes pacientes não pôde ser mais detectado após 1 hora da administração do antiveneno e este manteve seus níveis elevados por até 24 horas após sua administração (REZENDE et al., 1995a). Baseado nesses estudos sobre a quantificação do veneno de *T. serrulatus* e suas aplicações na terapêutica e investigação clínica, nos propusemos a desenvolver reagentes imunoquímicos para detecção de antígenos tóxicos do veneno de *T. serrulatus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo geral o desenvolvimento de reagentes imunológicos capazes de detectar antígenos tóxicos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* presente no soro de pacientes que sofreram acidente escorpiônico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Fracionar o veneno de *T. serrulatus* para obtenção da fração tóxica.
- 2- Purificar anticorpos contra o veneno total de *T. serrulatus* para detecção do veneno.
- 3- Isolar anticorpos anti-fração tóxica e preparar o conjugado imunoenzimático como reagente imunológico para detecção de antígenos tóxicos.
- 4- Padronizar o ensaio para detecção de antígenos tóxicos do veneno de *T. serrulatus*.
- 5- Verificar a presença de reação cruzada dos reagentes desenvolvidos com os soros de doadores cujo contato prévio com o veneno desconhecíamos ou que não tinham histórico de contato prévio com o veneno.
- 6- Avaliar a aplicabilidade dos reagentes desenvolvidos na detecção de antígenos tóxicos no soro de pacientes que sofreram acidente escorpiônico por *T. serrulatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus*

1.1- Obtenção do Veneno de *T. serrulatus*

O veneno de *T. serrulatus* foi gentilmente cedido pelo Serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O Serpentário está localizado no complexo do Biotério Central do Campus desta Universidade e é credenciado pelo IBAMA para funcionar como criadouro científico, destinando-se ao fornecimento de materiais biológicos para investigações nas áreas de toxicologia e herpetologia. A extração do veneno de *T. serrulatus* é feita por meio de estimulação elétrica de baixa voltagem entre o quarto e quinto segmento da cauda do animal e após a extração o veneno permanece em temperatura ambiente até que esteja totalmente seco por ventilação.

1.2- Fracionamento do veneno

O veneno de *T. serrulatus* foi fracionado de acordo com a técnica de cromatografia de filtração molecular descrita por Chavez-Olortegui et al. (1994), com algumas modificações. Amostra contendo 20mg do veneno de *T. serrulatus* foi diluído em tampão bicarbonato de amônio 5mM, centrifugado a 12.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5417 R). O sobrenadante foi coletado para realização da cromatografia. Para este procedimento, utilizamos uma coluna de filtração Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) de 0,9 cm por 78 cm. A amostra foi eluída em um fluxo de 40µL/min, ou 2,4 mL/h, com o mesmo tampão bicarbonato utilizado para diluir a amostra e equilibrar a coluna. A leitura foi registrada a 290 nm e frações de 0,88mL foram recolhidas. As frações relativas ao pico principal da leitura foram separadas e denominadas TstFG50. Posteriormente estas frações foram analisadas em SDS-PAGE.

1.3- Eletroforese - SDS-PAGE

A análise eletroforética das frações obtidas após cromatografia de filtração foi realizada utilizando equipamento BioRad, modelo Mini-Protean II Cell[®]. Alíquotas de cada fração do pico principal (P3) tiveram suas proteínas separadas em SDS-PAGE, utilizando um gel de separação a 15% de acrilamida / bisacrilamida (30:0,8), Tris-HCl 375mM pH 8,8 e SDS 0,1%, e um gel de concentração de 4% de acrilamida / bisacrilamida (30:0,8), Tris-HCl 125mM pH 6,8 e SDS 0,1%. As amostras protéicas foram separadas sob voltagem constante, de 100 V, por cerca de 2 horas a temperatura ambiente. Para visualização das bandas protéicas foi realizada uma coloração do gel por azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad, USA) 0,25% em etanol 45% / ácido acético glacial 9%, por 20 minutos, seguido por uma descoloração parcial, realizada por 3 ou 4 lavagens sucessivas do gel, com uma solução de ácido acético glacial 8%/ etanol 5%.

2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando-se os métodos de reagente para biureto e BRADFORD (1976). Na dosagem pelo método de reagente para biureto tubos de ensaio com 100 μ L da amostra ou BSA foram diluídos em 1000 μ L do reagente para biureto (0,15% sulfato de cobre, 0,6% tartarato de sódio, 3% hidróxido de sódio, 0,1% iodeto de potássio diluídos em água destilada), o material foi submetido a suave agitação e após 30 minutos a temperatura ambiente, foi determinada, espectrofotometricamente, a absorbância da amostra num comprimento de onda de 540nm (Beckman DU modificado por Incibrás). A curva padrão foi construída com BSA na faixa de 50 a 1000 μ g, a quantidade de BSA foi determinada por análise de aminoácidos, que indicou a presença de aproximadamente 15% de água na preparação comercial de BSA que utilizamos.

A dosagem de proteínas pelo método de BRADFORD (1976) foi realizada em uma placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, USA) na qual eram colocados 10µL da amostra diluída em salina ou do padrão protéico de soroalbumina bovino e adicionados 300µL do reagente Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad, USA). Após 5 minutos a temperatura ambiente era feita a leitura da absorbância das amostras a 595 nm em leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices).

3. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS TÓXICOS DO VENENO DE *T. serrulatus*

3.1- Purificação de anticorpos contra o veneno total de *Tityus serrulatus*

Para a obtenção de anticorpos a serem utilizados na preparação do *Kit* para detecção de veneno escorpiônico foram utilizadas ampolas de soro anti-escorpiônico provenientes do Instituto Butantan. As ampolas, contendo 5mL de uma solução de imunoglobulinas, fração F(ab')₂, foram obtidas do plasmas de cavalos hiperimunizados com uma mistura de venenos de escorpiões do gênero *Tityus*. Este soro é utilizado para realização de soroterapia em pacientes que sofreram envenenamento escorpiônico moderado ou grave e foi cedido pela Farmácia Central da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pois apresentava o prazo de validade expirado para o consumo humano.

3.2- Cromatografia de imunoafinidade

*- Ativação da resina e acoplamento das proteínas do veneno de *T. serrulatus**

A resina Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals) foi ativada com CDI (carbonildiimidazol), conforme descrito por Bethell et al. (1979), em coluna de 0,9 cm por 3,0 cm. A resina foi lavada seqüencialmente com acetona 25, 50, 75 e 100% respectivamente e

por fim com 1,4 dioxano. Em seguida o CDI foi adicionando à resina e mantido por 15 minutos sob agitação. A resina foi novamente lavada seqüencialmente com acetona 100, 75, 50 e 25% respectivamente e por fim com água destilada. Vinte miligramas do veneno total de *T. serrulatus* foram adicionados à resina e mantidos a 4° C *overnight*. Após este período, foi adicionada etanolamina 2M, mantida por 30 minutos e então equilibrada com salina.

- Cromatografia

A coluna foi utilizada para purificação de anticorpos antiveneno contidos no soro antiescorpiônico. Cada ampola de soro antiescorpiônico contendo 5mL era diluída para 15mL com salina 0,15M e dividida em três partes iguais com 5mL cada. A coluna de afinidade contendo o veneno de *T. serrulatus* foi equilibrada com salina 0,15M e, posteriormente, o soro antiescorpiônico diluído foi aplicado manualmente na coluna, em volumes fracionados de 1000µL. Os anticorpos específicos contra o veneno de *T. serrulatus*, e que se ligaram ao veneno presente na resina, foram eluídos com glicina 0,2M pH 2,8. A cada alíquota eluída foi adicionado Tris-HCl 1M pH 8,1 correspondendo a 10% do volume final, para neutralizar o pH das amostras, preservando assim as proteínas. Para detectar as frações que continham proteínas, 1 µL de cada amostra eluída foi pipetada em papel de filtro, coradas por azul de Coomassie R-250 0,25% e descoradas por ácido acético 7%. As amostras dos tubos correspondentes às alíquotas intensamente coradas, foram reunidas e dialisadas contra salina 0,15M.

3.3- Titulação dos anticorpos contra o veneno total de *T. serrulatus*

Para o ensaio foi utilizado placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, USA). Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus* nas diluições 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 e

1/5120, diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidos overnight a 4° C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 20 0,05%, a solução de lavagem, e a seguir bloqueada com 200µL/poço de PBS/Tween 20 0,05% / Molico 2%, solução de bloqueio, durante 1 hora a temperatura ambiente . Após o bloqueio, foi adicionado TstFG50 nas diluições 1/100, 1/300, 1/900, 1/2700 e 1/8100, em PBS/Tween 20 0,05% / Molico 0,25%, tampão Molico, e mantida a placa por 1 hora de incubação em estufa a 37° C. Em seguida, a placa era lavada com solução de lavagem e adicionados os anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase, 100µL/poço, diluído 1/4000 em tampão Molico. Estes anticorpos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui, da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, e foram denominados anticorpos conjugados padrão. A placa era lavada com solução de lavagem e revelada com a utilização de OPD (2,5mg/ml em ácido cítrico 0,1M, fosfato de sódio bibásico 0,2M e peróxido de hidrogênio 0,15%), 100µL/poço da solução, e lida à 490 nm em leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices).

3.4- Purificação de anticorpos anti-TstFG50 de *Tityus serrulatus*

*- Ativação da resina e acoplamento das proteínas de TstFG50 do veneno de *T. serrulatus**

A resina Sepharose CL-6B foi ativada com CDI conforme descrito acima, em coluna de 0,9 cm por 3,0 cm. Em seguida, a fração tóxica obtida do veneno de *T. serrulatus*, anteriormente fracionado, foi dialisada contra salina 0,15M, adicionada à resina e mantida a 4° C *overnight*. Após este período, foi adicionada etanolamina 2M e mantida por 1 hora.

- Cromatografia

Para a realização da cromatografia de imunoafinidade foram utilizadas ampolas de soro antiescorpiônico contendo 5mL cada. Cada ampola de soro antiescorpiônico utilizada era diluída para 15mL com salina 0,15M e dividida em três partes iguais com 5mL cada. A

coluna de afinidade contendo TstFG50 de *Tityus serrulatus* foi equilibrada com salina 0,15M, posteriormente o soro antiescorpiônico diluído foi aplicado manualmente na coluna e os anticorpos foram eluídos com glicina 0,2M pH 2,8. Em cada tubo contendo as amostras eluídas foi adicionado Tris-HCl 1M pH 8,1 correspondendo 10% do volume final. Alíquota de 1µL de cada amostra eluída foram pipetadas em papel de filtro e coradas por azul de Coomassie R-250 0,25% e descoradas por ácido acético 7%. As amostras que apresentavam coloração intensa após coloração em papel de filtro foram reunidas e dialisadas contra salina 0,15M.

