UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento, caracterização molecular e funcional de uma nova
toxina presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***

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

Orientado: *Felipe Augusto Cerni*

Orientadora: *Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes*

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 16/12/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Cerni, Felipe Augusto

Isolamento, caracterização molecular e funcional de uma nova toxina presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* Ribeirão Preto, 2016.

139p.: il. ; 30cm.

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

Orientador: Arantes, Eliane Candiani.

1. Escorpião. 2. *Tityus serrulatus*. 3. Toxina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Augusto Cerni

Isolamento, caracterização molecular e funcional de uma nova toxina presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título
de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.
Orientadora: Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais **Antônio e Maria de Lourdes**, pelo amor e incentivo.*

*À minha vó **Elza** (in memoriam).*

*Aos meus irmãos **Gustavo e Caroline**,
pelo amor e amizade.*

*À minha esposa **Manuela** que,
incondicionalmente, me ajudou na
concretização desse trabalho com
muita disposição e amor.*

Agradecimentos

À minha orientadora Eliane Candiani Arantes, pela oportunidade, confiança, amizade, e por todo conhecimento compartilhado.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado no Brasil (Processo Nº 2012/13590-8) e no exterior (BEPE Nº 2013/21342-7). Sem seu auxílio financeiro esse projeto não teria se concretizado.

Ao Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e, em especial à Rose.

Às funcionárias do Laboratório de Toxina Animais, Karla e Iara, por toda a ajuda técnica no laboratório.

Aos meus amigos do laboratório de Toxina Animais pela amizade ao longo desse período.

Aos integrantes do laboratório de toxicologia da Universidade Católica de Leuven (KU Leuven, Bélgica), em especial ao professor Jan Tytgat pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e ao técnico Steve pelo apoio durante o período de doutorado sanduíche.

Aos colaboradores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, professores Thiago M. Cunha e José Carlos Filho (Zeca), técnica Ieda e ao aluno Douglas.

Aos colaboradores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial a doutora Karina F. Zoccal e à professora Fabiane.

À minha família pelo incentivo, compreensão e carinho.

Em especial a minha esposa Manuela B. Pucca, pelo apoio científico e emocional que foram a base do sucesso desse trabalho.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazeres se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade”

Paulo Freire

RESUMO

Cerni, F.A. **Isolamento, caracterização molecular e funcional de uma nova toxina presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. 2016. 139f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O escorpião *Tityus serrulatus* (Ts) é o responsável pela maioria dos casos de envenenamento escorpiônicos do Brasil. Embora sua peçonha seja constituída de inúmeros componentes, as neurotoxinas apresentam maior relevância por interagirem especificamente com canais para sódio (Nav) ou potássio (Kv) dependentes de voltagem. Até o momento, já foram descritas 20 neurotoxinas (Ts1 → Ts20) na peçonha do Ts. No entanto, através de análises ômicas, estima-se que este número seja bem superior. Toxinas que interagem seletivamente com canais iônicos são utilizadas como ferramentas farmacológicas, pois permitem a identificação de canais específicos e a determinação de seus papéis fisiológicos. Adicionalmente, estas toxinas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos medicamentos para tratar doenças relacionadas a canais iônicos. Considerando o elevado potencial biotecnológico desta classe de moléculas, o presente trabalho isolou (através de 3 etapas cromatográficas) e caracterizou uma nova toxina da peçonha de Ts, denominada Ts19 Frag-II. A nova toxina demonstrou possuir 49 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 5534,54012 Da. Classificada como β -KTx, especula-se que a Ts19 Frag-II seja produzida a partir de uma modificação pós-transducional, denominada neste estudo de *post-splitting*, de um transcrito da Ts19. A caracterização funcional da Ts19 Frag-II foi realizada utilizando diferentes ensaios de atividade biológica. Uma extensa avaliação eletrofisiológica em canais iônicos (16 Kvs e 5 Navs) expressos em oócitos de *X. laevis* demonstrou que a toxina é capaz de bloquear seletivamente canais para potássio do tipo Kv1.2 ($IC_{50} = 544 \pm 32$ nM). Ensaios *in vivo* (camundongos C57BL/6) de dor revelaram que a Ts19 Frag-II (2 e 4 μ g) não é capaz de induzir comportamento nociceptivo espontâneo ou mecânico em camundongos, tanto pela administração intraplantar quanto pela via intratecal. Ensaios *in vivo* (camundongos BALB/c) também demonstraram que a nova toxina (4 e 8 μ g) induz aumento dos níveis séricos de ureia, ALT, β -globulina, IL-6, TNF- α , IL-17A e NO, além de diminuir a quantidade de α -globulinas. Adicionalmente, utilizando ensaios *in vitro* de cultura celular de linfócitos T CD4⁺, demonstrou-se que a Ts19 Frag-II (2 μ g) foi capaz de diminuir a diferenciação de células Th17, assim como suprimir sua função (diminuiu a produção de IL-17 e IL-22). Assim, no presente estudo foi realizado o isolamento e a caracterização molecular e funcional de uma nova toxina de Ts, a qual apresentou atividade neurotóxica e pró-inflamatória, podendo contribuir significativamente para a gravidade do quadro de envenenamento ocasionado pelo escorpião Ts. Adicionalmente, sua seletividade para canais Kv1.2 faz com que Ts19 Frag-II possa ser utilizada como ferramenta de estudo deste canal iônico.

Palavre chave: escorpião, *Tityus serrulatus*, Ts19 Frag-II, β -KTx, Kv1.2, citocinas, NO, Th17

ABSTRACT

Cerni, F.A. **Isolation, molecular and functional characterization of a new toxin present in the *Tityus serrulatus* scorpion venom.** 2016. 139f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The scorpion *Tityus serrulatus* (Ts) is responsible for most cases of scorpion envenomations in Brazil. Although its venom consist of many components, neurotoxins present major relevance because their specific interaction with voltage-gated sodium (Nav) or potassium (Kv) channels. So far, 20 neurotoxins have been described (Ts1 → Ts20) in the Ts venom. However, omics analysis indicate that this number is much higher. Toxins that interact selectively with ion channels are used as pharmacological tools, as they allow the identification of specific channels and the determination of their physiological roles. Additionally, these toxins may be used for the development of new drugs for treating disorders related to ion channels. Considering the high biotechnology potential of this class of molecules, this study isolated (by 3 chromatographic steps) and characterized a new toxin from Ts venom, named Ts19 Frag-II. The novel toxin presented 49 amino acid residues and a molecular mass of 5534.54012 Da. Classified as β - KT_x, it is speculated that the Ts19 Frag-II is produced from a post- translational modification, referred in this study as *post- splitting*, a transcript of Ts19. The functional characterization of Ts19 Frag-II was performed using different biological assays. The extensive electrophysiological study on ion channels (16 Kvs and 5 Navs) expressed in oocytes of *X. leavis* showed that the toxin is able to selectively block the potassium channel Kv1.2 (IC₅₀ = 544 ± 32 nM). *In vivo* assays (C57BL/6 mice) of nociception showed that Ts19 Frag-II (2 and 4µg) is not able to induce spontaneous or mechanical nociceptive behavior in mice, both by intraplantar as by intrathecal administration. *In vivo* assays (BALB/c mice) also demonstrated that the novel toxin (4 and 8µg) increased serum levels of urea, ALT, β -globulin, IL-6, TNF- α , IL-17A and NO, besides decreasing γ -globulins. In addition, using *in vitro* assays of CD4⁺ T-lymphocyte cell culture, it was demonstrated that Ts19 Frag-II (2 ug) was able to decrease the differentiation of Th17 cells, as well as it suppresses Th17 function (decreased IL-17 and IL-22 production). Therefore, the present study isolated and performed the molecular and functional characterization of a new toxin from Ts, which presented neurotoxic and pro-inflammatory activity and could contribute significantly to the severity of the envenoming caused by the Ts scorpion. Moreover, based on its selectivity for Kv1.2 channels, this toxin could be used as a tool to study this type of ion channel.

Keywords: scorpion, *Tityus serrulatus*, Ts19 Frag-II, β -KT_x, Kv1.2, cytokines, NO, Th17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do gênero <i>Tityus</i> no Brasil.....	6
Figura 2. Foto do escorpião adulto <i>Tityus serrulatus</i>	7
Figura 3. Figura esquemática da anatomia do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	8
Figura 4. Número de acidentes com animais peçonhentos notificados no Brasil (2007 a 2014).	9
Figura 5. Alterações induzidas pela peçonha de <i>T. serrulatus</i> em diferentes sistemas biológicos.	11
Figura 6. Composição da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	12
Figura 7. Estrutura do canal para sódio sensível a voltagem e os sítios de ligação com toxinas animais.....	15
Figura 8. Representação esquemática da subunidade α do canal para potássio.	17
Figura 9. Ilustração esquemática da indução de dor provocada pelo acidente com o escorpião <i>T. serrulatus</i>	21
Figura 10. Procedimento cirúrgico para a obtenção dos oócitos de <i>Xenopus laevis</i> ...	35
Figura 11. Injeção do cRNA nos oócitos de <i>Xenopus laevis</i>	36
Figura 12. Diagrama para a medida da corrente em oócito utilizando a técnica de voltage clamp with <i>two-microelectrode</i>	37
Figura 13. Protocolos de voltagem para a medição de correntes de canais para sódio e potássio dependentes de voltagem.....	37
Figura 14. Perfil cromatográfico da peçonha de <i>T. serrulatus</i> em coluna de CM-Celulose-52 em sistema FPLC.....	45
Figura 15. Perfil cromatográfico da fração VIB em sistema FPLC.	47
Figura 16. Perfil cromatográfico do pico 25 da fração VIB em sistema CLAE.....	48

Figura 17. Eletroforese SDS-PAGE: Peçonha de <i>T. serrulatus</i> , fração VIB, pico 25 e 25.2.	49
Figura 18. Espectro de Massas da subfração 25.2.	50
Figura 19. Alinhamento entre a Ts19, Ts19 frag-I e o pico 25.2.....	51
Figura 20. Avaliação eletrofisiológica de diferentes subtipos de canais para sódio na ausência ou presença da toxina Ts19 Frag-II.	52
Figura 21. Traços representativos das correntes de diferentes subtipos de canais para potássio na ausência ou presença da toxina Ts19 Frag-II.	53
Figura 22. Características funcionais da Ts19 Frag-II em Kv1.2.....	53
Figura 23. Traço representativo da corrente iônica no canal para potássio Kv1.2 na ausência ou presença da toxina Ts19 Frag-III.	54
Figura 24. Ensaio de hemólise com as toxinas Ts19 Frag-II e Ts19 Frag-III.	55
Figura 25. Nocicepção espontânea.....	56
Figura 26. Nocicepção mecânica.	56
Figura 27. Análises bioquímicas do soro dos animais que receberam a peçonha de <i>T. serrulatus</i> ou a toxina Ts19 Frag-II.....	58
Figura 28. Densidometria da eletroforese de proteínas séricas dos animais que receberam a peçonha de <i>T. serrulatus</i> ou a toxina Ts19 Frag-II.....	59
Figura 29. Análise de citocinas do soro dos animais que receberam a peçonha de <i>T. serrulatus</i> (20 ug) ou a toxina Ts19 Frag-II (4 ou 8 µg).	61
Figura 30. Análise da produção de óxido nítrico (NO) do soro dos animais que receberam a peçonha de <i>T. serrulatus</i> ou a toxina Ts19 Frag-II.....	62
Figura 31. Análise da diferenciação de células linfócitos Th17 estimuladas na presença da toxina Ts19 Frag-II.	63

Figura 32. Alinhamento entre as toxinas Ts19, Ts19 Frag-I, Ts19 Frag- II e Ts19 Frag-III e representação esquemática do processamento pós-transducional da toxina Ts19 (pos-splitting).....	68
Figura 33. Espectro de massas da subfração 25.2.	69
Figura 34. Classificação da Ts19 Frag-II.....	70
Figura 35. Resumo do resultados obtidos no presente estudo: caracterização molecular e funcional da Ts19 Frag-II.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação das frações obtidas na cromatografia da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i>	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

CK – Creatina cinase

CCD – *C-terminal CSαβ Domain*

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

Frag-II – Fragmento II

INF- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

LDH – Lacto desidrogenase

Nav – Canais para sódio dependentes de voltagem

NHD – *N-terminal helical domain*

NO – Óxido Nítrico

SINAN – Sistema Brasileiro de Agravos de Notificações

Th – Linfócito T auxiliar (*helper*)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alpha

Treg – Células T regulatórias

Ts – *Tityus serrulatus*

Kv – Canais para potássio dependentes de voltagem

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. História da Toxinologia	2
1.2. Toxinas animais no desenvolvimento de fármacos	3
1.3. <i>Tityus serrulatus</i> : história e morfologia	4
1.4. Epidemiologia dos acidentes por <i>T. serrulatus</i>	8
1.5. O envenenamento pela peçonha de <i>T. serrulatus</i>	10
1.6. A composição da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	12
1.7. Canais iônicos sensíveis a voltagem e toxinas escorpionicas	13
1.7.1. Neurotoxinas de <i>T. serrulatus</i> com ação em canais para sódio dependentes de voltagem (Navs)	14
1.7.2. Neurotoxinas de <i>T. serrulatus</i> com ação em canais para potássio dependentes de voltagem (Kvs)	17
1.8. A hiperalgesia induzida pela peçonha de <i>T. serrulatus</i>	20
1.9. A modulação da resposta imune pela peçonha e toxinas de <i>T. serrulatus</i>	22
1.10. Alterações bioquímicas induzidas pela peçonha de <i>T. serrulatus</i>	23
1.11. Importância da busca de novos componentes na peçonha de <i>T. serrulatus</i>	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Obtenção da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	28
3.2. Fracionamento das frações da peçonha de <i>T. serrulatus</i> em sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas	28
3.2.1. Preparação da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i>	28