3.5- Conjugação dos anticorpos anti-TstFG50 à peroxidase

Para conjugação dos anticorpos à peroxidase, 1,66mg desta enzima (SIGMA HRPO) tipo VI foi diluída em 0,333µL de uma solução de bicarbonato de sódio 0,3M pH 8,1. Em seguida, foi adicionado 0,033µL de fluordinitrobenzeno 1% em etanol absoluto e deixado por 1 hora em temperatura ambiente sob suave agitação. Logo após, 0,333µL de periodato de sódio 0,05M diluído em água destilada foi adicionado e por 30 minutos agitado suavemente em temperatura ambiente. 0,333µL de etileno glicol 0,16M diluído em água destilada foi adicionado e mantido por 1 hora sob agitação suave em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi aplicado em uma coluna de cromatografia Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals), de 0,9 cm por 25 cm, protegida da luz, e eluído com tampão bicarbonato de sódio 0,01M pH9,5 a temperatura ambiente. As amostras de coloração amarelada mais intensa foram recolhidas. Cerca de 1,5mg de proteína de anticorpo anti-TstFG50, dosadas pelo método de BRADFORD (1976) como descrito anteriormente, foi adicionada à solução eluída da coluna e a mistura foi agitada suavemente por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, 1,66mg de borohidreto também foi adicionado e deixado *overnight* à 4° C.

No dia seguinte, este material passou por duas etapas de cromatografia em coluna Sephadex G-25, eluído com PBS e recolhido. Em uma placa de microtitulação de 96 poços foi pipetado 1 μ L de cada amostra eluída com 100 μ L da solução de OPD, utilizada como solução reveladora no ELISA. As amostras positivas para a reação foram reunidas em membrana de diálise (Sigma, USA) e finalmente concentradas com polietilenoglicol (PEG), pela adição do mesmo sobre a membrana de diálise contendo o material.

- *Cromatografia de filtração em coluna Sephacryl S-300*

Para garantir a pureza do material, os anticorpos conjugados com peroxidase, foram aplicados em uma coluna de filtração Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals) de 0,9 cm por 83 cm. A coluna foi equilibrada com salina 0,15M, fluxo de 40 μ L/minutos e 1200 μ L da amostra foi aplicada na coluna e eluída em um fluxo de 45 μ L/min com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. Frações de 0,72mL foram recolhidas, 1 μ L de cada amostra foi pipetado em uma placa de 96 poços e adicionados 100 μ L de solução reveladora para ELISA. As amostras que apresentaram reação positiva foram divididas em quatro grupos para facilitar os testes de desempenho dos anticorpos conjugados.

3.6- Titulação dos anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase

Para o *coat* da placa foi utilizado anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus* na concentração 1:40, diluído em tampão carbonato pH 9,6 e mantido *overnight* a 4° C. A placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem, e a seguir bloqueada com a solução de bloqueio durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi adicionado 20ng/poço de TstFG50 diluído em tampão Molico e mantida a placa por 1 hora de incubação em estufa a 37° C. Em seguida, a placa era lavada com solução apropriada e adicionado separadamente os quatro grupos de anticorpos purificados anti-TstFG50 conjugado à

peroxidase, 100µL/poço, nas concentrações 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 diluídos em tampão Molico. A placa era lavada com solução de lavagem e revelada com a utilização de OPD, 100µL/poço da solução, e lida a 490 nm em leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices).

Por apresentarem valores semelhantes de titulação, os quatro grupos de anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase foram reunidos, tiveram seu volume reduzido com PEG, adicionado 30% de glicerol ao volume final da solução contendo os anticorpos. A titulação dos anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase, agora reunidos, foi repetida como descrito acima, agora nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200.

4. TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING DO VENENO TOTAL DE *T. serrulatus* COM ANTICORPO ANTI-TstFG50 CONJUGADO À PEROXIDASE

Para avaliar a especificidade do anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase, amostra contendo 1mg de veneno total de *T. serrulatus* foi submetida à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 15% a 70V, por cerca de 2 horas a temperatura ambiente. Após a realização da eletroforese, era feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, Amersham, UK) em tampão de transferência (Tris-HCl 25mM pH 8,3, glicina 192mM, metanol 10%), utilizando o equipamento da BioRad (Mini Trans-Blot®). A transferência foi feita sob voltagem constante de 100 V por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau S 0,5% em ácido acético 1% para visualização das proteínas transferidas e, então, a membrana foi cortada em cinco tiras de igual tamanho. O corante foi removido das tiras da membrana com lavagens sucessivas em água destilada e em seguida, bloqueadas durante 1 hora com molico desnatado 5% em PSB/Tween 20 0,05% e lavadas com PBS/Tween 20 0,05%. Cada tira da membrana foi incubada por 2 horas com anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase nas diluições

1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600, lavadas com PBS/Tween 20 0,05%, lavadas com PBS, incubadas com solução reveladora (DAB 0,5mg/mL em Tris-HCl 0,05M pH 7,4 com H₂O₂ 0,06%) e parada a reação com água destilada.

Para obter melhor visualização das bandas protéicas, as tiras da membrana de nitrocelulose foram incubadas por 1 hora com anticorpo de coelho anti-cavalo, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Eduardo Brandt Oliveira, diluído 1:20, lavadas com PBS/Tween 20 0,05%, incubadas por 30 minutos com anticorpo de carneiro anti-coelho conjugado à peroxidase, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Eduardo Brandt Oliveira, diluído 1:4000, lavadas com PBS/Tween 20 0,05%, lavadas com PBS, incubadas com solução reveladora (DAB/ H₂O₂) e parada a reação com água destilada.

5. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO: ELISA TIPO SANDWICH

Para a padronização do ensaio foi utilizada placa de 96, utilizando como *coat* os anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus*, na concentração 1:20, 4 µg/poço de proteína, dosadas pelo método de reagente para biureto como descrito anteriormente. Estes anticorpos foram diluídos em tampão carbonato pH 9,6 num volume final de 100µL/poço, e mantida *overnight* à 4° C. A placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem e a seguir bloqueada com solução apropriada durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a placa era novamente lavada por 3 vezes com solução de lavagem e então, adicionávamos 100µL/poço de TstFG50 na concentração de 20ng/poço, preparados em tampão Molico. A fração tóxica também teve suas proteínas dosadas pelo método de reagente para biureto. Após 1 hora de incubação em estufa a 37° C, a placa passava por mais 3 lavagens com o tampão apropriado, e então adicionava-se 100µL/poço do anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase, diluído 1:150, e assim a placa passava por um novo período de incubação, agora de 2 horas em estufa a 37° C. A placa foi lavada com a solução de lavagem por 3 vezes e

então a revelação foi efetuada com a utilização de OPD. A reação foi parada após 15 minutos com a adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico 2M. A placa foi lida em leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices) a 490 nm.

6. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS PURIFICADOS EM SORO HUMANO

Para avaliar a especificidade dos anticorpos purificados e a reprodutibilidade dos resultados para montagem do *Kit* de detecção de veneno escorpiônico, utilizamos o soro de 2 doadores que não tinham histórico de contato prévio com veneno de escorpião e de 94 doadores cujo histórico de contato prévio com o veneno desconhecíamos. Os soros destes doadores foram utilizados para realização de ELISA tipo *sandwich*, como padronizado acima. O soro dos doadores foi diluído (1:1) em tampão Molico, num total de 100 μ L/poço.

Para avaliar a quantia de veneno de *T. serrulatus* em pacientes que sabidamente tiveram contato prévio com veneno de escorpião, amostras de soro armazenadas, a -20° C, de pacientes atendidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP picados pelo escorpião *T. serrulatus*, classificados como casos moderados, graves ou aqueles que desconhecíamos a classificação do caso no momento do acidente, foram gentilmente cedidos para este experimento pela Profa. Dr. Palmira Cupo. Estes soros foram utilizados para realização de ELISA tipo *sandwich*, como padronizado acima. O soro dos pacientes foi diluído (1:1) em tampão Molico, num total de 100 μ L/poço. A curva de referência foi obtida utilizando quantias conhecidas de TstFG50 (0,1 a 100ng/poço).

RESULTADOS

Fracionamento do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

Para obter a fração tóxica do veneno de *T. serrulatus*, realizamos a purificação a partir de 20mg de veneno que foram diluídos em tampão bicarbonato de amônio 5mM e aplicados em uma coluna de filtração Sephadex G-50. Como podemos observar na **Figura 2**, após a leitura das frações em 290 nm obtínhamos 5 picos, sendo que o terceiro e maior deles foi descrito por Chávez-Olórtegui et al. (1994) como o que continha a maior atividade tóxica do veneno de *T. serrulatus*.

Perfil eletroforético das proteínas correspondentes ao pico principal da cromatografia de filtração em Sephadex G-50

As frações correspondentes ao pico principal, pico 3, da cromatografia de filtração foram analisadas por SDS-PAGE. Como podemos observar na **figura 3**, as referidas frações, canaletas 2 a 7, apresentam o predomínio de uma única banda com peso molecular entre 5000 – 6500. O veneno total, na canaleta 1, apresenta uma banda mais intensamente corada, que se encontra na mesma altura do peso molecular das frações do pico 3.

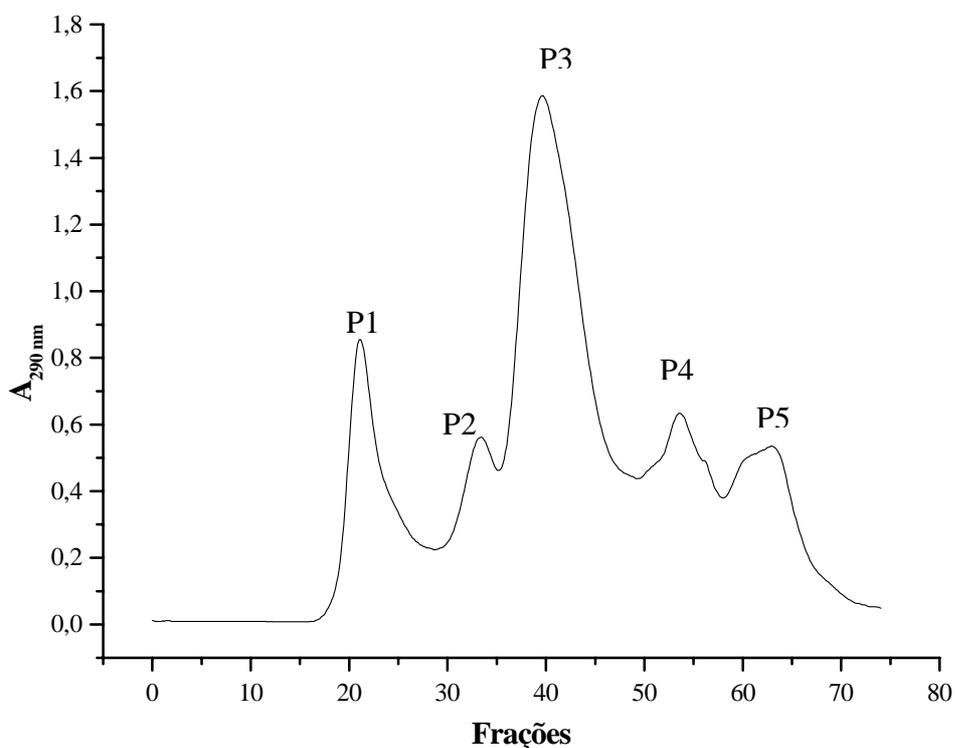


Figura 2 - Cromatografia de filtração molecular em Sephadex G-50 do veneno total de *T. serrulatus*. Uma amostra do veneno total contendo 20mg foi aplicada em uma coluna de filtração molecular Sephadex G-50, de 0,9 cm por 78 cm, previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 5mM. As amostras foram eluídas com o mesmo tampão, com fluxo de 40 μ L/min e frações com 0,88mL cada, num total de 80 frações. O conteúdo de proteína nas frações foi estimado por leituras de A_{290 nm}. Os cinco picos de proteína majoritários estão indicados como P1-P5.

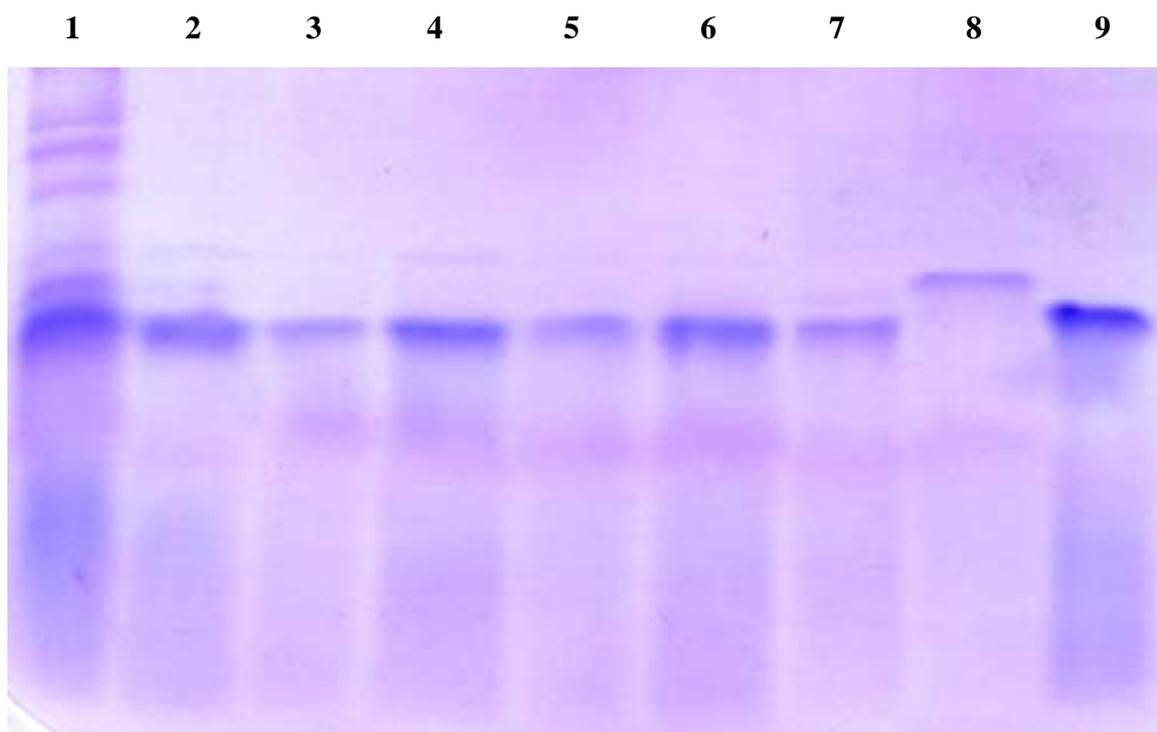


Figura 3 - Perfil eletroforético das frações correspondentes ao pico 3 da cromatografia de filtração em Sephadex G-50. Alíquotas de cada fração correspondente ao pico 3 foram solubilizadas em tampão da amostra e aplicadas em SDS-PAGE 15% nas canaletas 2 a 7. Na canaleta 1 foi aplicado o veneno total e nas canaletas 8 e 9 aprotinina (6,5 kDa) e crotamina (5 kDa), respectivamente. O gel foi corado por azul de Coomassie 0,25%.

Titulação dos anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus* para o *coat* da placa em ensaio ELISA tipo *sandwich*

Para avaliar a melhor diluição dos anticorpos purificados por cromatografia de imunoafinidade contra o veneno total de *T. serrulatus*, realizamos um ELISA tipo *sandwich* para titular os anticorpos. Esses anticorpos foram utilizados para o *coat* da placa nas diluições 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 e 1/5120 em tampão carbonato pH 9,6; após o bloqueio e lavagem, foi adicionado TstFG50 nas diluições 1/100, 1/300, 1/900, 1/2700 e 1/8100 em tampão Molico e lavada novamente. Em seguida, foram adicionados os anticorpos conjugados padrão na diluição 1/4000. A placa foi revelada com OPD e lida a 490 nm. À medida que a diluição dos anticorpos do *coat* diminui, a absorbância aumenta, ou seja, há um crescente aumento nos valores de absorbância quando a diluição dos anticorpos do *coat* é menor e também quando diminuimos a diluição de TstFG50, atingindo uma leitura próxima de 0,9 (**Figura 4**).

Titulação dos anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase por ELISA tipo *sandwich*

As amostras dos anticorpos conjugados à peroxidase, que foram reativas à solução reveladora de ELISA, estavam divididas em quatro grupos para facilitar os testes de desempenho. Os anticorpos conjugados destes quatro grupos foram titulados por ELISA, para o *coat* da placa utilizamos anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus* diluído 1/40 em tampão carbonato pH 9,6. A placa foi bloqueada, lavada e adicionado TstFG50 diluído 1/100 em tampão Molico. Após lavagem, os quatro grupos de anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase foram adicionados nas diluições 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600 em tampão Molico. A placa foi revelada com OPD e lida a 490 nm. Como podemos observar na **figura 5**, os quatro grupos de anticorpos anti-TstFG50

conjugados à peroxidase apresentaram titulação semelhante, ou seja, as leituras de absorvância foram aumentando gradativamente à medida que se diminuía a diluição do anticorpo conjugado e isso foi observado nos quatro grupos. Na diluição 1/25 os quatro grupos apresentaram leituras próximas de 0,9. Assim, tendo em vista que os anticorpos conjugados dos quatro grupos apresentaram titulação muito semelhante, reunimos os quatro grupos, reduzimos o volume com PEG e realizamos um novo ELISA tipo *sandwich* para avaliar qual seria a melhor diluição do anticorpo conjugado. Para este ensaio, utilizamos anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus* diluído 1/40 em tampão carbonato pH 9,6. A placa foi bloqueada, lavada e adicionado TstFG50 diluído 1/100 em tampão Molico. Após a lavagem, foram adicionados anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase nas diluições 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200 em tampão Molico. A placa foi revelada com OPD e lida a 490 nm. Podemos observar na **figura 6** que os anticorpos anti-TstFG50 conjugados com peroxidase apresentaram valores crescentes de leitura de absorvância de acordo com a diminuição da diluição. Na menor diluição, 1/100, a absorvância a 490 nm foi próxima de 0,65.

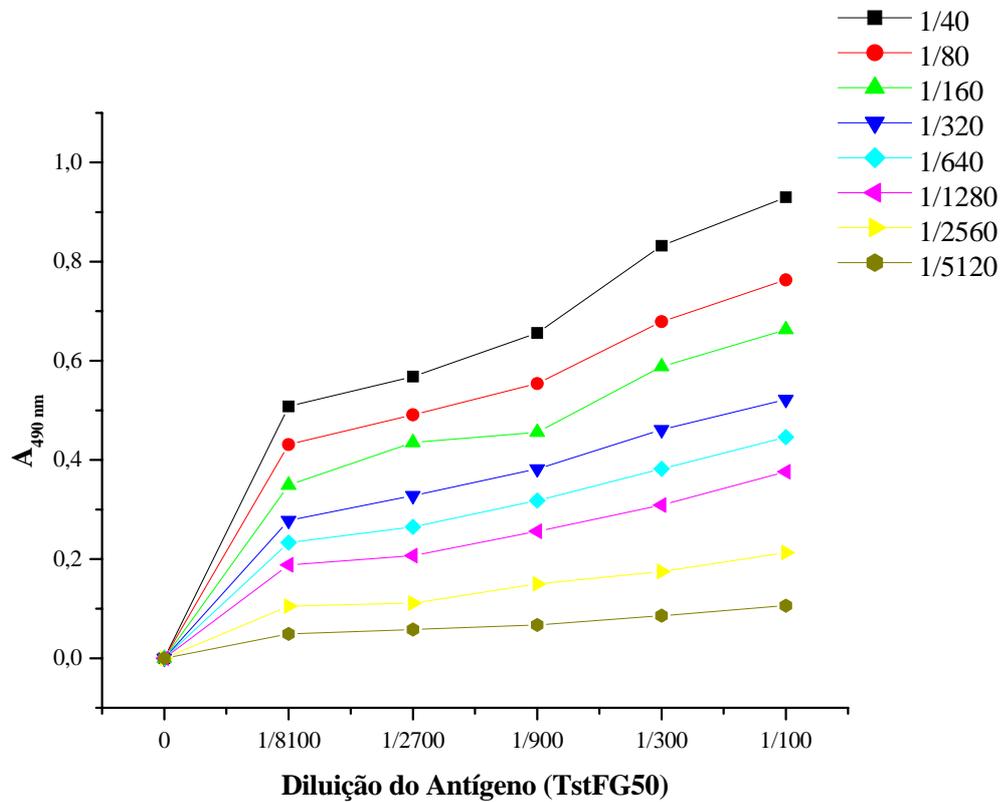


Figura 4 - Titulação dos anticorpos purificados contra o veneno total de *T. serrulatus* para o coat da placa. Os anticorpos foram purificados por cromatografia de imunoafinidade e utilizados para o coat do ELISA. Para o ensaio, estes anticorpos foram diluídos em 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 e 1/5120. O antígeno, TstFG50, também foi diluído em 1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100. A placa foi lavada e adicionado o anticorpo conjugado padrão. A placa foi revelada com o- fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa foram descontados (Branco: 0,036).