3.2.2. Cromatografia de troca catiônica em CMC-52	29
3.3. Isolamento das toxinas de <i>T. serrulatus</i> em sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas	30
3.3.1. Cromatografia em fase reversa em coluna C18 da fração VIB	30
3.3.2. Cromatografia em fase reversa em coluna C18 das subfrações provenientes da fração VIB.....	31
3.4. Caracterização molecular	31
3.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	31
3.4.2. Sequenciamento amino-terminal	32
3.4.3. Espectrometria de massas	32
3.4.4. Análises das sequências obtidas utilizando bioinformática	33
3.5. Peptídeo sintético.....	33
3.6. Ensaios <i>in vitro</i>	33
3.6.1. Eletrofisiologia	33
3.6.1.1. Isolamento dos oócitos de <i>Xenopus leavis</i>	34
3.6.1.2. Expressão dos canais para sódio (Nav) e para potássio (Kv) sensíveis à voltagem.....	35
3.6.1.3. Medidas eletrofisiológicas	36
3.6.2. Ensaio de hemólise	38
3.6.3. Análise do número de células e produção de citocinas em células Th17.....	38
3.7. Ensaios <i>in vivo</i>	39
3.7.1. Ensaios de nocicepção.....	39
3.7.1.1. Animais.....	39
3.7.1.2. Nocicepção espontânea	40
3.7.1.3. Nocicepção mecânica	40

3.7.2. Ensaios Bioquímicos e Imunológicos	41
3.7.2.1. Animais.....	41
3.6.2.2. Análises bioquímicas.....	41
3.7.2.3. Análises imunológicas	42
4. RESULTADOS	45
4.1. Fracionamento da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	45
4.1.1. Cromatografia em troca catiônica em CMC-52 da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	45
4.1.2. Cromatografia de fase reversa em coluna C18 da Fração VIB da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	46
4.1.3. Cromatografia de fase reversa em coluna C18 do pico 25 oriundo da fração VIB da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	47
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	48
4.3. Espectrometria de massas	49
4.4. Sequenciamento amino-terminal.....	50
4.5. Eletrofisiologia	51
4.6. Ensaio de hemólise	54
4.7. Ensaios de nocicepção.....	55
4.8. Análises bioquímicas.....	57
4.9. Análises imunológicas	60
4.10. Análise do número de células e produção de citocinas de linfócitos Th17	62
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. ANEXOS	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. História da Toxinologia

A Toxinologia é uma ciência que estuda as características estruturais e funcionais de toxinas produzidas por microrganismos, plantas e animais. A Toxinologia é classificada como uma subárea da Toxicologia, cuja terminologia é proveniente da palavra grega *Toxikon*, que significa veneno de flecha. O uso de venenos animais em flechas para potencializar a morte da presa durante a caça ou aumentar a letalidade durante as batalhas é comum em diversas culturas, embora essa prática não tenha a sua origem bem definida (Hodgson, 2010).

Existem inúmeros registros ao longo da história da humanidade que relatam o grande interesse por toxinas e venenos animais. No Egito, “O Papiro de Ebers”, produzido em 1500 a.C, é um dos documentos mais antigos, apresentando uma lista com aproximadamente 800 ingredientes ativos que incluem peçonhas e venenos animais. Na Grécia, Dioscorides (40 - 90 a.C) foi o pioneiro a classificar venenos, separando-os em venenos minerais, vegetais e animais, sendo que no último grupo descreveu a presença de venenos de sapo e peçonhas de serpentes. O Tratado “*Poisons and their Antidotes*” escrito por Maimonides (1135 - 1204), é um clássico da Toxinologia, uma vez que contém informações de venenos e antídotos, além de recomendar tratamentos para acidentes por serpentes (Hodgson, 2010; Oga et al., 2008).

No entanto, foi o médico Theophrastus Bombastus Von Hohenheim (1493 – 1541), com o pseudônimo de Paracelso, que apresentou grande destaque científico na área da Toxinologia. Paracelso é autor da famosa frase “*Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose correta é o que diferencia o veneno do remédio*”. Já no século XIX, destacam-se os estudos do médico francês Léon

Charles Albert Calmette (1863 - 1933), o qual desenvolveu o primeiro soro antiofídico heterólogo (produzido em cavalos), um soro contra a mordida de cobra do gênero *Naja* (Hodgson, 2010; Oga et al., 2008).

Mesmo sendo explorada há anos, a Toxinologia ainda desperta interesse crescente na comunidade científica e na indústria farmacêutica. Através do estudo de peptídeos e toxinas animais é possível obter grandes avanços biotecnológicos, principalmente para a produção de novos agentes terapêuticos.

1.2. Toxinas animais no desenvolvimento de fármacos

As peçonhas e venenos animais possuem função importante na sobrevivência da espécie, sendo importantes para a predação, competição e/ou proteção. Essa mistura complexa de componentes (proteínas, peptídeos, componentes inorgânicos e orgânicos) age em sinergismo com o objetivo de agredir, imobilizar e matar a presa ou agressor. Desse modo, as toxinas presentes nos venenos e peçonhas possuem alvo(s) específico(s), produzindo diversas alterações em diferentes organismos. Porém, a ação nociva destas toxinas pode ser também considerada benéfica. Nesse contexto, diversas peçonhas e venenos vêm sendo estudados exaustivamente nas últimas décadas, tornando o desenvolvimento de novos fármacos uma realidade (Takacs e Nathan, 2014).

O Captopril (Capoten®; Bristol Myers Squibb) é o exemplo mais famoso de medicamento desenvolvido a partir de compostos de peçonhas animais. Desenvolvido a partir de um composto ativo da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, é utilizado no tratamento de hipertensão arterial e pós-infarto do miocárdio, devido a capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) e, em consequência,

as ações das angiotensinas (I e II), além de potencializar a resposta da bradicinina (Opie e Kowolik, 1995).

O Ziconotide (Prialt®, Azur Pharma Inc., Philadelphia, PA) é um potente analgésico utilizado no tratamento de dores crônicas graves de pacientes que não respondem ao uso de fármacos habituais. Esse medicamento foi desenvolvido utilizando estudos com a toxina produzida pelo caracol *Conus magus*, que é capaz de bloquear canais para cálcio (Miljanich, 2004).

Produzido a partir de um componente presente na saliva do monstro de gila *Heloderma suspectum*, o Exenatide (Byetta®, Amylin Pharmaceuticals) é um medicamento utilizado em pacientes com Diabetes tipo II, o qual aumenta a produção de insulina (Nielsen e Baron, 2003).

O Tirofiban (Aggrastat®, Medicure Pharma e Correbio International Sàrl) é um medicamento antitrombótico. Sintetizado com base em uma molécula presente na peçonha da serpente *Echis cainatus*, esse componente possui ação antagonista ao receptor GPIIb/IIIa, responsável por se ligar ao receptor GPIIb/IIIa das plaquetas, o qual impede a ativação do fibrinogênio (Rasmussen e Husted, 2001).

Diante desses exemplos, fica evidente a importância do estudo de venenos e peçonhas animais, sendo um promissor objeto de investigação para a indústria farmacêutica, bem como para um melhor entendimento dos quadros clínicos de envenenamentos.

1.3. *Tityus serrulatus*: história e morfologia

Os escorpiões, também conhecidos como lacraus, são animais invertebrados pertencentes ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones. Originários do período Siluriano como animais aquáticos, foram um dos

primeiros artrópodes a conquistar o ambiente terrestre, havendo relatos de fósseis com mais de 400 milhões de anos. As características biológicas, fisiológicas, comportamentais, aliada a alta capacidade de adaptação desse animal em ambientes extremos (altas temperaturas climática, escassez de alimento e água) contribuíram para sua ampla distribuição territorial. Os escorpiões são encontrados em todos os continentes, com exceção das regiões polares e da Nova Zelândia (Carvalho e Lourenço, 2001; Lourenço, 2015; Whitfield, 1885).

Atualmente, são descritas 2.069 espécies de escorpiões distribuídas no mundo, as quais são divididas em 197 gêneros e 15 famílias. A família *Buthidea* apresenta grande destaque. Com 84 gêneros e aproximadamente 900 espécies, ela possui 34 espécies consideradas potencialmente perigosas para o homem, sendo essas pertencentes aos gêneros *Androctonus*, *Buthus*, *Centruroides*, *Hottentota*, *Leiurus*, *Mesobuthus*, *Parabuthus* e *Tityus* (Chippaux e Goyffon, 2008; Di et al., 2014; Fet et al., 2000). Encontrado majoritariamente no Brasil, o gênero *Tityus* possui 22 espécies descritas no país (Fig. 1), dentre elas a espécie *Tityus serrulatus* (Ts) se destaca e está amplamente distribuída no território nacional (Pucca et al., 2015c).

Figura 1. Distribuição do gênero *Tityus* no Brasil. Figura extraída de (Pucca et al., 2015c). A espécie *T. serrulatus* está amplamente distribuída pelos países.

O escorpião Ts é descrito como nativo do cerrado do estado de Minas Gerais, porém, atualmente há relatos desse animal em 17 dos 26 estados brasileiros, ocupando assim as cinco regiões do país (Pucca et al., 2015a). Esse fato pode ser justificado, principalmente, pela reprodução diferenciada dessa espécie, denominada partenogênese. A partenogênese (do grego *parthenos* = virgem + *genesis* = nascimento) é uma reprodução assexuada em que ocorre o desenvolvimento do embrião sem a necessidade da fertilização do óvulo. Com exceção dos ácaros, esse fenômeno é raro entre os quelicerados e considerada uma notável característica do escorpião Ts (Lourenço, 2008; Lutz e Mello, 1922). Cada gestação de Ts demora aproximadamente 30 dias, podendo gerar até 20 novos indivíduos, os quais irão permanecer protegidos no dorso da mãe até desenvolver independência para se alimentar (Fig. 2). Embora a estratégia de reprodução seja assexuada, há relatos de

machos da espécie nas regiões sudeste e nordeste do país (Dos Santos et al., 2014; Pucca et al., 2015a).

Figura 2. Foto do escorpião adulto *Tityus serrulatus*. Foto do acervo de imagens do Laboratório de Toxinas Animais.

T. serrulatus ou escorpião amarelo, nome popular em função da sua coloração amarela clara e escura, é um animal relativamente pequeno, atingindo até 7 cm de comprimento na fase adulta. Assim como os demais escorpiões, o Ts possui o corpo dividido em três segmentos (cefalotórax, mesossoma e metassoma), quatro pares de pernas (responsáveis pela locomoção), um par de pedipalpos (utilizadas para segurar suas presas) e quelíceras (órgãos pré-bucais) (Almeida, 2010).

Na extremidade do metassoma se localiza o ferrão do escorpião, aparato utilizado na alimentação e defesa do animal. Na base do ferrão se localiza o telson, onde se encontra a vesícula, a qual possui um formato inicialmente globular, terminando em um espinho curvo (acúleo), o qual é semelhante a uma agulha hipodérmica. Dentro da vesícula estão localizados dois pares de glândulas, responsáveis pela produção e armazenamento da peçonha. Cada glândula é conectada através de dois canais a duas

aberturas próximas a região terminal do telson, local responsável pela saída da peçonha (Marcussi et al., 2011).

A “serrilha” (pequenos “dentes”) localizada na face dorsal dos segmentos distais do telson é um diferencial dos demais escorpiões do gênero *Tityus* (Fig. 3) e também responsável pelo nome *serrulatus* à espécie (Lutz e Mello, 1922; Ministério-da-Saúde, 2009).

Figura 3. Figura esquemática da anatomia do escorpião *Tityus serrulatus*. Figura modificada do Manual de Controle de Escorpiões (Ministério-da-Saúde, 2009)

1.4. Epidemiologia dos acidentes por *T. serrulatus*

Dados do SINAN (Sistema Brasileiro de Agravos de Notificação), agência federal responsável por coletar e registrar os acidentes com animais peçonhentos no país, mostraram que de 2007 a 2014 o número de casos de acidentes com escorpiões vem aumentando, desproporcionalmente, em relação aos demais animais peçonhentos (Fig.

4), demonstrando o risco que esse animal representa a saúde pública do país (Pucca et al., 2015c). Somente no estado de São Paulo, no ano de 2015, foram registrados 15.107 acidentes com escorpião, segundo o CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vrajac), sendo que a espécie *T. serrulatus* é a principal responsável pelos acidentes registrados (Centro-de-Vigilância-Epidemiológica).

Figura 4. Número de acidentes com animais peçonhentos notificados no Brasil (2007 a 2014). Modificado de (Pucca et al., 2015c)

O aumento do número de acidentes com *T. serrulatus* ao longo dos anos pode ser justificado pela facilidade de adaptação dessa espécie em grandes áreas urbanas. Áreas que originalmente eram habitadas por Ts foram colonizadas de maneira rápida e desordenada pelo homem, incluindo esse animal no cotidiano. O transporte de cargas através de trens e caminhões também facilitou a expansão desse animal pelo território nacional. A sobrevivência e proliferação desse escorpião em grandes cidades é ainda favorável devido à ausência de predadores naturais; a oferta de alimentos como insetos, resultado do acúmulo de lixo e entulhos. Essas características, aliadas ao clima tropical do país (quente e úmido) e a reprodução partenogênica, auxiliaram no aumento

exponencial da espécie ao longo dos anos, podendo ser considerada, atualmente, uma “praga urbana” (Burcherl, 1979; Likes et al., 1984; Lourenço, 2008; Marcussi et al., 2011).

1.5. O envenenamento pela peçonha de *T. serrulatus*

A peçonha escorpiônica é considerada tóxica para humanos. Os sinais e sintomas clínicos aparecem de maneira precoce após o envenenamento, resultado da rápida distribuição da peçonha no organismo. O quadro clínico dos indivíduos envenenados por Ts pode ser classificado em 3 estágios.