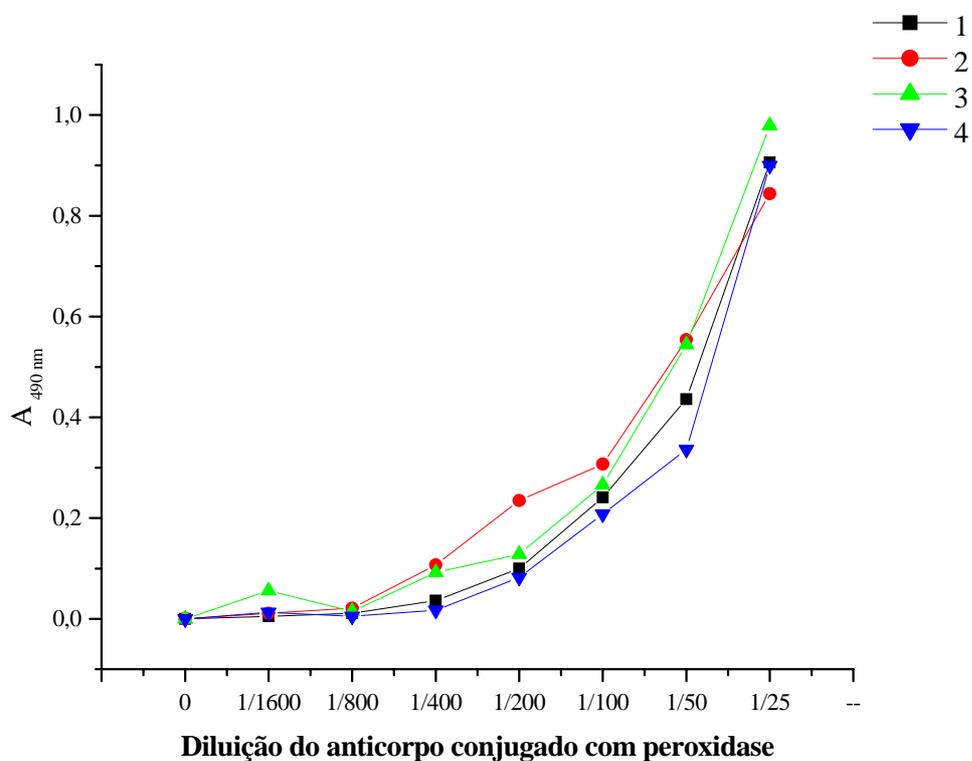


Figura 5 - Titulação dos quatro grupos de anticorpos purificados contra TstFG50 conjugados com peroxidase. Os anticorpos anti-TstFG50 foram purificados por cromatografia de imunoafinidade e conjugados com peroxidase e titulados por ELISA, conforme descrito em material e métodos. Anticorpos para o *coat* da placa foram utilizados na diluição 1/40 e TstFG50 na diluição 1/100. Os quatro grupos de anticorpos conjugados foram titulados nas seguintes diluições: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600. A placa foi revelada com o- fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa foram descontados (Branco: 0,038).

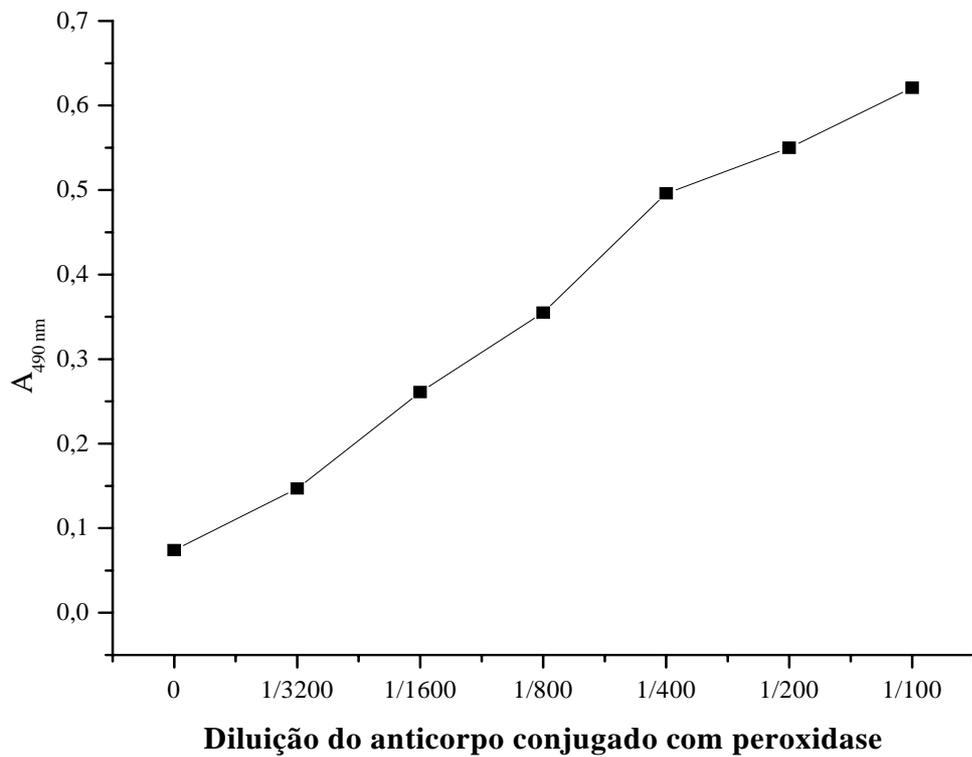


Figura 6 - Titulação dos anticorpos purificados contra TstFG50 conjugados com peroxidase após a reunião dos quatro grupos. Anticorpos contra o veneno total foram utilizados para o *coat* da placa na diluição 1/40 e TstFG50 na diluição 1/100. Os anticorpos conjugados foram titulados nas seguintes diluições: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200. A placa foi revelada com o- fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa não foram descontados (Branco: 0,04).

Western blotting do veneno total de *T. serrulatus* com anticorpo anti-TstTG50 conjugado à peroxidase

Com o objetivo de avaliar a especificidade dos anticorpos purificados anti-TstFG50 conjugados à peroxidase, amostra de 1mg de veneno total de *T. serrulatus* foi diluída em tampão da amostra e aplicada em toda a extensão do gel a 15 % e corrida a 70 V por 2 horas. Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 30 minutos a 100 V, bloqueada e cortada em 5 tiras. Cada tira foi incubada individualmente com o anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase nas diluições 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600 e reveladas com DAB/H₂O₂. Para intensificar a coloração das bandas e garantir uma melhor visualização, as tiras foram incubadas por 1 hora com anticorpo de coelho anti-cavalo diluído 1/20, adicionado o anticorpo de carneiro anti-coelho conjugado à peroxidase diluído 1/4000, incubadas por 30 min e reveladas com DAB/ H₂O₂.

Como pode ser visto na **figura 7**, uma banda difusa, não nítida e de coloração fraca, indicada pela seta, está presente nas tiras 1 e 2 que correspondem às diluições 1/100 e 1/200 do anticorpo conjugado, respectivamente. Esta banda indica que o reconhecimento, pelo anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase, das proteínas presentes na amostra contendo o veneno total de *T. serrulatus* não foi satisfatório, uma vez que deveria reconhecer a fração tóxica do veneno. A banda não pode ser visualizada nas tiras 3, 4 e 5, diluições 1/400, 1/800 e 1/1600 respectivamente. Assim, descartamos o uso destas três diluições para os ensaios realizados para padronização de nossos experimentos.