No estágio I ou envenenamento leve, o paciente apresenta dor local podendo ser acompanhada de náuseas, sudorese, taquicardia, febre e agitação. O envenenamento moderado (estágio II), além de apresentar os sinais e sintomas do estágio I, é caracterizado pela dor estomacal, obstrução pulmonar, cólicas, vômito, diarreia, hipotensão, bradicardia e dispneia. O quadro grave de envenenamento (estágio III), além de apresentar os sinais e sintomas dos estágios anteriores, pode apresentar ainda falha cardiorrespiratória, podendo ser letal para a vítima. Normalmente, esse estágio ocorre em crianças e idosos, devido à baixa massa corpórea e ao sistema imune debilitado, respectivamente (Chippaux e Goyffon, 2008; Cupo et al., 1994; dos Santos, 2012; Venancio et al., 2013).

A diversidade de sintomas relatados em vítimas de acidentes com o escorpião Ts demonstra a composição complexa da peçonha, apresentando ação em todos os sistemas biológicos: nervoso, muscular, imune, cardiovascular, respiratório, urinário, digestivo, endócrino e exócrino, tegumentar, esquelético e reprodutivo, conforme ilustrado na Figura 5 (Pucca et al., 2015a).

Figura 5. Alterações induzidas pela peçonha de *T. serrulatus* em diferentes sistemas biológicos. Modificado de (Pucca et al., 2015a)

1.6. A composição da peçonha de *T. serrulatus*

Em geral, a peçonha é composta por muco insolúvel, mucopolissacarídeo, aminas, peptídeos natriuréticos, inibidor de caliceína, proteínas com alta massa molecular, lipídeos, sais inorgânicos, peptídeos, enzimas (hialuronidase, metaloprotease e serinoprotease), além de proteínas com baixa massa molar com atividade neurotóxicas (Fig. 6) (Cologna et al., 2009; Pucca et al., 2015a). No entanto, a composição da peçonha e a proporção de suas toxinas podem variar entre indivíduos da mesma espécie de Ts. Isso se deve a variações genéticas, condições ambientais, região geográfica habitada e dieta adotada pelo animal (Pucca et al., 2014).

Figura 6. Composição da peçonha de *T. serrulatus*. Modificado de (Pucca et al., 2015a)

As toxinas com ações neurotóxicas são os componentes com maior destaque, sendo exaustivamente estudadas funcional e estruturalmente durante várias décadas.

Atualmente já foram descritas mais de 20 toxinas proveniente da peçonha de *T. serrulatus*, essas foram isoladas diretamente da peçonha (Ts1→Ts16, Ts19 Frag-I, Ts19 Frag-II e Ts20) ou obtidas através de técnicas ômicas (Ts17→Ts19). Neurotoxinas são capazes de interferir na permeabilidade iônica de membranas de células excitáveis, por interagirem especificamente com canais para Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻ dependentes de voltagem, sendo assim frequentemente utilizadas como ferramentas para o estudo de estrutura e função desses canais (Alvarenga et al., 2012; Cologna et al., 2009; Cologna et al., 2011; Lima et al., 2015; Pucca et al., 2014).

1.7. Canais iônicos sensíveis a voltagem e toxinas escorpiónicas

Canais iônicos sensíveis à voltagem são elementos de extrema importância para a atividade das células. Responsáveis pela passagem seletiva de íons Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺, essas proteínas integrais de membrana são as responsáveis pela geração e propagação de sinais elétricos em neurônios e outras células excitáveis (Catterall, 1984).

Os canais iônicos sensíveis à voltagem possuem a capacidade de mudar a sua conformação para aberto, fechado ou inativado, em função do potencial de membrana, permitindo assim, um movimento eficiente e rápido de íons específicos a favor do gradiente eletroquímico. Dessa maneira, correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, resultando na despolarização ou repolarização da membrana. Neurotoxinas que possuem ação nesses canais são capazes de alterar os mecanismos de ativação ou inativação, levando à intensa despolarização celular e liberação de neurotransmissores (Catterall, 1984; Gordon et al., 1998; POSSANI et al., 1999).

Diversos estudos envolvendo neurotoxinas de Ts e canais iônicos já foram relatados na literatura, as quais já demonstraram interagir com canais para sódio e para

potássio dependentes de voltagem (Cerni et al., 2015; Cerni et al., 2014; Cologna et al., 2011; Peigneur et al., 2015; Pucca et al., 2016a; Pucca et al., 2016b; Pucca et al., 2015b; Pucca et al., 2015d)

1.7.1. Neurotoxinas de *T. serrulatus* com ação em canais para sódio dependentes de voltagem (Navs)

Canais para sódio dependentes de voltagem (Navs) são proteínas transmembrânicas responsáveis pelo influxo seletivo de íons de sódio pela membrana celular. Esse canal é composto por uma subunidade α , formadora do poro (220 a 260 KDa), podendo essa estar associada a uma ou duas subunidades β auxiliares (33 a 36 KDa). A subunidade α é formada por quatro domínios homólogos (I $\rightarrow$ IV), os quais são constituídos por seis segmentos transmembrânicos (S1 $\rightarrow$ S6) conectados através de alças (*loops*) intra e extracelulares. O segmento 4 (S4) de cada domínio possui resíduos de aminoácidos carregados positivamente e atua como sensor de voltagem para a ativação do canal. A pequena alça intracelular que conecta os domínios III e IV contém o *Motif* IFM, composta por três resíduos hidrofóbicos (isoleucina, fenilalanina e metionina), é responsável pela inativação do canal (Fig. 7) (Cestele e Catterall, 2009).

Em células de mamíferos foram identificados nove isoformas de canais para sódio sensíveis à voltagem (Nav1.1 $\rightarrow$ Nav1.9), as quais apresentam mais de 50% de identidade e exibem expressão e localização diferenciadas nos tecidos (Bosmans e Tytgat, 2007).

As toxinas escorpiônicas com ação em Navs são subdivididas em α -toxinas e β -toxinas, de acordo com suas especificidades aos diferentes sítios dos canais para sódio de células de mamíferos.

As α -toxinas escorpiônicas se ligam ao sítio 3 dos Navs, retardando ou até mesmo bloqueando a inativação do canal. Elas podem ser divididas em três subgrupos de acordo com a sua preferência farmacológica: α -clássica (mamíferos), α -inseto (insetos) e α -like (mamífero e insetos) (Bosmans e Tytgat, 2007).

As β -toxinas apresentam especificidade ao sítio 4 dos Navs e também são subdivididas em β_m (mamíferos), β_i (insetos) e β -like (mamíferos e insetos). Essas alteram a dependência da ativação para potenciais mais negativos, resultando na produção de potenciais de ação espontâneos e repetidos (Bordon et al., 2015; Bosmans e Tytgat, 2007; Cestele e Catterall, 2009; Stevens et al., 2011).

Figura 7. Estrutura do canal para sódio sensível a voltagem e os sítios de ligação com toxinas animais(Zhang et al., 2013).

As toxinas escorpiônicas com ações em Navs são responsáveis pelos principais sinais e sintomas apresentados durante o quadro de envenenamento (Bordon et al., 2015). Em geral, são toxinas que apresentam de 60 a 76 resíduos de aminoácidos fortemente interligados por quatro pontes de sulfeto, responsáveis pela alta estabilidade da molécula (Bordon et al., 2015).

Em Ts já foram isoladas e estudadas cinco toxinas (Ts1 → Ts5) com ação em Navs. A toxina Ts1 é considerada a toxina majoritária da peçonha de Ts. Classificada como uma β -toxina por interagir com o sítio 4 de Navs, ela corresponde a 16% da peçonha solúvel e contribui significativamente para a toxicidade da peçonha. Recentemente, ensaios eletrofisiológicos demonstraram que a toxina Ts1 altera a ativação de canais Nav1.2, Nav1.4 e Nav1.6, além de bloquear o pico de corrente do canal Nav1.5 (Peigneur et al., 2015). A toxina Ts2, classificada como α -neutotoxina, demonstrou inibir a inativação dos canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (Peigneur et al., 2015). Ts2 demonstrou inibir a inativação dos canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (Cologna et al., 2012). A toxina Ts3 ainda não foi estudada eletrofisiologicamente. No entanto, é capaz de induzir a liberação de catecolaminas, acetilcolina (ACh), óxido nítrico (NO), ácido gamaaminobutírico (GABA), aspartato (Asp) e glutamato (Glu), por agirem em canais para sódio (Bordon et al., 2015). Ts4 demonstrou alterar especificamente canais Nav1.6, enquanto a toxina Ts5 é capaz de inibir a inativação dos canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (Pucca et al., 2015b; Pucca et al., 2015d).

1.7.2. Neurotoxinas de *T. serrulatus* com ação em canais para potássio dependentes de voltagem (Kvs)

Os canais para potássio dependentes de voltagem (Kvs) são considerados fundamentais em vários processos fisiológicos, tais como excitabilidade celular, ativação de linfócitos, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios entre outros (Gutman et al., 2005).

Os Kvs são formados pela união de quatro subunidades α distintas, as quais se associam em tetrâmeros na membrana para formar a unidade funcional do canal. Agrupadas em 8 famílias, as subunidades α possuem mais de 60 diferentes genes identificados e clonados. A possibilidade de utilização de diferentes subunidades da mesma subfamília explica a diversidade de tipos de canais para potássio nativos (Robbins, 2001).

Composta por seis segmentos transmembrânicos (S1 $\rightarrow$ S6) ligados por alças intra e extracelulares, a subunidade α pode ser dividida em região sensível a voltagem (S1 $\rightarrow$ S4) e região formadora do poro (S5 e S6). A alça (*loop*) P, localizada entre os segmentos S5 e S6, é responsável pela abertura e fechamento do canal (Fig. 8) (Kaczorowski e Garcia, 1999).

Figura 8. Representação esquemática da subunidade α do canal para potássio. Figura modificada de (Cestele e Catterall, 2009).

Os Kvs estão classificados em 12 subfamílias de acordo com a homologia e a sequência de aminoácido (Kv1 → Kv12), as quais são distribuídas em diversos tecidos do organismo (Gutman et al., 2005).

A subfamília *Shaker* (Kv1) é a mais estudada. Dividida em oito subtipos (Kv1.1 → Kv1.8), suas isoformas podem ser encontradas no cérebro, sistema nervoso periférico, rim, pâncreas, pulmão, coração, retina, pulmão, retina, células hematopoiéticas, osteoclastos e linfócitos (Mouhat et al., 2008; Wulff et al., 2003). Toxinas de diferentes animais já demonstraram interagir com esses canais (Bosmans e Swartz, 2010; Chen et al., 2011; Peigneur et al., 2012).

Shab (Kv2) é uma subfamília pequena que possui apenas duas isoformas (Kv2.1 e Kv2.2). São frequentemente encontradas no cérebro, rim, pulmão, retina e pâncreas. Toxinas de aranhas demonstraram ação nesses canais (Escoubas et al., 2002; Mouhat et al., 2008; Swartz e MacKinnon, 1995).

Encontrada principalmente no cérebro, a subfamília *Shaw* ou Kv3, apresenta 4 isoformas (Kv3.1 → Kv3.4). Toxinas de anêmonas do mar demonstraram interagir especificamente com estes canais (Mouhat et al., 2008; Yeung et al., 2005).

Codificada por 3 genes (Kv4.1 → Kv4.3), a subfamília *Shal* está localizada no cérebro, coração e musculatura lisa. Estudos demonstram que estas toxinas de escorpiões e aranhas interagem com estes canais (Mouhat et al., 2008; Yeung et al., 2005).

Apresentando cinco isoformas (Kv7.1 → Kv7.5), a subfamília Kv7 é frequentemente encontrada no coração, músculo esquelético, sistema nervoso central e células sensoriais auditivas. Toxinas escorpiônicas já demonstraram interagir nestes canais (Landoulsi et al., 2013; Mouhat et al., 2008).

As subfamílias Kv5, Kv6, Kv8 e Kv9 não são capazes de formar, individualmente, canais funcionais para potássio, eles utilizam da estratégia de formar canais heteromultiméricos utilizando subunidades α da subfamília Kv2 (Mouhat et al., 2008).

Canais da subfamília Eag (Kv10, Kv11 e Kv12) são encontrados principalmente no sistema nervoso central, além de estarem presentes células tumorais (Kv10 e Kv11) e coração (Kv11 - *ether-a-go-go related gene* ou hERG) (Mouhat et al., 2008; Pardo e Stuhmer, 2014; Vandenberg et al., 2012).

Diversas toxinas escorpiônicas demonstraram ser específicas para Kvs. São, geralmente, constituídas por 22 a 47 resíduos de aminoácidos e apresentam uma conformação tridimensional constituída por três fitas- β antiparalelas ligadas a uma região α -helicoidal por pontes dissulfeto (Garcia et al., 2001). Essas toxinas são capazes de modular a porção sensível à voltagem da subunidade α e, principalmente, de bloquear o poro condutor do canal, através da ligação da toxina com a porção extracelular do canal (Garcia et al., 1991).

As toxinas escorpiônicas que apresentam ação em canal para potássio foram classificadas em 4 extensas famílias (α -, β -, γ - e κ -KTx). A família das α -KTx é a mais numerosa e a mais estudada, apresentando toxinas agrupadas em 21 subfamílias. As β -KTx é uma família caracterizada por possuir peptídeos maiores com, aproximadamente, 60 resíduos de aminoácidos. As toxinas da família γ -KTx são bloqueadores de canais do tipo hERG e são constituídas de 36 - 47 resíduos de aminoácidos. Conhecidas como fracas bloqueadoras de canais para potássio, os membros da família κ -KTx apresentam duas α -hélices em suas estrutura (Abdel-Mottaleb et al., 2006; Bordon et al., 2015; Cologna et al., 2011).

Embora as toxinas específicas para canais para sódio sejam consideradas os componentes mais tóxicos da peçonha do escorpião, as neurotoxinas que atuam em

canais para potássio são de extrema importância para o quadro do envenenamento, por agirem de forma sinérgica com as neurotoxinas para sódio e, assim, potencializar ainda mais a ação tóxica da peçonha (Mouhat et al., 2008).

Ensaio eletrofisiológicos demonstraram que cinco toxinas (Ts6, Ts7, Ts8, Ts15 e Ts16) do escorpião Ts possuem ação em canais para potássio. A toxina Ts6 atua bloqueando canais Kv1.2, Kv1.3 e *Shaker IR*. Ts7 demonstrou bloquear Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6 and *Shaker IR* (Cerni et al., 2014). Classificada como β -KTx, a toxina Ts8 apresenta especificidade para canal do tipo Kv4.2 (Pucca et al., 2016b). A toxina Ts15 é capaz de bloquear Kv1.2, Kv1.3 e Kv2.1 (Cologna et al., 2011; Pucca et al., 2016a). A toxina Ts16, embora testada em 13 diferentes tipos de canais para potássio demonstrou ser seletiva apenas Kv1.2 (Bordon et al., 2015).

1.8. A hiperalgesia induzida pela peçonha de *T. serrulatus*

Durante os acidentes ocasionados por *T. serrulatus*, 95.5% das vítimas relatam intensa e persistente dor no local da picada como a principal manifestação clínica, independente da gravidade do envenenamento (Bucarety et al., 2014). Basicamente, existem 2 tipos de dor, a neuropática (nervo) e a nociceptiva (tecido). Porém, independente do tipo, a dor é reconhecida pelo organismo por sensores biológicos representados por canais iônicos e outros receptores, os quais são os primeiros a detectarem o estímulo causador e o propagarem na forma de estímulo elétrico (Cummins et al., 2007; Gohar, 2005).

Existem 5 isoformas (Nav1.3, Nav1.6 → Nav1.9) de canais para sódio voltagem dependentes que possuem relação com a dor. O Nav1.3 é altamente expresso em neurônios sensoriais embrionários e tende a diminuir em adultos. Nav 1.6 é altamente expresso no sistema nervoso central e em neurônios sensoriais. Nav1.7 é

predominantemente expresso em gânglios da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglion*), embora esteja também expresso em dendritos e axônios do neurônio sensorial. Nav1.8 e Nav1.9 são expressos principalmente em DRGs de menor diâmetro. Estudos de eletrofisiologia utilizando a técnica de *voltagem clamp* com dois microelétrodos, demonstraram que a peçonha de Ts apresenta quatro neurotoxinas (Ts1, Ts2, Ts4 e Ts5) com ação em Navs relacionados com a dor (Cologna et al., 2012; Peigneur et al., 2015; Pucca et al., 2015b; Pucca et al., 2015d). Além disso, a toxina Ts8 demonstrou interagir com canais Kv4.2, o único canal para potássio diretamente relacionado com a algesia (Pucca et al., 2016b). Assim, os canais para sódio (Nav1.3, Nav1.6 → Nav1.9) e o canal Kv4.2 estão intimamente relacionados com o aumento da sensibilidade a dor (Fig. 9). No entanto, sabe-se que a intensa produção de mediadores pró-inflamatórios durante o envenenamento também contribuem para dor intensa relatada nas vítimas (Pucca et al., 2015a).

Figura 9. Ilustração esquemática da indução de dor provocada pelo acidente com o escorpião *T. serrulatus*. Em humanos, a dor persistente e intensa que a picada do escorpião Ts (injeção subcutânea da peçonha) provoca é resultado da ligação de diferentes toxinas com determinados canais iônicos (Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.9 e Kv4.2) e a produção de mediadores inflamatórios. Modificada de (Pucca et al., 2016b).

1.9. A modulação da resposta imune pela peçonha e toxinas de *T. serrulatus*

A peçonha de *T. serrulatus* é responsável por desencadear uma resposta imunológica sistêmica nos casos de envenenamento.

Em camundongos, a peçonha de Ts induziu o aumento da liberação de citocinas pró (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no plasma dos animais, além de aumentar o número de células nos órgãos linfóides. Ainda em modelo murino, a toxina majoritária, Ts1, demonstrou ser capaz de aumentar os níveis de IL-6, IL-1 α e TNF- α no plasma dos animais (Fialho et al., 2011; Pessini et al., 2003).

Em humanos, foram observados aumento dos níveis das citocinas IL-1 α , IL-6, interferon- γ e fator de estimulação de colônia de granulócitos–macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*). Adicionalmente, em outro estudo, foi demonstrado aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 nos casos moderados (estágio II) e graves (estágio III) de envenenamento (FUKUHARA et al., 2003a; Magalhaes et al., 1999).

Ensaio *in vitro*, demonstraram que a peçonha de Ts é capaz de aumentar os níveis de IL-6 e IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais (Petricevich e Pena, 2002). Ainda, toxinas isoladas de Ts foram avaliadas individualmente sobre a imunomodulação de macrófagos. A toxina Ts1 induziu aumento da produção de IL-6 e TNF- α . A toxina Ts2 inibiu a produção de óxido nítrico (NO), e aumentou a produção de IL-10 e TNF- α . A toxina Ts6 diminuiu a produção de TNF- α e induziu o aumento de IL-6 e NO. A Ts5 mostrou possuir efeito pró-inflamatório, uma vez que induziu o aumento da produção de TNF- α e IL-6 em macrófagos através de diferentes vias de sinalização: direta e indireta (Pucca et al., 2015d; Zoccal et al., 2011a; Zoccal et al., 2013a). Ainda, foi demonstrado que a peçonha de Ts é capaz de ativar

PPAR- γ e induzir a produção de prostaglandina (PGE₂) e leucotrieno (LTB₄) (Zoccal et al., 2015). Recentemente, este mecanismo foi melhor detalhado. A peçonha de Ts demonstrou ativar NLRP3 inflamassoma via efluxo de K⁺, o que resultaria em produção de LTB₄ e PGE₂ pela sinalização de IL-1 β /IL-1R (Zoccal et al., 2016).

1.10. Alterações bioquímicas induzidas pela peçonha de *T. serrulatus*

Algumas proteínas ou enzimas são normalmente usadas como marcadores para diagnosticar alterações de determinados tecidos, como é o caso das enzimas creatina-quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e troponina I (Bordon et al., 2015). Estudos utilizando cachorros, ratos e camundongos demonstraram que a peçonha de Ts é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de creatina cinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) (Correa et al., 1997; Ribeiro et al., 2010). Em murinos, também foi demonstrado que a peçonha de Ts é capaz de aumentar a produção de ureia e creatinina no soro dos animais (Pucca et al., 2012)

1.11. Importância da busca de novos componentes na peçonha de *T. serrulatus*

Como pode ser observado, peçonhas presentes em animais representam uma fonte rica de componentes como base para fármacos para as mais variadas aplicações médica, sendo, uma área da pesquisa que compreende uma variedade de conhecimentos a serem explorados e aprimorados.

Embora inúmeros componentes da peçonha de *T. serrulatus* tenham sido exaustivamente estudados nas últimas décadas (total de 20 neurotoxinas, Ts1 →

Ts20), estima-se que este número seja bem superior. Utilizando análises de espectrometria de massas, Pimenta et al. (2001) identificou 380 diferentes massas distintas nessa peçonha. Assim, estima-se que o número total de toxinas produzidas por escorpiões equivale a, aproximadamente 100.000, e, destas, apenas 1% são conhecidas (Gazarian et al., 2005; Pimenta et al., 2001). Desta forma, é evidente que muitos outros componentes da peçonha ainda precisam ser isolados e estudados.

Desta forma, a busca de novos componentes extraídos na peçonha do escorpião Ts desempenha um papel importante a fim de serem encontradas novas substâncias que poderão servir, futuramente, como base para novas pesquisas e muitas vezes com aplicação industrial. Além disso, o estudo destes componentes auxilia no entendimento do quadro de envenenamento, assim como na produção de melhores antivenenos. Nesse sentido, o presente estudo objetivou isolar e caracterizar a molécula e a função de uma nova toxina da peçonha de Ts.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Purificação e caracterização molecular e funcional da nova toxina Ts19 Frag-II presente na peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*.

2.2. Objetivos específicos

- Purificar uma nova toxina da peçonha de *T. serrulatus*, Ts19 Frag-II, utilizando técnicas cromatográficas (cromatografia de troca catiônica seguida de cromatografia de fase reversa).
- Caracterizar estruturalmente a toxina Ts19 Frag-II através da determinação da massa molecular por espectrometria de massas e sequenciamento amino-terminal.
- Caracterizar funcionalmente a toxina Ts19 Frag-II através de diferentes ensaios: hemolítico, eletrofisiológico, de nocicepção, bioquímicos e imunológicos.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção da peçonha de *T. serrulatus*

A peçonha foi extraída dos escorpiões da espécie *Tityus serrulatus* provenientes do serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, os quais são oriundos da região da cidade de Ribeirão Preto. Estes foram submetidos à extração através do método de estimulação elétrica do télson. Em seguida a peçonha foi liofilizada e estocada a -20°C. O uso da peçonha de Ts foi credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA, número 010214/2014-3, Anexo 2).

3.2. Fracionamento das frações da peçonha de *T. serrulatus* em sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas

3.2.1. Preparação da peçonha bruta de *T. serrulatus*

A amostra liofilizada da peçonha de Ts foi diluída em 20 µL de água ultra pura (MilliQ®) e em seguida dessecada à vácuo em dessecador de vidro durante aproximadamente 6 horas. Após esse período a amostra já dessecada (50 mg) foi solubilizada em 0,5 mL de tampão NH_4HCO_3 0,05 M, centrifugada a 10.015 x g (Centrifuge® 5415 R) durante 10 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado à 4°C. Ao precipitado, foram adicionados mais 0,5 mL da solução de NH_4HCO_3 a 0,05 M, o qual foi homogeneizado até completa dispersão e novamente centrifugado. Esta extração foi repetida por mais duas vezes, os sobrenadantes foram mantidos overnight a 4 °C e novamente centrifugados a 10.015 x g, por 10 minutos. Ao final deste processo, foi obtida a peçonha solúvel (isenta de muco), que corresponde aos quatro sobrenadantes reunidos ($\pm$ 2 mL). Posteriormente

essa amostra foi filtrada em membrana de 0,22 μm e utilizada para o fracionamento em coluna de CM-celulose-52.

3.2.2. Cromatografia de troca catiônica em CMC-52

O fracionamento do extrato bruto da peçonha de Ts foi realizado através do novo método já padronizado por (Cerni, 2012). Foi utilizada uma coluna de CM-celulose-52 microgranular (Whatman) 1.6 x 100 cm, acoplada ao sistema FPLC – Äkta UPC-10 system – GE Healthcare®, Uppsala, Sweeden), com leitura em 280 nm.

A amostra (± 2 mL) foi aplicada manualmente à coluna e, após a penetração de toda amostra na resina, a coluna foi conectada ao sistema FPLC e foram realizadas leituras em 280 nm, para a obtenção do perfil cromatográfico. A coluna foi inicialmente eluída (140 mL) com uma de solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8 (100% de Tampão A) com vazão de 0,5 mL/min e, a seguir, iniciou-se um gradiente linear de concentração de NH_4HCO_3 0,6 M (Tampão B) até atingir 100% de Tampão B, após 440 mL de eluição. Esta concentração (100% solução B) foi mantida por mais 140 mL, decaindo abruptamente para 0% de Tampão B, atingindo, conseqüentemente, 100% da solução A, a qual foi mantida por mais 202 mL, para reequilibrar a coluna.

As frações obtidas foram separadas e nomeadas de I a XIII (algumas sendo subdivididas em A e B), liofilizadas e armazenadas a -20°C . A fração de interesse desse estudo é a VIB, que foi diluída em água ultra pura e submetida a um segundo processo cromatográfico (fase reversa em coluna C18).

3.3. Isolamento das toxinas de *T. serrulatus* em sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas

3.3.1. Cromatografia em fase reversa em coluna C18 da fração VIB

A fração VIB obtida da CM-celulose-52, que contém a toxina de interesse, foi solubilizada e cromatografada. Esta fração contendo aproximadamente 1,5 mg de proteína foi dissolvida em 1mL de solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (V/V) e centrifugada a 10,015 x g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de fase reversa C-18 de 4,6 mm x 250 mm (Vydac / Grace, USA), que estava conectada ao sistema FPLC, o qual realizou leituras em comprimento de onda de 214 nm, para detecção dos componentes da amostra. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com uma solução de TFA a 0,1% (Solução A), com a vazão de 1,0 mL/min. Após 1 volume de coluna ($\pm$ 4 mL) de eluição com a solução de TFA 0,1% iniciou-se uma série de gradientes (quatro etapas) de concentração de acetonitrila até atingir 100% de uma solução de TFA 0,1% + acetonitrila 80% (Solução B), permanecendo nessa concentração por 2 volumes de coluna, para garantir a eluição de todos os componentes da amostra. Em seguida a coluna foi reequilibrada com a Solução A com mais dois volumes de coluna. As frações obtidas foram nomeadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C. Em seguida as frações de interesse foram submetidas a um terceiro passo cromatográfico utilizando uma coluna de diâmetro menor a utilizada anteriormente (fase reversa em coluna C18).

3.3.2. Cromatografia em fase reversa em coluna C18 das subfrações provenientes da fração VIB

O pico de interesse oriundo da fração VIB foi solubilizado e recromatografado com o objetivo de remover contaminantes. O mesmo após ser dissolvido em 1 mL de solução de TFA 0,1% (V/V), foi aplicado em coluna de fase reversa C-18 (Vydac/Grace, USA), porém com diâmetro menor à do processo anterior (2,1 mm x 250 mm), utilizando da vazão 0,5 mL/min. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com uma solução de TFA a 0,1%. Após 1 volume de coluna (2 mL) de eluição com a solução de TFA 0,1% iniciou-se uma série de gradientes de duas etapas de concentração de acetonitrila até atingir 100% da solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%). Os picos obtidos foram separados, nomeados, liofilizados e submetidos a outros ensaios (sequenciamento, eletroforese e espectrometria de massas), para serem avaliados quanto à “pureza” e características estruturais.