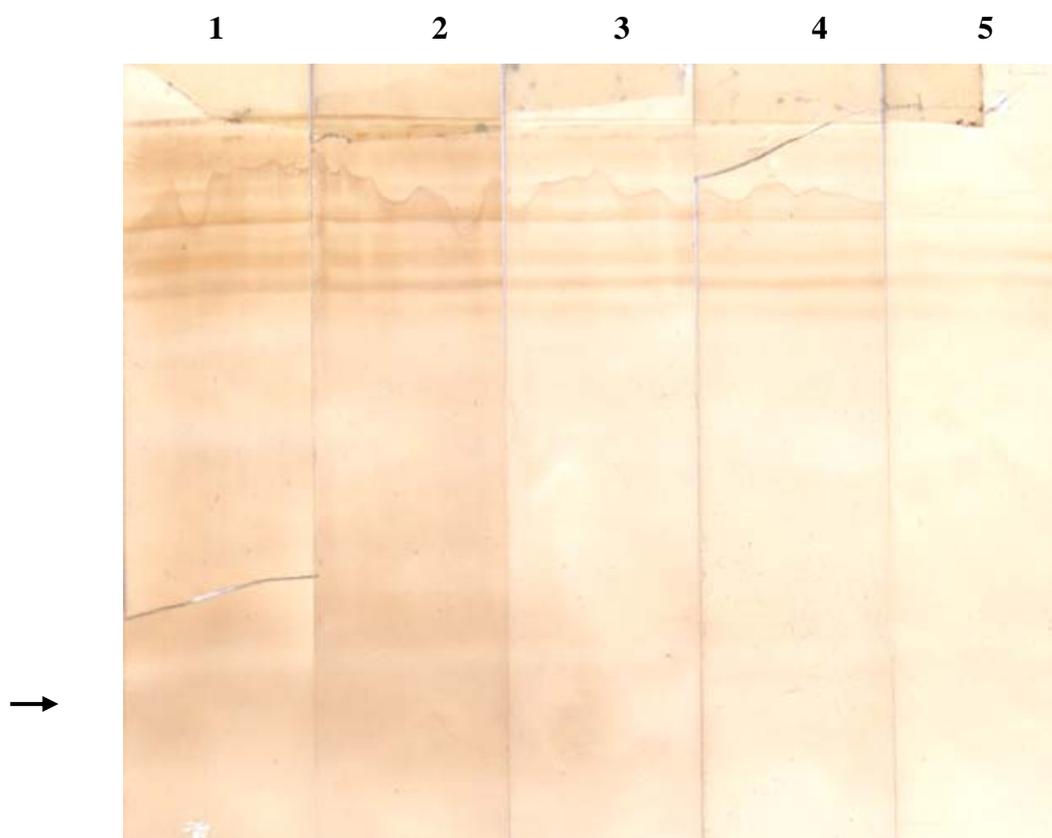


Figura 7 - Western blotting do veneno total revelado com anticorpo anti-TstTG50 conjugado à peroxidase. Uma amostra única, contendo 1mg de veneno total foi diluída em tampão da amostra, aplicada em toda extensão do SDS-PAGE 15% sem canaletas, corrida à 70 V por 2 horas e transferida para membrana de nitrocelulose por 30 minutos a 100V. A membrana foi cortada em cinco tiras que foram bloqueadas por 1 hora e incubadas individualmente por 1 hora com anticorpo anti-TstFG50 conjugado nas seguintes diluições: 1/100 (1), 1/200 (2), 1/400 (3), 1/800 (4) e 1/1600 (5) e revelada com DAB/H₂O₂. Posteriormente, as tiras foram incubadas por 1 hora com anticorpo de coelho anti-cavalo diluído 1:20, incubadas por 30 minutos com anticorpo de carneiro anti-coelho conjugado à peroxidase diluído 1:4000 e reveladas com DAB/H₂O₂.

ELISA tipo *sandwich* para titulação do veneno de *T. serrulatus*

Para padronização do ensaio para detecção de antígenos específicos do veneno de *T. serrulatus*, anticorpos purificados contra o veneno total foram utilizados para o *coat* da placa na diluição 1/20 em tampão carbonato pH 9,6. Estes anticorpos tiveram suas proteínas dosadas pelo método de reagente para biureto, como descrito em material e métodos, sendo que a diluição 1/20 corresponde a 4,0µg/ poço. TstFG50 foi adicionado à placa nas concentrações de 0,1ng a 100ng. A placa foi lavada, incubada com os anticorpos específicos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase diluídos 1/150, revelada com OPD e lida a 490 nm. Como podemos observar na **figura 8**, houve um aumento de A_{490nm} proporcional ao aumento de antígeno específico na faixa de 0-10ng, indicando tanto o limite na quantidade máxima de antígeno que pode ser determinada nas condições estabelecidas neste ensaio de ELISA como sua capacidade de discriminação entre 1 e 10ng de TstFG50.

Análise dos soros de doadores normais para detecção de antígenos do veneno de *T. serrulatus* e reprodutibilidade dos resultados

Para avaliar a existência de reação cruzada entre proteínas do soro humano e antígenos do veneno de *T. serrulatus*, e avaliar a reprodutibilidade dos resultados, soros de dois doadores normais, cujos históricos não indicavam contato com o veneno de *T. serrulatus*, foram utilizados para realização de ELISA tipo *sandwich*. Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos purificados contra o veneno total diluído 1/20 em tampão carbonato pH 9,6. O soro de cada doador foi diluído 1:1 em tampão Molico e ensaiado 20 vezes, em paralelo, adicionando-se amostras idênticas em 20 poços. A placa foi lavada, adicionado o anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase diluído 1/150, revelada com OPD e lida a 490 nm. Na **figura 9** observamos que as 20 amostras de cada doador (■ doador 1, ● doador 2) apresentam valores de leitura próximos entre si, em torno de 0,05 a 0,08. Estes valores de

leitura são considerados baixos uma vez que o branco da placa foi de 0,068, ou seja, os valores das 20 amostras dos dois doadores foram próximas do valor do branco da placa. Isto sugere que os reagentes não estariam detectando antígenos presentes nos soros dos dois doadores normais.

Análise dos soros de doadores de uma amostra aleatória da população para detecção de antígenos do veneno de *T. serrulatus*

Para avaliar a presença de reação cruzada dos anticorpos purificados no reconhecimento de proteínas presentes no soro de doadores cujo histórico de contato prévio com o veneno de *T. serrulatus* desconhecíamos e determinar o limiar de reatividade, utilizamos soro de 94 doadores para a realização do ELISA tipo *sandwich*. Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos purificados contra o veneno total diluído 1/20 em tampão carbonato pH 9,6. O soro de cada doador foi diluído 1:1 em tampão Molico. A placa foi lavada, adicionado o anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase diluído 1/150, revelada com OPD e lida a 490 nm. Como podemos observar na **figura 10**, a média dos valores de absorbância foi de 0,09. Para calcular o limiar de reatividade (*cut-off*), utilizamos a média dos valores de leitura a 490 nm + 2 desvios padrão, obtendo o valor de 0,170, que corresponde aproximadamente a 0,85ng/ml. Entre as 94 amostras, apenas quatro apresentaram valores positivos, ou seja, com valor de leitura superior a 0,170, indicando uma especificidade de 96%.

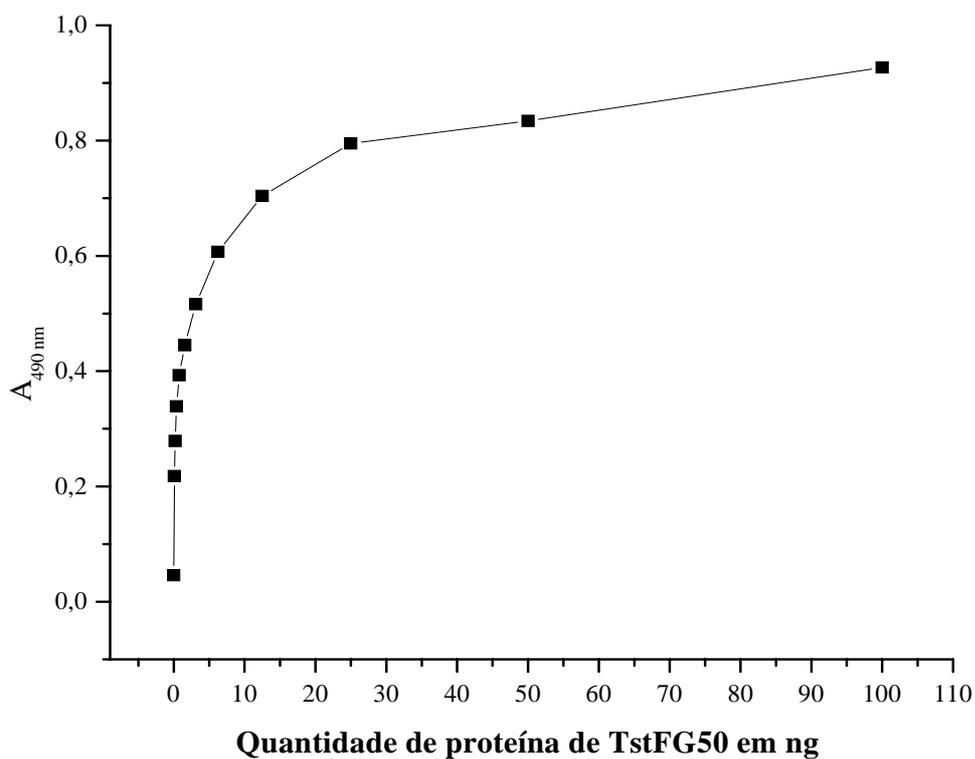


Figura 8 - ELISA tipo *sandwich* para titulação do veneno de *T. serrulatus*. Para padronização do ensaio foram utilizados anticorpos contra o veneno total de *T. serrulatus* para o *coat*, diluídos 1/20 em tampão bicarbonato pH 9,6. A placa foi incubada com TstFG50 nas concentrações: 0,1 ng a 100ng, lavada e adicionado os anticorpos anti-TstFG50 conjugados à peroxidase na diluição 1/150. A placa foi revelada com o- fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa não foram descontados (Branco: 0,046).

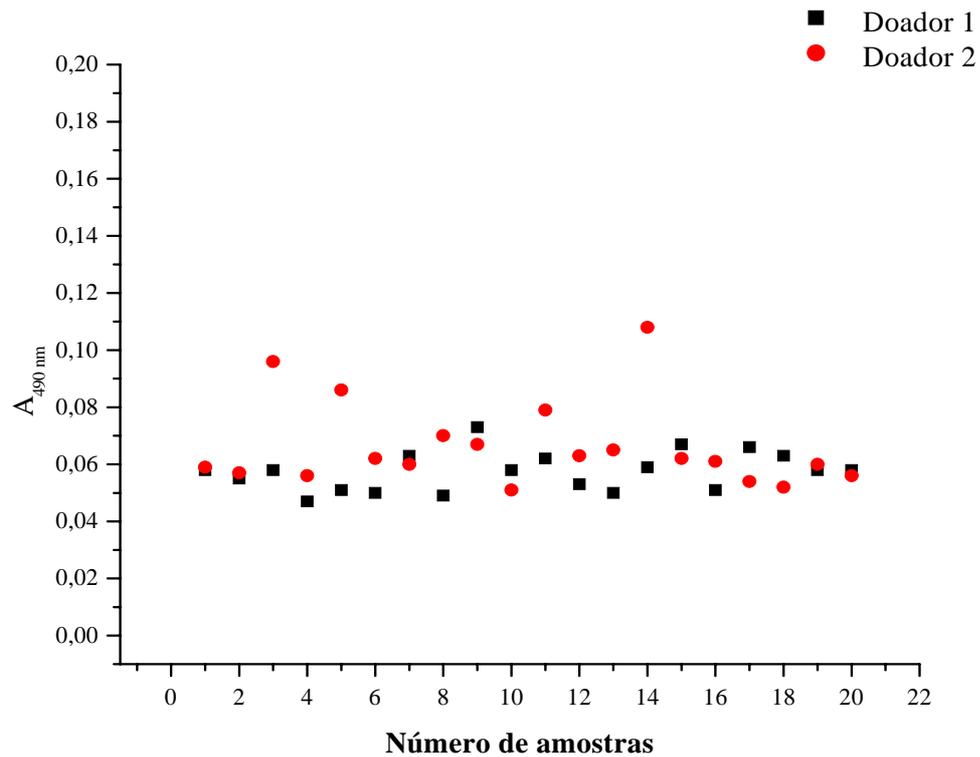


Figura 9 - Análise da reprodutibilidade dos soros de doadores normais para detecção de antígenos do veneno de *T. serrulatus*. Os soros de dois doadores que não tiveram contato prévio com veneno de *T. serrulatus* foram utilizados para a realização do ELISA. Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos contra o veneno total na diluição 1:20. O soro de cada doador foi ensaiado 20 vezes, em paralelo, adicionando-se amostras idênticas em 20 poços na diluição 1:1 em tampão Molico, a placa foi lavada e adicionado o anticorpo anti-TstFG50 na diluição 1:150. A placa foi revelada com o- fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa não foram descontados (branco da placa: 0,068).