3.4. Caracterização molecular

3.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

A fração VIB, Pico 14 e o 14.2 foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molar (gel de resolução a 16,5%) na presença de agente desnaturante, dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por Schagger e von Jagow (1987).

As condições iniciais utilizadas foram de 85 V, 10 mA, e 10 W. Ao atingir o gel de resolução a corrente foi modificada para 20 mA. O tempo total da corrida foi de ± 8

horas. Posteriormente os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,02% e descorados com ácido acético a 10% (V/V) (Schagger e von Jagow, 1987).

3.4.2. Sequenciamento amino-terminal

O sequenciamento N-terminal das toxinas isoladas foi realizado no Laboratório de Toxinas Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP/USP, utilizando o Sequenciador Automático de Proteínas modelo PPSQ-33A (Shimadzu, Kyoto, Japão). O sequenciamento proteico foi realizado pelo método de degradação de Edman (Edman e Begg, 1967), que é constituído por três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. O aminoácido derivado da reação com o PITC é convertido a PTH-aminoácido, que é então cromatograficamente separado por cromatografia de fase reversa em sistema CLAE. A quantificação e identificação das amostras foram realizadas através da comparação com padrão de 25 pmol de cada aminoácido, analisado no início de cada sequenciamento.

3.4.3. Espectrometria de massas

A amostra (pico 25.2) foi solubilizada em solução de acetronitrila:água:ácido fórmico (49,8:50:0,2) e depois submetida ao espectrofotômetro Bruker Solarix 9.4T FTICR (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para a determinação da massa molecular. O espectro adquirido utilizou a faixa dinâmica de m/z 70-2000 durante o transiente para cada 2M (mega-point) resultou em 95.000 de resolução (m/z 400), depois do processamento FFT (tempo total por scan foi de 2 seg.). A calibração externa foi realizada com fragmento CID de Glu-1-Fibrinopeptídeo B. Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlexAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

3.4.4. Análises das sequências obtidas utilizando bioinformática

A sequência de aminoácidos do pico 25.2 obtido da fração VIB foi comparada com sequências de toxinas disponíveis no banco de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). O alinhamento e a porcentagem de identidade da sequência obtida com as de toxinas presentes no banco de dados foram realizados com o auxílio do *Multiple Sequence Alignment by Florence Corpet* (Corpet, 1988). As figuras foram geradas pelo ESPript (Gouet et al., 1999) e alteradas com *software* CorelDraw (versão15).

3.5. Peptídeo sintético

O peptídeo sintético nomeado Ts19 Frag-III (sequência: Lys-Ile-Lys-Glu-Lys-Ile-Ile-Glu-Ala) foi produzido pela companhia GenicBio Limited (Shanghai, China) apresentando 97,72% de pureza e massa de 1071,34Da.

3.6. Ensaios *in vitro*

3.6.1. Eletrofisiologia

Para os ensaios eletrofisiológicos foi utilizada a técnica de *voltage-clamp* com dois microelétrodos em oócitos de rãs da espécie *Xenopus laevis*. Estes foram realizados durante a bolsa BEPE (Processo FAPESP: 2013/21342-7) no período de março de 2014 à fevereiro de 2015 sob a supervisão do professor Dr. Jan Tytgat, no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

3.6.1.1. Isolamento dos oócitos de *Xenopus leavis*

As rãs da espécie *Xenopus leavis* (Fig. 10A), provenientes do biotério *Aquatic Facility* da Universidade Católica de Leuven (K.U. Leuven) (Fig. 10B), foram utilizadas para obtenção dos oócitos. Os animais foram submetidos a uma ovariectomia parcial para retirada dos oócitos. Os procedimentos utilizados para anestesia e cirurgia dos animais estão de acordo com as normas do comitê de ética local (Protocolo – LA1210239). Abaixo todas as etapas metodológicas serão detalhadas:

- Anestesia: O animal foi colocado em um recipiente contendo solução de triclaína (1g/L) por aproximadamente 20 minutos até sua completa anestesia (Fig. 10C). Para certificar a eficiência da anestesia, o teste de reflexo da pata traseira do animal foi realizado.
- Cirurgia: Uma pequena incisão (aproximadamente 1 cm) foi realizada com um bisturi, cortando a epiderme e a camada muscular da região lateral dorsal da barriga do animal. Em seguida, com o auxílio de uma pinça e uma tesoura, a remoção dos folículos de oócitos (2 mL) foi realizada. Os folículos de oócitos foram submersos em uma solução de collagenase (2,5 mg/mL), para remoção do folículo ovariano (Fig. 10D). A incisão foi fechada com fio de sutura absorvível na camada muscular.
- Oócitos: Os oócitos retirados e armazenados na solução de collagenase (2mg/mL) conforme demonstrado na Figura 10E, em seguida foram incubados por 2 horas a 28 °C, sob leve agitação. Após a completa digestão do folículo ovariano, esses foram lavados com uma solução de ND96 livre de cálcio (NaCl, 96; KCl, 2; MgCl₂, 2 e HEPES, 5; pH 7.4) e em seguida lavados novamente com a solução de ND96 contendo cálcio (NaCl, 96; KCl, 2; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 2 e HEPES, 5; pH 7.4).

Figura 10. Procedimento cirúrgico para a obtenção dos oócitos de *Xenopus laevis*. (A) *Xenopus laevis*. (B) *Aquatic Facility* da Universidade Católica de Leuven (K.U. Leuven). (C) Anestesia em solução de triclaína (1g/L). (D) Ovariectomia parcial para retirada dos oócitos. (E) Tratamento dos oócitos com collagenase (2,5 mg/mL) em solução ND96 - livre de cálcio. Fotos obtidas durante o estágio no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

3.6.1.2. Expressão dos canais para sódio (Nav) e para potássio (Kv) sensíveis à voltagem

Para a expressão dos canais para sódios dependentes a voltagem (Navs: Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e o BgNav — canal para sódio de barata da espécie *Blattella germanica*) e dos canais para potássio dependentes a voltagem (Kvs: Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.1, Kv4.2, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4, Kv7.5, Kv10.1, hERG, *Shaker*IR) foram utilizados cRNAs transcritos e sintetizados a partir de plasmídeos linearizados, utilizando o *kit* de transcrição T7 ou SP6 (mMESSAGE mMACHINE, Ambion®, USA).

Os oócitos receberam a injeção do cRNA (1-60nL) de diferentes canais com o auxílio de um micro-injetor (Fig. 11A) (Drummond Scientific, Broomall, Pennsylvania, USA). A solução ND-96 foi utilizada para encubação (em mM): 96 NaCl, 2 KCl, 2 MgCl₂,

1.8 CaCl₂, 5 HEPES (pH 7.4) suplementada com 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 180 mg/L de teofilina.

Figura 11. Injeção do cRNA nos oócitos de *Xenopus laevis*. (A) Micro-Injetor. (B) Oócitos alinhados para injeção do cRNA. Fotos obtidas durante o estágio no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

3.6.1.3. Medidas eletrofisiológicas

As medidas eletrofisiológicas foram obtidas através da técnica de *voltage-clamp* com dois microelétrodos (Fig. 12) em uma sala com temperatura ambiente de 18 - 22°C. Os dados foram obtidos através da utilização do amplificador GeneClamp 500 (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA) controlado pelo sistema de aquisição de dados pClamp (Axon Instruments, Union City, California, USA). As medidas das correntes nos oócitos foram realizadas entre 1-7 dias após a injeção.

Figura 12. Diagrama para a medida da corrente em oócito utilizando a técnica de voltage clamp with *two-microelectrode*. Figura extraída de (**GOLDIN, 2006**).

Os ensaios foram realizado com 500 nM da toxina Ts19 Frag-II, a qual foi aplicada diretamente na câmara que o oócito foi acomodado contendo uma solução de ND-96. Diferentes protocolos foram aplicados, dependendo do tipo de canal para sódio ou potássio a ser avaliado (Fig. 13).

Figura 13. Protocolos de voltagem para a medição de correntes de canais para sódio e potássio dependentes de voltagem.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados utilizando os softwares Clampfit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA) e OriginPro 9.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA).

3.6.2. Ensaio de hemólise

Para o teste de citotoxicidade da toxina Ts19 Frag-II foi utilizado o ensaio de hemólise, uma vez que as membranas dos eritrócitos apresentam alta sensibilidade a ação de componentes citotóxicos. Foi utilizado sangue de camundongo coletado em tubos contendo anticoagulante e centrifugado a $1300 \times g$ durante 15 min. O plasma foi descartado. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes ($4000 \times g$ por 10 min) com uma solução contendo 0,81% NaCl, 20 mM HEPES, pH7.4, e preparado uma suspensão de eritrócitos (0,05 %). A Ts19 Frag-II e Ts19 Frag-III foram dissolvida em suspensão de eritrócitos (100 μ L) nas concentrações de 125 nM e 125, 250, 500 e 1000 nM, respectivamente. As amostras foram incubadas em triplicatas a 37 °C, por 1 hora, e posteriormente centrifugadas. A hemólise foi mensurada no sobrenadante através da leitura de absorbância em 540 nm. Para os controles negativos e positivos, utilizou-se uma suspensão de 100 μ L de eritrócitos e uma suspensão de 100 μ L de eritrócitos contendo 0,5% de uma solução TritonX-100, respectivamente.

3.6.3. Análise do número de células e produção de citocinas em células Th17

Foi avaliado o efeito da toxina Ts19 Frag-II na modulação de células Th17. Células T CD4⁺ foram isoladas de baço e linfonodos de animais C57BL/6 naïve com um kit de separação CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD25 (α CD25-PE, BD Bioscience, Pharmingen, San Jose, California, USA) e beads Anti-PE

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). A diferenciação de linfócitos T helper foi realizada nas seguintes condições: Th17 (TGF- β : 2,5 ng/mL; IL-6: 20 ng/mL) + a toxina Ts19 Frag-II (2 μ g), na presença de um estímulo policlonal para proliferação celular (α CD3/ α CD28) durante 96 horas. Para a marcação foram utilizados anticorpos anti-CD4-APC e anti-IL-17-PE (BD Biosciences, San Diego, CA). Para cada amostra, 100.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSVerse (BD Bioscience, Pharmingen, San Jose, California, USA) e analisados no programa FlowJo (Flow Jo LLC, Ashland, Oregon, USA).

As citocinas IL-22 e IL-17 foram quantificadas no sobrenadante de cultura utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) e o kit BD OptEIAtmSet (BD Biosciences, San Diego, CA), conforme instrução do fabricante.

3.7. Ensaios *in vivo*

3.7.1. Ensaios de nocicepção

3.7.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (18 - 22g), oriundos do biotério central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto – USP. Todos os ensaios foram realizados conforme orientações dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Protocolo 197/2015) da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto – USP (Anexo 3).

3.7.1.2. Nocicepção espontânea

O experimento de nocicepção espontânea foi realizado para medir o comportamento de dor dos animais. Foram utilizados grupos de camundongos (n=5) que receberam a toxina Ts19 Frag-II diluída em solução fisiológica estéril (0.9 % NaCl) em volume final de 10 µL: Grupo 1 – solução fisiológica estéril; Grupo 2 – Ts19 Frag-II (2 µg); Grupo 3 – Ts19 Frag-II (4 µg). As soluções foram administradas através de injeção na superfície da plantar (ipl) da pata direita traseira. O comportamento espontâneo de nocicepção (tempo de lambida e suspensão da pata) foi registrado durante 35 minutos.

3.7.1.3. Nocicepção mecânica

Os experimentos de nocicepção mecânica foram avaliados conforme previamente descrito (Pinto et al., 2010a). Todos os animais foram acomodados em caixas de acrílico com superfície de malha de arame em uma sala silenciosa 30 minutos antes do desafio (adaptação comportamental). Foram utilizados grupos de camundongos (n=5) que foram desafiados com a toxina Ts19 Frag-II diluída em solução fisiológica estéril (0.9 % NaCl) em um volume final de 10 µL (para injeção intraplantar na pata direita traseira, ipl) ou 5 µL (para injeção intratecal, it): Grupo 1 - solução fisiológica estéril; Grupo 2 – Ts19 Frag-II (4 µg). Imediatamente após o desafio, os animais foram novamente colocados nas caixas de acrílico e a suspensão da pata foi medida utilizando um medidor automático (*electronic pressure-meter* - IITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA). Estímulos com diferentes forças foram aplicadas na área central da pata traseira do animal (para induzir a suspensão da mesma). O comportamento de cada animal foi avaliado durante 30 minutos antes da administração das soluções e durante 240 minutos após administração.

3.7.2. Ensaios Bioquímicos e Imunológicos

3.7.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c (20 - 25 g) oriundos do biotério central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto – USP. Grupos de animais (n=5) receberam diferentes estímulos pela via subcutânea (sc) diluídos em solução fisiológica estéril (0,9 % NaCl) em um volume final de 0,1 mL: Grupo 1 – solução fisiológica estéril; Grupo 2 – peçonha de *T. serrulatus* (TsV 20 µg); Grupo 3 – Ts19 Frag-II (4 µg); Grupo 4 – Ts19 Frag-II (8 µg). Após 6 horas do desafio, os animais foram anestesiados com 60 mg/kg de ketamina (Dopalen, Agripands Brasil Ltda®, Paulínia, Brasil) e 8 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer Animal Health®, São Paulo, Brasil). Amostras de 1 mL de sangue foram coletadas da cavidade retro-orbital, centrifugadas (700 × g) e o soro estocado a 4 °C até a realização das análises. Após a coleta, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os procedimentos realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (Protocolo 13.1.41.53.4) da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto – USP (Anexo 4).

3.7.2.2. Análises bioquímicas

Os soros obtidos como descrito no item 3.7.2.1. foram utilizados para as dosagens de ácido úrico, uréia, creatina cinase (CK), creatinina, glicose, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto

- USP, utilizando o analisador automático CT600i (Wiener Laboratórios, Rosario, Argentina) e os kits: CK-NAC UV AA líquida, CREATININA Cinética AA líquida, GOT (AST) UV AA líquida, GPT (ALT) UV AA líquida, URICOSTAT enzimático AA, UREIA UV Cinética AA, GLICEMIA Enzimática AA líquida, LDH-P UV AA líquida (Wiener Laboratórios, Rosário, Argentina). Todos os parâmetros bioquímicos foram determinados em até 24 horas após a coleta.

Para a eletroforese das proteínas séricas, amostras de 0,6 µL do soro dos animais foram aplicadas em filme de agarose 141001 (Celmigel, CELM, São Paulo, Brasil). A corrida foi realizada em tampão TRIS pH 9,5 (V/V) à uma voltagem de 90V durante 25 minutos. O gel foi corado com corante negro amido 0,2 % (V/V) e descorado em ácido acético 5 % (V/V). A densitometria do gel foi realizada utilizando um densitômetro DenGo (Qualitem, Cesário, Lange, SP, Brasil) e processada no software DenGo.

3.7.2.3. Análises imunológicas

Os soros obtidos no 3.7.2.1. foram utilizados para as análises de citocinas e óxido nítrico. As análises de citocinas foram realizadas utilizando os kits da ProcartaPlex - Affymetrix (eBioscience, Viena, Austria) conforme especificado pelo fabricante: IL-1β (EPX01A-26002-901), IL-2 (EPX01a-20601-901), IL-4 (EPX01A-20613-901), IL-5 (EPX01A-20610-901), IL-6 (EPX01A-20603-901), IL-10 (EPX01A-20614-901), IL-12p70 (EPX01A-26004-901), IL-13 (EPX01A-901), IL-17A (EPX01A-26001-901), TNF-α (EPX01A-20607-901) and IFN-γ (EPX01A-20606-901). As leituras foram realizadas no leitor MAGPIX®-Luminex (EMD Millipore®).

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada de acordo com o método de Griess (Green, 1981). O nitrito (NO²⁻) é considerado um indicador da produção de NO. A quantidade de nitrito das amostras foi avaliada através de uma curva padrão obtida de

diluições seriadas de NaNO_2 utilizando absorbância em 540 nm. A quantificação do nitrito foi realizada 48 horas após a coleta.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento da peçonha de *T. serrulatus*

4.1.1. Cromatografia em troca catiônica em CMC-52 da peçonha de *T. serrulatus*

A peçonha de Ts foi fracionada através de cromatografia de troca catiônica utilizando resina CMC-52, tendo como resultado dezoito frações: I, II, III, IV, V, VIA, VIB, VII, VIIIA, VIIIB, IXA, IXB, X, XIA, XIB, XIIA, XIIB e XIII (Fig. 14). A fração XIII demonstrou ser a toxina Ts1 (toxina majoritária), a qual representa aproximadamente 17% da peçonha solúvel.

Os valores da recuperação de cada fração da peçonha solúvel, calculados em termos de absorbância em 280 nm, são apresentados na Tabela 1.

Figura 14. Perfil cromatográfico da peçonha de *T. serrulatus* em coluna de CM-Celulose-52 em sistema FPLC. Coluna de 2,5 x 63,0 cm, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 – tampão A) 0,05 mol/L, pH 7,7. Vazão de 0,5 mL/min. A linha preta representa os valores de absorbância em 280 nm. A linha verde representa o gradiente linear de concentração do tampão B (NH_4HCO_3 0,6 mol/L).

Tabela 1. Recuperação das frações obtidas na cromatografia da peçonha bruta de *T. serrulatus*

FRAÇÕES	PORCENTAGEM DE ELUÍDO (%)
I	22,22
II	5,20
III	2,00
IV	2,81
V	2,59
VIA	4,72
VIB	1,37
VII	3,54
VIIIA	9,70
VIIIB	2,23
IXA	8,97
IXB	2,91
X	5,46
XIA	1,37
XIB	1,45
XIIA	1,05
XIIB	1,64
XIII	16.95

4.1.2. Cromatografia de fase reversa em coluna C18 da Fração VIB da peçonha de *T. serrulatus*

A cromatografia da fração VIB (1,5 mg de amostra) foi realizada utilizando a coluna C-18 (4.6 mm x 250 mm, partícula de 5 µm). O perfil cromatográfico apresentou 38 picos distintos (Fig. 15). A subfração 25 demonstrou ser a majoritária apresentando recuperação de 4,76% (em termos de absorbância em 214 nm) da fração VIB solúvel.

Figura 15. Perfil cromatográfico da fração VIB em sistema FPLC. Coluna analítica de fase reversa C-18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 μ m), previamente equilibrada com TFA 0,1 % (V/V), vazão de 1,0 mL/min. O perfil foi traçado com os valores de absorbância determinados em 214 nm (linha preta). A linha pontilhada representa o gradiente de concentração da Solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%). A subfração 25 indica o pico que contém a toxina avaliada nesse estudo.

4.1.3. Cromatografia de fase reversa em coluna C18 do pico 25 oriundo da fração VIB da peçonha de *T. serrulatus*

A cromatografia da subfração 25 obtida da fração VIB foi realizada em sistema FPLC conectado em coluna C-18 (2,1 mm x 250 mm, partícula de 5 μ m), sendo necessários 60 μ g de amostra para cada cromatografia. A cromatografia apresentou dois picos (25.1 e 25.2), sendo o 25.2 majoritário, com absorbância máxima de $\pm$ 635 mAU em 214 nm (Fig. 16). Os dois picos foram separados e liofilizados para serem submetidos à eletroforese e sequenciamento.

Figura 16. Perfil cromatográfico do pico 25 da fração VIB em sistema CLAE. Coluna analítica de fase reversa C-18 (2,1 x 250 mm), previamente equilibrada com TFA 0,1 % (V/V), vazão de 0,5 mL/min. O perfil foi traçado com os valores de absorbância determinados em 214 nm (linha preta). A linha verde representa o gradiente de concentração da Solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%).

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 17) foi realizada para observar o perfil proteico da peçonha de *Tityus serrulatus*, de suas frações, bem como do pico 25 e da toxina isolada (25.2).

A eletroforese demonstrou que os poços referentes à peçonha bruta e fração VIB apresentaram diferentes componentes proteicos (evidenciado por diversas bandas). O poço referente à subfração 25 apresentou diversos componentes com massa entre 3 a 6,5 kDa, enquanto que o pico 25.2 demonstrou possuir apenas uma banda proteica, indicativo de sua pureza.

Figura 17. Eletroforese SDS-PAGE: Peçonha de *T. serrulatus*, fração VIB, pico 25 e 25.2. Gel de poliacrilamida composto por gel de empilhamento a 5% e gel de resolução a 16,5% de acrilamida. Gel corado por Coomassie™ Brilliant Blue G-250 a 0,02% e descorado com ácido acético a 10% (V/V). Poço 1: Padrão de Massa Molar; Poço 2: Peçonha de *T. serrulatus*; Poço 3: Fração VIB; Poço 4: Pico 25 e Poço 5: Pico 25.2.

4.3. Espectrometria de massas

O pico 25.2 foi submetido à análise de espectrometria de massas, apresentando a massa molecular monoisotópica de 5534,54012 Da (Fig. 18).

Figura 18. Espectro de Massas da subfração 25.2. Espectro obtido utilizando espectrometro de massas Bruker Solarix 9.4T FTICR. No inserto: massa monoisotópica da toxina.

4.4. Sequenciamento amino-terminal

Os picos 25.1 e 25.2 foram submetidos ao sequenciamento N-terminal (Tabela 2). As sequências de aminoácidos obtidas foram comparadas com o banco de dados UNIPROT (*Universal Protein Resource*) para verificação de identidade com toxinas já descritas.

O pico 25.1 apresentou ser uma proteína com 60 resíduos de aminoácidos e 100% identidade com a Ts8, toxina já descrita na literatura. Enquanto que a análise do pico 25.2 revelou se tratar de uma nova toxina composta por 49 resíduos de aminoácidos, 6 cisteínas (responsáveis pela formação pontes de sulfeto) e com ponto isoelétrico teórico de 8,28. O banco de dados UNIPROT demonstrou que essa nova toxina apresenta 100% de identidade com parte da sequência da Ts19 e Ts19 Frag-I (Fig. 19).

Toxina	Sequência	ID (%)
Ts19	--GKGKEILGKIKEKIIIEAKDKMKAGWERLTSQSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDFKCNCIKL	100
Ts19 Frag-I	-----KIKEKIIIEAKDKMKAGWERLTSQSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDFKCNCIKL	100
Pico 25.2	-----KDKMKAGWERLTSQSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDFKCNCIKL	100

Figura 19. Alinhamento entre a Ts19, Ts19 frag-I e o pico 25.2. As cisteínas estão destacadas em preto.

4.5. Eletrofisiologia

A Ts19 Frag-II foi testada em 5 diferentes tipos de canais para sódio dependentes de voltagem. Na concentração testada (500 nM), a toxina Ts19 Frag-II não demonstrou efeito na ativação e/ou inativação de canais para sódio de mamífero (Fig. 20A) ou inseto (Fig. 20B).

A Ts19 Frag-II também avaliada em 16 diferentes tipos de canais para potássio dependentes de voltagem (Fig. 21). Na concentração de 500 nM, essa toxina apresentou ação específica e significativa em bloquear o canal Kv1.2, com dose inibitória média (IC₅₀) de 544 ± 32 nM (equação de Hill = 1.07 ± 0,5) (Fig. 22A). A corrente do canal foi retomada após a lavagem com solução ND96 (*Washing out*), demonstrando que a toxina apresenta um bloqueio reversível do canal. A curva de corrente/voltagem (*I / V*) demonstrou que a inibição do canal Kv1.2 na presença da toxina não está associada com a mudança da curva na relação corrente/voltagem (Fig. 22B).

Figura 20. Avaliação eletrofisiológica de diferentes subtipos de canais para sódio na ausência ou presença da toxina Ts19 Frag-II. Os gráfico da esquerda representam as curvas de ativação e inativação voltagem dependentes nos diferentes canais, em situação controle (círculos abertos) e após a adição da Ts19 Frag-II (círculos fechados). Os gráficos da direita são os traçados representativos da corrente do canal. **(A)** Canais para sódio de mamíferos. **(B)** Canais para sódio de inseto. (*) 500 nM da toxina Ts19 Frag-II. Os protocolos de voltagem foram detalhados no item Material e Métodos.

Figura 21. Traços representativos das correntes de diferentes subtipos de canais para potássio na ausência ou presença da toxina Ts19 Frag-II. (*) 500 nM da toxina Ts19 Frag-II. Os protocolos utilizados para cada canal estão detalhados no item Material e Métodos.

Figura 22. Características funcionais da Ts19 Frag-II em Kv1.2. **(A)** Curva de dose-resposta da Ts19 Frag-II no canal Kv1.2 utilizando a equação de Hill ($n \geq 3$, para cada concentração testada). O valor da IC_{50} foi de 544 ± 32 nM. **(B)** Relação corrente por voltagem em Kv1.2 na ausência (círculos abertos) ou na presença (círculos fechados) de 500 nM de Ts19 Frag-II ($n \geq 3$, para cada concentração testada).

O peptídeo sintetizado (Ts19 Frag-III) não apresentou ação no canal para potássio Kv1.2 na concentração de 200 nM (Fig. 23). No entanto, não foi possível testar a Ts19 Frag-III em concentrações maiores (≥ 300 nM), uma vez que o peptídeo induziu a formação de poros não seletivos impossibilitando as leituras corretas da corrente.

Figura 23. Traço representativo da corrente iônica no canal para potássio Kv1.2 na ausência ou presença da toxina Ts19 Frag-III. (*) 200 nM da toxina Ts19 Frag-II. O protocolo utilizado para este canal está detalhado no item Material e Métodos.

4.6. Ensaio de hemólise

Os dados obtidos no ensaio de hemólise demonstraram que a toxina Ts19 Frag-II não apresentou atividade hemolítica na concentração de 125 nM (Fig. 24). Por outro lado, a toxina sintética Ts19 Frag-III apresentou atividade hemolítica significativa em todas as concentrações testadas (125, 250, 500, 1000 nM).

Figura 24. Ensaio de hemólise com as toxinas Ts19 Frag-II e Ts19 Frag-III. O gráfico representa a atividade hemolítica da toxina Ts19 Frag-II (125 nM) e Ts19 Frag-III (125, 250, 500 e 1000 nM). Como controle positivo foi utilizada uma solução de 0,5% de TritonX-100; e como controle negativo foi utilizada uma suspensão de eritrócitos a 0,05%. A hemólise foi mensurada do sobrenadante através da leitura de absorbância em 540 nm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise da variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, diferença significativa em relação ao controle negativo.

4.7. Ensaio de nocicepção

Os resultados de nocicepção demonstraram que as inoculações subplantares (ipl) da toxina Ts19 Frag-II nas concentrações de 2 e 4 µg não foram capazes de induzir comportamento nociceptivo espontâneo (aumento do tempo de lambida/suspensão da pata) ou mecânico significativo, quando comparado ao controle negativo (solução fisiológica estéril - 0.9 % NaCl). O mesmo ocorreu quando a via intratecal foi utilizada (Figs. 25 e 26).

Figura 25. Nocicepção espontânea. Ensaio cinético do comportamento espontâneo de nocicepção (tempo de lambida/suspensão da pata direita traseira) após o desafio intraplantar (ipl) com a Ts19 Frag-II (2 e 4 µg) em camundongos C57BL/6 (n=5). As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, diferença significativa em relação ao controle.