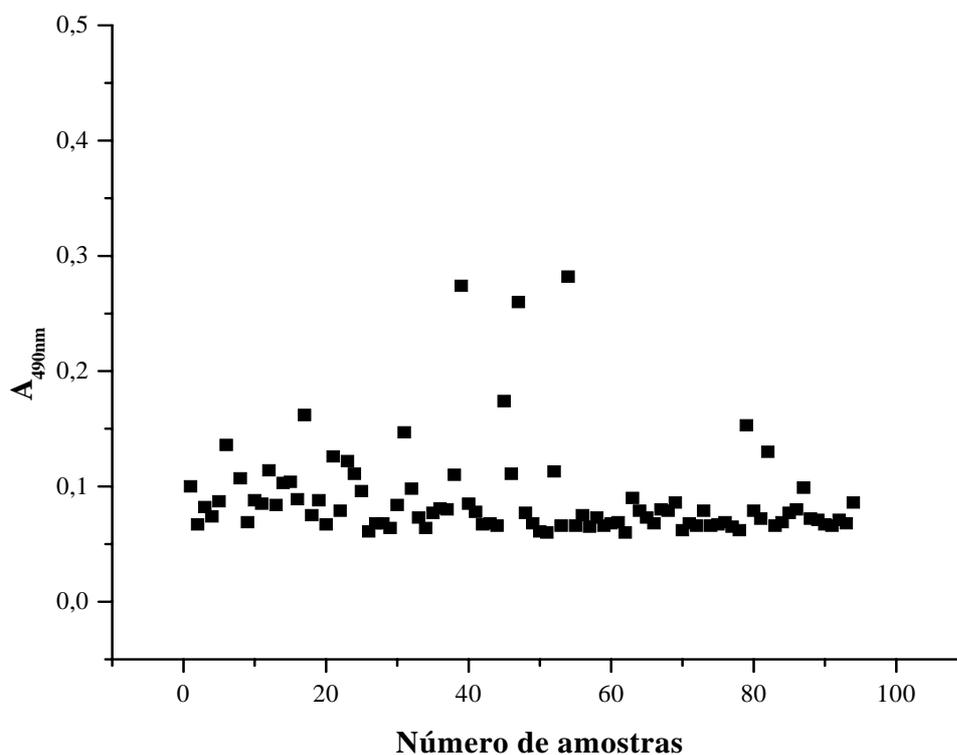


Figura 10 - Análise dos soros de doadores de uma amostra aleatória da população para detecção de antígenos do veneno de *T. serrulatus*. Os soros de 94 doadores que desconhecíamos o contato prévio com veneno de *T. serrulatus* foram utilizados para a realização do ELISA. Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos contra o veneno total na diluição 1:20. Os soros foram diluídos 1:1 em tampão Molico, a placa foi lavada e adicionado o anticorpo anti-TstFG50 na diluição 1:150. A placa foi revelada com o-fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa não foram descontados (branco da placa: 0,079).

Determinação da quantidade de veneno de *T. serrulatus* em soro humano

Para avaliar a aplicabilidade dos testes desenvolvidos com reagentes purificados para determinação das quantidades de veneno de *T. serrulatus* em soro humano, utilizamos soros que estavam estocados a -20°C de 20 pacientes que sabidamente tiveram contato com veneno de escorpião para realização de ELISA tipo *sandwich*. Estes pacientes foram atendidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP após terem sido picados pelo escorpião *T. serrulatus* e foram classificados como caso moderado ou grave. Entretanto, em algumas amostras, desconhecemos a classificação no momento do atendimento. Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos purificados contra o veneno total diluído 1/20 em tampão carbonato pH 9,6. Os soros dos pacientes foram diluídos 1:1 em tampão Molico e aplicados. A placa foi lavada, adicionado o anticorpo anti-TstFG50 conjugado à peroxidase diluído 1/150, revelada com OPD e lida a 490 nm. A curva de referência foi obtida utilizando quantias conhecidas de TstFG50 (0,1 a 100 ng/poço). Segundo os dados que acompanhavam os soros dos pacientes, as amostras 5, 8, 12 e 15 foram classificadas no momento do atendimento como caso moderado de acordo com as manifestações clínicas. Já as amostras 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 18, 19 e 20, foram classificadas como casos graves. As demais amostras desconhecemos a classificação do caso no momento do atendimento. Como pode ser visto na **figura 11**, as amostras 11, 14, 15, 17, 18, 19 e 20 apresentaram valores de leitura a 490 nm superiores a 0,170, ou seja, apresentaram valores acima do limiar de reatividade portanto mostraram-se positivas. A amostra 11 corresponde aproximadamente a uma concentração de TstFG50 de 1ng/ml, as amostras 14, 15 e 17 correspondem aproximadamente a 6ng/ml e as amostras 18, 19 e 20 correspondem aproximadamente a 2ng/ml. As amostras que não atingiram valores de leitura superiores ao limiar de reatividade não tiveram as concentrações de TstFG50 calculadas.

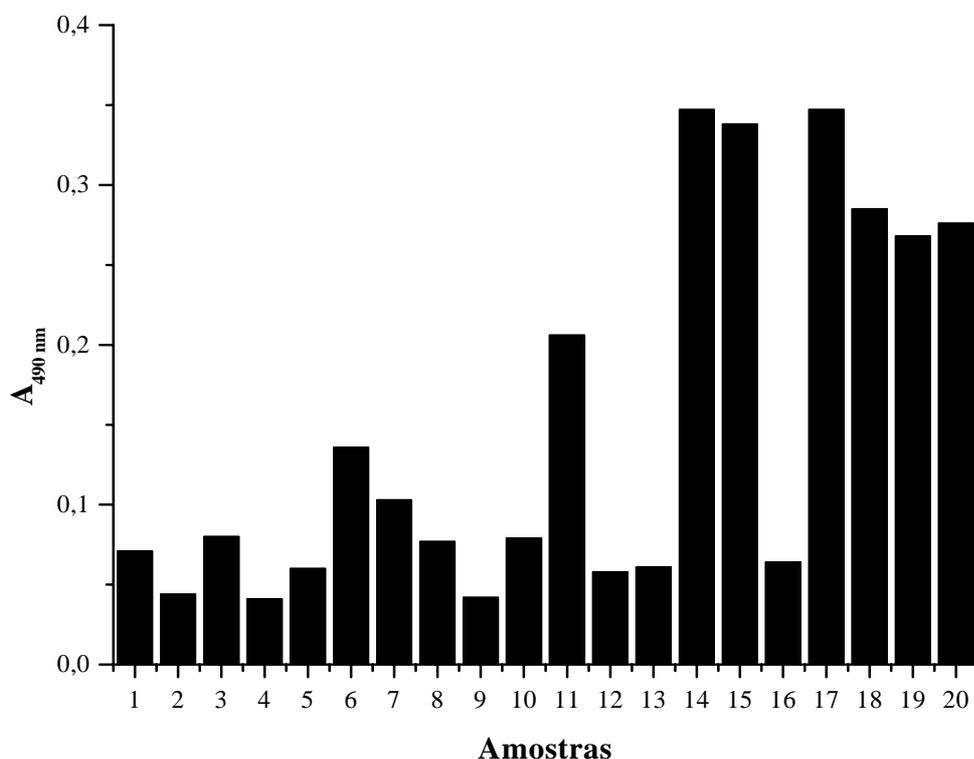


Figura 11 - Análise de soros de pacientes que sofreram acidente escorpiónico por *T. serrulatus*. Os soros de 20 pacientes que sofreram acidente escorpiónico por *T. serrulatus* foram utilizados para a realização do ELISA. Para o *coat* da placa foram utilizados anticorpos contra o veneno total na diluição 1:20. Os soros foram diluídos 1:1 em tampão Mólico, a placa foi lavada e adicionado o anticorpo anti-TstFG50 na diluição 1:150. A placa foi revelada com o- fenilenediamina e lida a 490 nm. Os valores do branco da placa não foram descontados (Branco: 1 a 10: 0,04; 11 a 20: 0,058).

DISCUSSÃO

Os acidentes causados por animais peçonhentos são considerados nocivos, podendo ser letais principalmente em crianças. As manifestações clínicas do envenenamento são complexas, podendo envolver manifestações locais e sistêmicas, provocando dor no local da picada, náuseas, vômitos, hipo ou hipertermia, confusão mental, irritabilidade, hipo ou hipertensão arterial, arritmias cardíacas, edema agudo pulmonar e até mesmo choque. Em virtude da gravidade do quadro clínico que pode se instalar, o tratamento deve ser iniciado imediatamente após a chegada do paciente ao serviço de saúde. O tratamento consiste em avaliar a sintomatologia e fornecer suporte às funções vitais do organismo com monitoramento contínuo do paciente e administração de antiveneno adequado quando o uso for indicado (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001), (FREIRE-MAIA et al.,1994), (ISMAIL, 1995).