Figura 26. Nocicepção mecânica. Ensaio cinético do comportamento de nocicepção mecânico após o desafio com a toxina Ts19 Frag-II (4 µg) administradas pela **(A)** via intraplantar (ipl) ou **(B)** intratecal (it) em camundongos C57BL/6 (n=5). As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao controle.

4.8. Análises bioquímicas

Foram analisados diferentes analitos/enzimas (ALT, AST, ácido úrico, creatinina, CK, Glicose, LDH e ureia) para avaliar o efeito da inoculação da toxina Ts19 Frag-II *in vivo*. A peçonha de *T. serrulatus* (20 µg) também foi inoculada em grupo de animais para efeito comparativo. A Ts19 Frag-II induziu alteração significativa nos níveis ALT (4 e 8 µg) e ureia (8 µg). Já a peçonha de Ts (TsV) induziu alteração significativa nos níveis séricos de CK, ureia e creatinina (Fig. 27).

A quantidade (%) das proteínas séricas (albumina, α -1 e α -2 globulina, β globulina e γ -globulina) dos animais também foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose seguida da densitometria do gel. A administração da toxina Ts19 Frag-II (4 e 8 µg) induziu um aumento significativo de β -globulinas, no entanto, diminui a % de γ globulinas. Já a peçonha de Ts demonstrou apenas diminuir, significativamente, a % de γ -globulina (Fig. 28).

Figura 27. Análises bioquímicas do soro dos animais que receberam a peçonha de *T. serrulatus* ou a toxina Ts19 Frag-II. Grupos de animais BALB/c (n=5) receberam diferentes estímulos pela via subcutânea (sc) diluídos em solução fisiológica estéril (0.9 % NaCl) em um volume final de 0,1 mL: Grupo 1 – solução fisiológica estéril; Grupo 2 – peçonha de *T. serrulatus* (TsV 20 µg); Grupo 3 – Ts19 Frag-II (4 µg); Grupo 4 – Ts19 Frag-II (8 µg). Após 6 horas do desafio, foram obtidos o soro dos animais para as análises bioquímicas. **(A)** Ácido úrico **(B)** Alanina aminotransferase (ALT). **(C)** Aspartato aminotransferase (AST). **(D)** Creatina cinase (CK). **(E)** Creatinina. **(F)** Glicose. **(G)** Lactato desidrogenase (LDH). **(H)** Uréia. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, diferença significativa em relação ao controle.

Figura 28. Densitometria da eletroforese de proteínas séricas dos animais que receberam a peçonha de *T. serrulatus* ou a toxina Ts19 Frag-II. (A) Perfil densitométrico representativo do controle, peçonha de Ts (TsV, 20 μg) e Ts19 Frag-II (8 μg). (B) Porcentagem (%) das proteínas séricas dos diferentes grupos (n= 4 por grupo). As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, diferença significativa em relação ao controle.

4.9. Análises imunológicas

Diferentes citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ e TNF- α) e óxido nítrico (NO) foram mensurados para avaliar o efeito da inoculação da toxina Ts19 Frag-II *in vivo*. A peçonha de *T. serrulatus* também foi inoculada em grupo de animais para efeito comparativo. A Ts19 Frag-II induziu aumento significativo de IL-6 (8 μ g), TNF- α e IL-17A (4 e 8 μ g). Já a peçonha de Ts (TsV, 20 μ g) aumentou apenas a citocina IL-6 (Fig. 29).

Figura 29. Análise de citocinas do soro dos animais que receberam a peçonha de *T. serrulatus* (20 ug) ou a toxina Ts19 Frag-II (4 ou 8 µg). Grupos de animais BALB/c (n=5) receberam diferentes estímulos pela via subcutânea (sc) diluídos em solução fisiológica estéril (0.9 % NaCl) em um volume final de 0,1 mL: Grupo 1 – solução fisiológica estéril; Grupo 2 – peçonha de *T. serrulatus* (TsV 20 µg); Grupo 3 – Ts19 Frag-II (4 µg); Grupo 4 – Ts19 Frag-II (8 µg). Após 6 horas do desafio, foram obtidos o soro dos animais para as análises de produção de diferentes citocina utilizando kits da ProcartaPlex – Affymetrix (eBioscience) e o leitor MAGPIX®-Luminex (EMD Milipore®). **(A)** IL-1β. **(B)** IL-2. **(C)** IL-4. **(D)** IL-5. **(E)** IL-6. **(F)** IL-10. **(G)** IL-12p70. **(H)** IL-13. **(I)** IL-17A. **(J)** IFN-γ. **(L)** TNF-α. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, alteração significativa em relação ao controle.

A administração de Ts19 Frag-II (8 µg) também induziu aumento significativo de nitrito (NO²⁻) no soro dos animais (que indiretamente significa aumento de óxido nítrico – NO) (Fig. 30).

Figura 30. Análise da produção de óxido nítrico (NO) do soro dos animais que receberam a peçonha de *T. serrulatus* ou a toxina Ts19 Frag-II. Grupos de animais BALB/c (n=5) receberam diferentes estímulos pela via subcutânea (sc) diluídos em solução fisiológica estéril (0.9 % NaCl) em um volume final de 0,1 mL: Grupo 1 – solução fisiológica estéril; Grupo 2 – peçonha de *Tityus serrulatus* (Tsv 20 µg); Grupo 3 – Ts19 Frag-II (4 µg); Grupo 4 – Ts19 Frag-II (8 µg). Após 6 horas do desafio, foram obtidos o soro dos animais para a análise de NO. A quantidade de NO do soro foi verificada 48 horas após o término do experimento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, alteração significativa em relação ao controle.

4.10. Análise do número de células e produção de citocinas de linfócitos Th17

O efeito da toxina Ts19 Frag-II também foi avaliado em culturas de linfócitos Th17. A toxina foi capaz de diminuir significativamente a porcentagem de diferenciação de células Th17 (Fig. 31A e B). Ainda, alterou a função dessas células, diminuindo significativamente a produção das principais citocinas (IL-17 e IL-22) produzidas por esta subpopulação de linfócito (Fig. 31 C e D).

Figura 31. Análise da diferenciação de células linfócitos Th17 estimuladas na presença da toxina Ts19 Frag-II. Células T CD4⁺ foram isoladas do baço e linfonodos de animais C57BL/6 naïve. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD25 (αCD25-PE) e beads Anti-PE. A diferenciação de linfócitos T helper foi realizada nas seguintes condições: Th17 (TGF-β: 2,5 ng/mL; IL-6: 20 ng/mL) + a toxina Ts19 Frag-II (2 μg), na presença de um estímulo policlonal para proliferação celular (αCD3/ αCD28) durante 96 horas. Como controle negativo, foram utilizadas células não estimuladas com a toxina Ts19 Frag-II. **(A)** Representativo da imunofenotipagem das células Th17 analisadas (CD4⁺ IL17⁺). **(B)** Porcentagem de diferenciação de células Th17 estimuladas na presença de Ts19 Frag-II (2 μg, n=4). As citocinas **(C)** IL-17 e **(D)** IL-22 foram quantificadas do sobrenadante celular por ELISA. As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t (B) e análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey (C e D). **p* < 0,05, diferença significativa em relação ao controle.

Díscussão

5. DISCUSSÃO

O escorpião *T. serrulatus* (Ts) têm sido extensivamente estudado pela comunidade científica, principalmente, nos últimos anos. Embora se tratar de uma espécie de escorpião nativa e restrita do Brasil, foram encontrados 345 artigos científicos no Pubmed (*US National Library of Medicine National Institutes of Health*) e mais de 3.780 documentos no Google Acadêmico¹.

Até o momento, foram identificadas 20 neurotoxinas na peçonha de Ts, sendo 17 já isoladas (Bordon et al., 2015). Neste trabalho, o perfil cromatográfico obtido na cromatografia da peçonha bruta de *T. serrulatus* apresentou dezoito frações com alta resolução, sendo a Fração XIII a majoritária (toxina Ts1), conforme dados da literatura (Arantes et al., 1989). Adicionalmente, foi realizado o cálculo da recuperação de cada fração com o objetivo de avaliar o rendimento do fracionamento da peçonha de Ts, o qual demonstrou ser semelhante a dados anteriores (Cerni, 2012). Assim, os resultados obtidos na cromatografia catiônica em coluna de CMC-52 comprovaram a sua eficiência da reprodução do método quando comparados com dados já descritos na literatura (Cerni et al., 2014).

A fração VIB foi escolhida como foco de estudo, uma vez que não havia sido ainda explorada pelo grupo. Embora o estudo dessa fração seja desafiador, devido à baixa quantidade presente na peçonha solúvel (1,37%), o perfil cromatográfico obtido sugeriu indícios da presença de possíveis novos componentes ainda não descritos na peçonha de Ts.

¹ Busca utilizando *Tityus serrulatus* em 28/08/2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> e <https://scholar.google.com.br/>).

As 38 subfrações obtidas na cromatografia de fase reversa da fração VIB demonstraram a complexidade de componentes presentes na peçonha de Ts. A eletroforese da fração VIB demonstrou que essa possui duas toxinas em maiores quantidades, sendo ambas de baixa massa molar (massas próximas a 6,5 kDa).

Apesar da realização de dois processos cromatográficos (troca catiônica e fase reversa), a subfração 25 (majoritária da fração VIB) ainda apresentou contaminantes (evidenciados por mais de uma banda proteica após eletroforese), necessitando assim a realização de mais um processo cromatográfico. O terceiro passo cromatográfico (fase reversa) com uma coluna de diâmetro menor resultou em dois picos (25.1 e 25.2).

O pico 25.1 demonstrou ser a toxina Ts8 (dados de sequenciamento e espectrometria de massas). Essa toxina, também conhecida como TsTx-K β já é conhecida na peçonha de Ts desde a década de 90 (Blaustein et al., 1991; Rogowski et al., 1994).

O pico 25.2 também foi submetido análises de sequenciamento e espectrometria de massas. O resultado do sequenciamento amino-terminal demonstrou que o pico 25.2 apresentou uma sequência primária constituída por 49 resíduos de aminoácidos. Utilizando o banco de dados UNIPROT foi possível verificar que o pico 25.2 se tratava de um componente ainda não descrito. Essa nova toxina isolada da peçonha do Ts demonstrou ter sequência idêntica a parte C-terminal da Ts19 (Uniprot ID:P86822), toxina já descrita na literatura, cuja a sequência foi determinada através da técnica de transcriptoma da glândula da peçonha de Ts (Alvarenga et al., 2012). Assim, a nova toxina foi nomeada com Ts19 Frag-II (Ts19 Fragmento II), devido ao fato da Ts19 Frag-I (constituída por 58 resíduos aminoácidos) já ter sido identificada pelo nosso grupo (Lima et al., 2015) (Fig. 32). A nova toxina, Ts19 Frag-II, foi depositada no banco de dados UNIPROT (ID: P86822). A existência dessas toxinas derivadas da toxina Ts19

(identificada por transcriptoma) evidencia que as toxinas obtidas da tradução de RNAs presentes na glândula de peçonha podem sofrer processamento (clivagem) pós-transducional, gerando diferentes toxinas com funções muitas vezes divergentes (Carmo et al., 2014). Nesse sentido, baseados em nossos resultados e em dados da literatura, sugerimos que na glândula de peçonha ocorre um tipo de processamento pós-transducional, denominado neste estudo de *post-splitting* (divisão posterior ou divisão tardia). A hipótese proposta é que a toxina Ts19 seja transcrita e traduzida e, ainda na glândula, processada em 3 diferentes toxinas (ou fragmentos) denominados Ts19 Frag-I, Ts19 Frag-II e Ts19 Frag-III (Cerni et al., 2015). Além de estrutura primária diferente, esses fragmentos ainda apresentariam funções diferentes, que serão discutidas adiante.

Os resultados de espectrometria de massas evidenciaram que a toxina Ts19 Frag-II apresenta uma massa molecular monoisotópica de 5534,54012 Da, enquanto que a massa molecular monoisotópica teórica para toxina é de 5518.552 Da. A diferença de 16 Da entre a massa teórica e a experimental pode ser atribuída à presença de uma oxidação em algum aminoácido da sequência (adição de um átomo de oxigênio, provavelmente na cadeia lateral de metionina, triptofano ou histidina) (Fig. 33). Assim, a toxina oxidada pode apresentar massa teórica de 5534,547 Da, destacando que a diferença de menos de 0,007 Da, quando comparada com a massa experimental (correspondendo somente a 1,2 ppm). A oxidação do peptídeo resulta na adição de um átomo de oxigênio a aminoácidos suscetíveis do peptídeo (ex: metionina, cisteína, histidina ou triptofano). Esse processo pode ocorrer durante a preparação da amostra, purificação ou análise de espectrometria de massas. Estudos demonstraram que a ocorrência desta modificação pode estar relacionada com a força do campo magnético

da agulha do *eletrospray* e com a vazão que a solução passa pelo capilar (Guan et al., 2003; Morand et al., 1993; Schey e Finley, 2000).

Figura 32. Alinhamento entre as toxinas Ts19, Ts19 Frag-I, Ts19 Frag- II e Ts19 Frag- III e representação esquemática do processamento pós-transducional da toxina Ts19 (pos-splitting). (A) Alinhamento da sequência de Ts19 e dos fragmentos I, II e III. **(B)** Representação esquemática da toxina Ts19 nativa comparada aos fragmentos (I,II e III). **Azul:** N-terminal (8 resíduos de aminoácidos) da Ts19, toxina encontrada exclusivamente em transcriptoma. **Laranja:** sequência de aminoácidos da Ts19 Frag-II. **Verde:** sequência de aminoácidos da Ts19 Frag-III. NHD - domínio helicoidal N-terminal (do inglês, *Domain Helical N-terminal*). CCD - domínio CSαβ C-terminal (do inglês *C-terminal CSαβ Domain*)

Figura 33. Espectro de massas da subfração 25.2. Espectro obtido utilizando espectrômetro de massas Bruker Solarix 9.4T FTICR; aumento (zoom) com a massa exata da toxina Ts19 Frag-II. Cada símbolo de asterico (*) corresponde a adição de um átomo de oxigênio proveniente da oxidação de um resíduo de metionina, triptofano ou histidina.