Para o diagnóstico e encaminhamento do tratamento de pacientes acidentados por animais peçonhentos, são levadas em consideração principalmente as manifestações clínicas apresentadas. Para auxiliar nas condutas terapêuticas a serem tomadas, métodos imunoquímicos vêm sendo aplicados para identificação e quantificação do veneno circulante nos pacientes; alguns estudos mostraram que o emprego de tais métodos, como a técnica de ELISA, proporcionou o acompanhamento da cinética do veneno circulante durante a soroterapia e possibilitou correlacionar a quantidade de veneno circulante com as manifestações clínicas apresentadas. (SANTANA et al., 1996); (REZENDE et al., 1996).

O desenvolvimento da técnica de ELISA para quantificação do veneno circulante de animais peçonhentos teve início em 1977 com os relatos de Theakston et al. (1977) que monitoraram níveis de veneno e anti-veneno em camundongos submetidos a envenenamento e tratamento experimentais. Estudos posteriores mostraram o desenvolvimento de métodos para detecção do veneno de algumas espécies de serpentes e aranhas, além de escorpiões. Chávez-Olortegui et al. (1993) realizaram um estudo para identificar os antígenos circulantes

das espécies de serpentes *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta*, que provocam sintomatologia clínica similar, em pacientes que foram acidentalmente picados. Chávez-Olortegui et al. (1997) utilizaram a técnica para identificação de antígenos específicos das serpentes *Bothrops sp.* e *Crotalus durissus* em pacientes picados. Chávez-Olortegui et al. (1998) utilizaram este método para detecção de antígenos da aranha *Loxosceles intermedia*, discriminando corretamente entre diversos outros venenos também ensaiados. A detecção de antígenos do veneno escorpiônico foi inicialmente descrita por Chávez-Olortegui et al. (1994), que utilizaram a técnica de ELISA para detecção de antígenos no soro de pacientes picados pelo escorpião *Tityus serrulatus*; o método foi capaz de detectar os antígenos apenas nos pacientes que apresentaram manifestações clínicas classificadas como moderadas ou graves, não distinguindo os casos leves do controle (REZENDE, 1995b).

Além da quantificação dos antígenos de veneno circulantes, a técnica de ELISA possibilita a quantificação do antiveneno, permitindo acompanhar a eficácia do mesmo em neutralizar antígenos específicos e avaliar a cinética de eliminação do veneno. Rezende et al. (1995a) quantificaram os antígenos de *T. serrulatus* durante o tratamento com antiveneno específico na circulação de pacientes escorpiônicos, observando-se a diminuição dos antígenos 1 hora após a administração do antiveneno, sendo que os níveis deste persistiram elevados por até 24 horas após sua administração. Utilizando a técnica de ELISA, Santana et al. (1996) avaliaram os parâmetros farmacocinéticos do veneno de *T. serrulatus* em ratos, determinando a meia vida de eliminação, a taxa de absorção, a distribuição e a afinidade do veneno nos tecidos.

Neste trabalho, purificamos anticorpos para serem utilizados na detecção de antígenos tóxicos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e avaliamos seus desempenhos em reconhecer tais antígenos tanto purificados como presentes no soro de pacientes que foram picados por este escorpião.

Inicialmente, submetemos o veneno do escorpião *T. serrulatus* à cromatografia de filtração em Sephadex G-50 (**figura 2**) e obtivemos a fração correspondente com a maior atividade tóxica do veneno (TstFG50; no pico 3), conforme descrito por Chávez-Olortegui et al. (1994). As frações correspondentes às bordas do pico 3 poderiam estar contaminadas com substâncias provenientes das frações entre os picos 2-3 e 3-4, assim, estas frações foram excluídas para evitar possível contaminação do material utilizado. Análise das proteínas presentes no pico 3 da filtração em Sephadex G-50 por SDS-PAGE (**figura 3**) indicou que as bandas detectadas nas frações do pico 3 e a banda mais intensamente corada do veneno total apresentam-se um pouco abaixo da banda correspondente à aprotinina (6,5 kDa) e na mesma altura da banda correspondente à crotamina (5 kDa). Como descrito por Coutinho Netto (1975), a toxina do veneno escorpiônico é uma proteína básica, com peso molecular de 6995. O fato de as bandas referentes ao pico 3 estarem na mesma altura da crotamina poderia ser explicado pelo comportamento atípico que apresentam alguns polipeptídeos básicos e com pesos moleculares menores que 10.000, desnaturados em SDS (HAMES, 1981). Isto poderia ser amenizado ou até mesmo resolvido se tivéssemos realizado a separação eletroforética das proteínas na ausência de SDS. Desta forma, poderíamos observar se nosso material continha apenas uma proteína ou era composto por mais de uma, com pesos moleculares na faixa de 7.000. Além disso, se utilizássemos um método mais sensível para coloração do gel, como a prata, por exemplo, poderíamos verificar se haveria outras proteínas, em menor quantidade, presentes em nosso material. Na **figura 3**, podemos observar que a banda mais intensamente corada do veneno de *T. serrulatus* está na mesma altura das amostras referentes ao pico 3 da cromatografia em Sephadex G-50.

A purificação dos anticorpos utilizados para a obtenção dos reagentes para detecção do veneno de *T. serrulatus* foi iniciada com os anticorpos que foram utilizados para o *coat* da placa. Após a purificação destes anticorpos contra o veneno total de *T. serrulatus* por

cromatografia de imunoafinidade, titulamos os anticorpos e optamos em utilizar a diluição 1/20. Esta diluição foi escolhida para padronização dos ensaios uma vez que observamos no gráfico que a linha referente à diluição 1/40 ainda apresentava-se ascendente (**figura 4**).

Posteriormente, purificamos os anticorpos anti-TstFG50 por cromatografia de imunoafinidade, que foram conjugados à peroxidase. Para a escolha da diluição adequada do conjugado HRP-anti-TstFG50 para padronização dos ensaios e para avaliarmos o reconhecimento da fração tóxica do veneno por estes anticorpos, realizamos sua titulação na revelação de *western blotting* do veneno (**figura 7**). Pelo resultado de *western blotting* foi possível observar nas diluições 1/100 e 1/200 a presença de uma banda difusa, não nítida e de coloração fraca. Embora uma baixa qualidade dos anticorpos anti-TstFG-50 conjugados pudesse ser uma explicação para este resultado, é mais provável que ele reflita as dificuldades de certas proteínas pequenas e básicas em se fixar à membrana de nitrocelulose usada em *western blotting*, como amplamente discutido por Sadano (1991) no caso da PLA₂ do veneno de *C. durissus*, o componente básico da crotoxina de 14,5 kDa. No entanto, os anticorpos conjugados foram satisfatórios no reconhecimento da fração tóxica do veneno de *T. serrulatus* em ensaios de ELISA.

Na padronização do ensaio de ELISA, quantidades conhecidas de TstFG-50 foram utilizadas para calibrar os valores de antígenos detectados no soro. Para que fosse avaliada a reprodutibilidade dos resultados, o soro de 2 doadores que não tinham histórico de contato prévio com o veneno de *T. serrulatus* foram ensaiados por 20 vezes cada, em paralelo (**Figura 9**). Isto sugere que, apesar de haver possibilidade de contaminação durante o fracionamento do veneno para obtenção da fração correspondente à maior atividade tóxica do veneno, os anticorpos purificados apresentaram resultados que foram reprodutíveis. O soro de 94 doadores cujo histórico de contato prévio com o veneno de *T. serrulatus* desconhecíamos foi utilizado para determinarmos a especificidade do ensaio e o limiar de reatividade. O

ensaio padronizado tinha duração de aproximadamente 5 horas, apresentando especificidade de 96 % e limiar de reatividade (*cut-off*) com valor de leitura de 0,17 a 490 nm, que corresponde aproximadamente a 0,85ng/ml. Estudos anteriores, no qual os autores padronizaram um ELISA para detecção de antígenos tóxicos em pacientes picados por *T. serrulatus* foi verificado que a especificidade do ensaio foi de 97 % e a sensibilidade, quando considerados apenas os casos moderados e graves, foi de 94,7 %. O limiar de reatividade correspondia a 0,074 no valor de absorbância e 4,8ng/ml de concentração de veneno, sendo que o tempo necessário para a realização do ensaio foi de 2 horas (REZENDE et al., 1995b). Em nossos experimentos a duração de 5 horas de ensaio é muito longa, e não poderíamos utilizar estes testes para classificar os casos de acidentes escorpiônicos no momento da picada para posterior conduta terapêutica, pois os pacientes que apresentam casos moderados ou graves necessitam de intervenção imediata e 5 horas de espera poderiam comprometer a utilização do teste como auxiliar da soroterapia.

Amostras estocadas a -20° C de soro de 20 pacientes que foram atendidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP, após terem sido picados pelo escorpião *T. serrulatus*, foram utilizados para o ensaio. Estes pacientes foram classificados como casos moderados ou graves, sendo as amostras 5, 8, 12 e 15 casos moderados e as amostras, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 18, 19 e 20 casos graves. As demais amostras desconhecemos como foram classificadas no momento do atendimento. Somente as amostras 11, 14, 15, 17, 18, 19 e 20 apresentaram resultados positivos, ou seja, valores de leitura a 490 nm superior ao limiar de reatividade. As amostras 14, 15 e 17 classificadas, respectivamente, como caso grave, moderado e desconhecido foram as que apresentaram maiores leituras, correspondendo aproximadamente a 6ng/ml de TstFG50. As amostras 18, 19 e 20 classificadas como casos graves corresponderam aproximadamente a 2ng/ml de TstFG50. Já a

amostra 11, também classificada como caso grave, apresentou aproximadamente 1 ng/ml de TstFG50.

Estudos anteriores demonstraram que pacientes picados pelo escorpião *T. serrulatus*, com manifestações sistêmicas de envenenamento apresentaram níveis altos de veneno, detectados por ELISA, de $15,07 \pm 2,67$ ng/ml. Já os pacientes que apresentaram apenas dor no local da picada apresentaram níveis bem menores, $2,14 \pm 0,75$ ng/ml. Os pacientes que apresentaram apenas dor no local da picada não apresentaram níveis de veneno significativamente diferentes aos níveis detectados no grupo controle ($1,23 \pm 0,23$ ng/ml) (REZENDE, 1996). Krifi et al. (1998) demonstraram que pacientes que sofreram acidente escorpiônico apresentaram níveis séricos de veneno detectados nos casos leves de $2,65 \pm 0,81$ ng/ml, nos casos moderados foi detectado $9,79 \pm 4,08$ ng/ml de veneno e nos casos graves, $21,7 \pm 6,5$ ng/ml de veneno.

Nossos resultados quanto à dosagem de veneno em soro de pacientes mostraram-se bem menores em relação aos trabalhos citados. Embora não tenhamos uma explicação definitiva para esta discrepância nos resultados, para o que seria importante uma comparação direta dos reagentes utilizados em cada condição experimental, uma das possibilidades refere-se à qualidade do conjugado quanto à especificidade alcançada na etapa de purificação dos anticorpos por imunoafinidade, já que medidas de antígenos na circulação dos acidentados podem ser influenciadas pela biodisponibilidade individual de cada antígeno do veneno. Outra hipótese para os baixos níveis de veneno detectados no soro em nossos experimentos poderia ser pelo fato de que não tivemos a oportunidade de realizar nossos experimentos com soro fresco, ou seja, de pacientes que acabaram de sofrer o acidente escorpiônico. Os soros utilizados estavam estocados a -20° C, alguns deles há mais de 2 anos. Não é possível afirmar se durante a armazenagem destes soros o veneno de *T. serrulatus* não tenha sofrido alguma alteração imunoquímica que pudesse interferir na detecção de antígenos tóxicos presentes no

veneno. Além disso, os ensaios não puderam ser repetidos por muitas vezes devido ao volume reduzido de soro disponível, uma vez que só é possível utilizar as amostras que são coletadas dos pacientes picados antes que se inicie a terapia com antiveneno específico. Um ensaio utilizando soros frescos poderia esclarecer melhor estas dúvidas, entretanto o acesso a quantidades necessárias de soros frescos de pacientes que sofreram acidente escorpiónico moderado ou grave levaria algum tempo para ser conseguido. Além disso, seria necessária a coleta das amostras assim que os pacientes dessem entrada ao serviço de saúde, pois o tratamento deve ser iniciado o mais rapidamente possível e as amostras que podem ser utilizadas para este tipo de experimento são aquelas coletadas antes de iniciar a soroterapia com antiveneno específico.

Outro fato importante é que os soros dos pacientes que utilizamos em nossos experimentos tiveram os antígenos do veneno de *T. serrulatus* dosados apenas por nossos reagentes. Não foi possível a comparação direta dos nossos reagentes com outros já padronizados. Isto dificulta a comparação dos nossos resultados uma vez que não podemos afirmar se as baixas leituras foram devido aos reagentes desenvolvidos ou a alguma modificação que as amostras possam ter sofrido ao longo do armazenamento. Talvez se tivéssemos realizado os ensaios de soro dos pacientes picados fazendo uma comparação direta com reagentes já padronizados as leituras teriam apresentado o mesmo comportamento.

Através dos ensaios realizados no presente trabalho é possível afirmar que os reagentes desenvolvidos são capazes de detectar antígenos tóxicos do veneno de *T. serrulatus* que fracionamos. Entretanto, não é possível esclarecer se os reagentes que purificamos são capazes de detectar antígenos tóxicos presentes no soro de pacientes picados por *T. serrulatus*. Outros ensaios precisam ser realizados e uma das alternativas seria utilizar soro fresco de pacientes que sofreram acidente escorpiónico moderado ou grave. Além disso, ensaios comparativos deveriam ser feitos na tentativa de diminuir o tempo necessário para conclusão do ensaio, com redução dos tempos de

incubação dos soros diluídos dos pacientes e do anticorpo conjugado, sem que prejudique as reações necessárias para a obtenção de resultados satisfatórios.

Deste modo, sugerimos que o desenvolvimento de reagentes imunoquímicos para detectar antígenos tóxicos do veneno de animais peçonhentos é de extrema importância para que o tratamento com antiveneno específico seja feito de forma racionalizada e a cinética do veneno seja acompanhada. O aprimoramento das técnicas de detecção de antígenos tóxicos, a fim de diminuir o tempo necessário para realização do ensaio, poderia proporcionar a utilização de reagentes na forma de *kits* que pudessem fornecer a quantidade de veneno circulante num curto período de tempo e auxiliar na terapia com o antiveneno adequado, na quantidade apropriada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; VIEIRA, C. A. and GIGLIO, J. R. What is tityustoxin?

Toxicon, v. 30(7): p. 786-789, 1992.

AMARAL, C. F. S.; DIAS, M. B.; CAMPOLINA, D.; PROIETTI, F. A. and REZENDE, N.

A. Children with adrenergic manifestations of envenemation after *Tityus serrulatus* scorpion sting are protected from early anaphylactic antivenom reactions. **Toxicon**, v. 32(2): p. 211-215, 1994.

BARRAL-NETTO, M.; SCHRIEFER, A.; VINHAS, V. and ALMEIDA, A. R. Enzyme-

linked immunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 28(9): p. 1053-1061, 1990.

BETHELL, G. S.; AYERS, J. S.; HANCOCK, W. S. and HEARN, M. T. W. A novel method

of activation of cross-linked agaroses with 1,1'-carbonyldiimidazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups. **J. Biological Chemistry**, v. 254(8): p. 2572-2574, 1979.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72: p. 248-254, 1976.

BUCHERL, W. Escorpionismo no Brasil. **Mem. Inst. Butantan**, v. 34: p. 9-24, 1969.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; LOPES, C. S.; CORDEIRO, F. D.; GRANIER, C. and DINIZ, C. R. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms. **Toxicon**, v. 31(4): p. 417-425, 1993.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; FONSECA, S. C. G.; CAMPOLINA, D.; AMARAL, C. F. S. and DINIZ, C. R. ELISA for detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 32(12): p. 1649-1656, 1994.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; PENAFORTE C. L.; SILVA, R. R.; FERREIRA, A. P.; REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. and DINIZ, C. R. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of brazilian *Bothrops* species and *Crotalus durissus*. **Toxicon**, v. 35(2): p. 253-260, 1997.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; ZANETTI, V. C.; MINOZZO, J. C.; MANGILI, O. C. and GUBERT, I. C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, v. 36(4): p. 563-569, 1998.

COULTER, A. R.; HARRIS, R. D. and SUTHERLAND, S. K. Clinical laboratory: enzyme immunoassay for the rapid clinical identification of snake venom. **Med. J. Aust.**, v. 1(9): p. 433-435, 1980.

COUTINHO NETTO, J. **Purificação e caracterização parcial da *Tityus* toxina**. 1975. 112 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1975.

CRUZ, E.F.S. Biologia dos escorpiões. In: BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 1994. Cap. 10. p. 135-150.

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

CUPO, P. and HERING, S. E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 40: p. 823-830, 2002.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. and HERING, S. E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. and HADDAD JUNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 2003. Cap. 20. p. 198-208.

DEHESA-DÁVILA, M. and POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in México. **Toxicon**, v. 32(9): p. 1015-1018, 1994.

DINIZ, C. R. and GONÇALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 41: p. 470-477, 1960.

DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; ANTÔNIO, A. and CORRADO, A. P. Chemical properties and biological activity of *Tityus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33(2): p. 453-456, 1966.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. and AMARAL, C. F. S. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon**, v. 32(9): p. 1009-1014, 1994.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. Brasília: Ministério as Saúde, 120p., 2001.

GHALIM, N.; EL-HAFNY, B.; SEBTI, F.; HEIKEL, J.; LAZAR, N.; MOUSTANIR, R. and BENSLIMANE, A. Scorpion envenomation and serotherapy in morocco. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62(2): p. 277-283, 2000.

GOMEZ, M. V. and DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion – *Tityus serrulatus* – venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33(3): p. 899-902, 1966.

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

GUERON, M.; ILIA, R. and SOFER, S. The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. **Clinical Toxicology**, v. 30(2): p. 245-258, 1992.

HAMES, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford : c1981. Cap. 1. p. 1-91.

INSTITUTO BUTANTAN. Material Didático. Escorpiões, aranhas e lacraias. Disponível em:

<http://www.butantan.gov.br/materialdidatico/numero4/numero4.pdf>

Acessado em 27/07/2006

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon.**, v. 33(7): p. 825-858, 1995.

KRIFI, M. N.; KHARRAT, H.; ZGHAL, K.; ABDOULI, M.; ABROUG, F.; BOUCHOUCHA, S.; DELLAGI, K. and EL AYEB, M. Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. **Toxicon**, v. 36(6): p. 887-900, 1998.

POSSANI, L.D.; FLETCHER JUNIOR, P. L.; FLETCHER, M.; RODE, G. S.; MOCHCA-MORALES, J.; LUCAS, S.; CORONAS, F. V.; ALAGON, A. C. and MARTIN, B. M. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Mem. Inst. Butantan**, v. 54(2): p. 35-52, 1992.

REZENDE, N. A.; DIAS, M. B.; CAMPOLINA, D.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R. and AMARAL, C. F. S. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52(3): p. 277-280, 1995(a).

REZENDE, N. A.; DIAS, M. B.; CAMPOLINA, D.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. and AMARAL. C. F. S. Standardization of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting circulating toxic venom antigens in patients stung by the scorpion *Tityus serrulatus*. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 37(1): p. 71-74, 1995(b).

REZENDE, N. A.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. and AMARAL. C. F. S. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? **Toxicon**, v. 34(7): p. 820-823, 1996.

REZENDE, N. A.; AMARAL. C. F. S. and FREIRE-MAIA, L. Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. **Toxicon**, v. 36(11): p. 1507-1513, 1998.

SADANO, M. M. S. **Epitopos comuns aos da fosfolipase A2 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* entre proteínas heterofuncionais de venenos ofídicos.** 1991. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1991.

SAMPAIO, S. V.; LAURE, C. J. and GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 21(2): p. 265-277, 1983.

SANTANA, G. C.; FREIRE, A. C. T.; FERREIRA, A. P. L.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R. and FREIRE-MAIA, L. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. **Toxicon**, v. 34(9): p. 1063-1066, 1996.

SANTOS, W.F. Venenos escorpionídeos: bioquímica e farmacologia. In: BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada.** 1^a ed. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 1994. Cap. 10. p. 233-241.

THEAKSTON, R. D.; LLOYD-JONES, M. J. and REID, H. A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. **Lancet**, v. 2(8039):p. 639-614, 1977.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)