A Ts19 Frag-II foi classificada através de homologia de sequências de resíduos de aminoácidos como uma nova integrante da classe (subfamília) β -KTxs, sendo a segunda toxina de Ts pertencente a esta família (Ts8 – Uniprot ID: P69940, foi a primeira). As toxinas pertencentes às classes de β -KTxs são caracterizadas por possuírem de 59-75 resíduos de aminoácidos, 3 pontes dissulfeto e 2 domínios estruturais (α -hélice no N-terminal e o C-terminal rico em cisteínas), com um motif CS $\alpha\beta$ (Carrithers et al., 2011). Análises de sequências mostraram que esses peptídeos podem ser classificados em três classes (subfamílias) distintas: (1) TsTX- $\kappa\beta$, (2) BmTX $\kappa\beta$ e (3) Scorpine-like (Fig. 34) (Gao et al., 2010; Hu et al., 2006).

Embora a Ts19 Frag-II apresente 49 resíduos de aminoácidos, quantidade inferior à necessária para ser classificada como β -KTxs (59-75 resíduos de aminoácidos), essa toxina é originária da Ts19 Frag-I, que possui 58 resíduos de aminoácidos. Assim, com a identificação da Ts19 Frag-II é possível sugerir que a

definição de toxina para pertencer a classe β -KTxs seja atualizada (49-75 resíduos de aminoácidos).

A família das β -KTxs apresentam uma estrutura composta por peptídeos com dois domínios: domínio helicoidal N-terminal (NHD, do inglês *N-terminal helical domain*) e domínio CS $\alpha\beta$ C-terminal (CCD, do inglês *C-terminal CS $\alpha\beta$ domain*). Esses domínios apresentam atividades diferentes entre si. Enquanto o CCD está relacionado à neurotoxicidade, o NHD é responsável pela atividade citolítica.

Toxina		Sequência	Ts19 ID (%)
Classe 2	Ts19 Frag-II	-----KDKMKAGWERLTSQSEYACPA---IDKFCEDHCA-AKKAVGKCDDFKNCIKL----	100
	TcoKIK	-----KIKSGWERLTSESEYACPAI---DKFCEDHCA-AKKAVGKCDDFKNCIKL----	93.62
	TtrKIK	--GKGKEVLGKIKDKLIEA-KDKIKSGWERLTSQSEYACPAI---EKFCEDHCA-AKKAVGKCDDFKNCIKL----	90.88
	BmTxK β	--GRGKEIMKNIKEKLTEV-KDKMKHSWNKLTSMSEYACPVI---EKWCEDHCA-AKKAIGKCEDTECKCLKLRK--	73.41
Classe 3	Opiscorpine-1	KWFNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEKGYCHGTCKKCGVPLSY-	28.57
	Heteroscorpine-1	GWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAKGEFCCVANIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTCKKCGKPLSY-	28.57
	Scorpine	GWINEEKIQKKIDERMGNTVLGGMAKAIVHKMAKNEFCCMANMDMLGNCEKHCQ-TSGEKGYCHGTCKKCGTPLSY-	26.53
	HgeScplp1	GWMSEKKVQGILDKKLPEGIIRNAAKAIVHKMAKNQFCFANVDVKGDCRHRCK-AEDKEGICHGTCKKCGVPIISYL	22.45
Classe 1	AaTxK β	-GLREKHVQKLVKYAVPVGTLRLTIQTAVHKLGKTOFGCPAY---QGYCDDHCDDIKKEEGFCHGFCKKCGIPMGF-	30.61
	BmTxK β 2	-GLREKHFQKLVKYAVPEGLRTIIQTAVHKLGKTOFGCPAY---QGYCDDHCDDIKKEEGFCHGFCKKCGIPMGF-	30.61
	TsTxK β	-GLREKHVQKLVAL-IPNDQLRSILKAVVHKVAKTOFGCPAY---EGYCNHCDIERKDGEGHGFCKKCAKD----	28.57
	Tco β KTx	-GLREKHVQKLVAL-IPNDQLRSILKAVVHKVAKTOFGCPAY---EGYCNHCDIERKDGEGHGFCKKCAKD----	26.53
		Domínio helicoidal N-terminal Domínio CS $\alpha\beta$ C-terminal	

Figura 34. Classificação da Ts19 Frag-II. Alinhamento da toxina Ts19 Frag-II com múltiplas sequências de membros representativos das três classe da família β -KTx. ID: identidade em porcentagem. As cisteínas estão destacadas em preto.

Baseando-se na atividade CCD (neurotoxicidade ou ação em canais iônicos), a ação da toxina Ts19 Frag-II (500 nM) foi primeiramente avaliada em canais iônicos voltagem dependentes. Após a análise em 16 subtipos de canais para potássio (Kvs) e em 5 tipos para sódio (Navs) dependentes de voltagem, a Ts19 Frag-II demonstrou bloquear seletivamente apenas o canal Kv1.2 ($IC_{50} = 544 \pm 32$ nM). A ação em canais para potássio (Kvs) já era esperada, uma vez que toxinas pertencentes à classe β -KTxs são descritas na literatura como bloqueadoras desses canais (Diego-Garcia et al., 2008;

Legros et al., 1998). Frequentemente agrupadas com as α -KTx na árvore filogenética, as β -KTxs de classe 2 apresentam ação bloqueadora em Kvs atribuída à presença de um *motif* Gly-Lys-Cys (presente na Ts19 Frag-II), o qual também é normalmente encontrado na família α -KTx. O fato da Ts19 Frag-II ter sua ação bloqueadora específica apenas em um tipo de canal (Kv1.2) é bastante interessante, já que a maioria das toxinas apresentaram ação em dois ou mais tipos de canais (Cerni et al., 2014; Cologna et al., 2011). Embora esse dado seja notável, ele não é considerado singular, uma vez que a toxina mesomartoxin proveniente do escorpião *Mesobuthus martensii* já havia sido descrita como bloqueadora específica de Kv1.2 na literatura (Wang et al., 2015).

A família de canais Kv1.x pode ser encontrada no corpo celular, axônios, terminal sináptico e dendritos proximais de neurônios, sendo os canais Kv1.2 e Kv1.4 os mais expressos. No entanto, K1.1 e K1.2 estão intimamente correlacionados a epilepsia: animais nocaute de *kcna 1* e *kcna2* (gene do tipo Kv1.1 e Kv1.2, respectivamente) apresentam epilepsia e, apesar serem canais similares, são relatados em diferentes modelos de doenças (Robbins e Tempel, 2012). No entanto, ainda são necessários maiores estudos de localização e função dos canais K1.1 e Kv1.2, podendo a Ts19 Frag-II ser utilizada como uma potencial ferramenta molecular nestes estudos, devido a sua especificidade por Kv1.2.

Em relação à atividade citolítica da região NHD, ficou demonstrado que a Ts19 Frag-II não possui atividade hemolítica. Também não foi capaz de induzir a formação de poros na membrana celular de oócitos (*leaking cells*). Esse resultado já era esperado, uma vez que a toxina não apresenta em sua sequência de aminoácidos a região N-terminal, responsável pela atividade citolítica.

Os resultados obtidos corroboram com um estudo previamente publicado por Diego-Garcia (2008), que analisou a região C-terminal do peptídeo HgeScplpDig (do resíduo 33 ao 76), obtido através da digestão química da toxina do escorpião *Hadrurus gertschi*. O trabalho demonstrou que o peptídeo é capaz de bloquear canais Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3 (200 nM), por outro lado, a ação citolítica foi significativamente reduzida quando comparada com a toxina nativa (sem a digestão). Adicionalmente, foi encontrado na peçonha de *H. gertschi* um peptídeo (Hge36) que possui os 25 primeiros resíduos de aminoácidos idênticos ao do N-terminal da HgeScplp1 (do resíduo 29 ao 53). Similar ao HgeScplpDig, o Hge36 apresentou baixa atividade citolítica, porém, foi capaz de bloquear canais Kv1.1 (Diego-Garcia et al., 2008).

Baseado nesses resultados sugere-se que a Ts19 é uma toxina que está continuamente sendo processada na peçonha para produção de diferentes peptídeos, visando ampliar o arsenal de toxinas do escorpião. Para provar essa teoria (*post-splitting*), sintetizamos o peptídeo presente na região C-terminal da toxina Ts19 Frag-I (9 aa), porém ausentes na Ts19 Frag-II, o qual foi nomeado de Ts19 Frag-III. A escolha de sintetizar apenas esses 9aa e não a região CCD (*C-terminal CSαβ domain*) inteira da Ts19 foi devido a essa toxina nunca ter sido isolada da peçonha de Ts. Conforme esperado, o peptídeo Ts19 Frag-III demonstrou potente ação citolítica (ensaio de hemólise). No entanto, esse peptídeo não demonstrou capacidade de bloquear canal do tipo Kv1.2, quando testado na concentração de 200 nM. Não foi possível avaliar a toxina Ts19 Frag-III em maiores concentrações (≥ 300 nM), uma vez que as tentativas induziram a formação de poros não seletivos, os quais foram detectados através do vazamento da corrente elétrica nos oócitos (*leaking cells*).

Infelizmente, não foram realizados testes funcionais com a toxina Ts19 Frag-I para comprovar a expectativa de que ela apresentaria as duas atividades biológicas:

neurotóxica e citolítica. Durante as tentativas de purificação da Ts19 Frag-I, houve alguns desafios que impossibilitaram esses testes. Além do fato dessa toxina apresentar pequena porcentagem na recuperação na peçonha, a Ts19 Frag-I, muitas vezes, não estava presente na sua fração de origem, dependendo do lote de peçonha utilizado. Esse fato contribuiu para a elaboração da hipótese de que os fragmentos da Ts19 são processados frequentemente na peçonha, o que justificaria a ausência da Ts19 Frag-I em alguns lotes de amostra. Assim, o processamento da toxina Ts19 Frag-I implicaria na presença apenas das toxinas Ts19 Frag-II e III na peçonha.

Seguindo o raciocínio acima, durante o processo evolutivo, o escorpião *T. serrulatus* desenvolveu uma eficiente engenharia química de produção de toxinas pós-transducional (*pos-splitting*). Desta maneira, utilizando um mesmo transcrito, o escorpião pode se defender contra microrganismos (toxina com ação citolítica) e atacar as presas (toxina com efeito bloqueador de Kv1.2). Essas observações corroboram com a suposição de que Ts19 Frag-II e Ts 19 Frag-III poderiam ser toxinas maduras: (i) Ts19 Frag-II mantêm a função C-terminal (bloqueadora de Kv1.2); (ii) Ts19 Frag-III apresenta o N-terminal com efeito citolítico; e (iii) A Ts19 Frag-I poderia apresentar as duas funções enfraquecidas, conforme já relatado na literatura com a toxinas do escorpião *H.gertschi* (Diego-Garcia et al., 2008). Porém, o mecanismo enzimático do *pós-splitting* precisa ser melhor elucidado, embora estudos recentes demonstrem que proteases presentes na glândula de Ts (predominantemente metalloserrulases), são já conhecidas por reconhecerem e clivarem sítios com resíduos básicos (ex: lisina e arginina), como é o caso das toxinas Ts19 Frag-I e III que se iniciam com resíduos básicos de lisina (K ou Lys) (Carmo et al., 2014).

Além dos ensaios eletrofisiológicos, outros ensaios para avaliar as possíveis atividades biológicas da nova toxina Ts19 Frag-II também foram realizados, a fim de caracterizar funcionalmente essa toxina.

Primeiramente, foram realizados ensaios de dor ou nociceptivos. A maioria das vítimas (95.5 %) reporta dor intensa e persistente como principal manifestação do quadro de envenenamento, independente da gravidade (Bucaretschi et al., 2014). Na peçonha de *T. serrulatus* existem várias toxinas descritas como responsáveis por induzir resposta hipernociceptiva, principalmente as com ação em canais para sódio. Estudos demonstraram que canais para sódios periféricos Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 são responsáveis pela fisiopatologia de diferentes síndromes de dor (Dib-Hajj et al., 2009; Habib et al., 2015). Nesse contexto, estudos de eletrofisiologia com as toxinas Ts1, Ts2, Ts4 e Ts5 isoladas do escorpião Ts, demonstraram ação nos canais para sódio supracitados, indicando o papel importante dessas toxinas na dor intensa provocada pela picada do escorpião. Por outro lado, o canal para potássio Kv4.2 também foi relacionado com a resposta nociceptiva (Hu et al., 2006) e sabe-se que a toxina Ts8 é capaz de bloquear este canal. Em ensaios nociceptivos, a toxina Ts8 induziu hiperalgesia espontânea e mecânica por até 15 minutos, quando administrada via intraplantar, além de apresentar uma resposta hiperalgésica prolongada quando inoculada pela via intratecal (Pucca et al., 2016b). Embora a toxina Ts19 Frag-II não apresente efeito no canal Kv4.2, a avaliação de sua ação na nocicepção foi realizada, uma vez que essa toxina está classificada na mesma família que a Ts8 (β -KTx). A toxina Ts19 Frag-II não apresentou alteração na resposta nociceptiva de animais em ensaios de dor mecânicos e/ou espontâneos, embora tenha contribuído para o entendimento da ação da toxina Ts8, ou seja, a toxina Ts19 Frag-II

foi utilizada como controle negativo na resposta a dor induzida pela toxina Ts8 (dados recentemente publicados) (Pucca et al., 2016b).

O presente trabalho também avaliou as possíveis alterações bioquímicas induzidas pela toxina Ts19 Frag-II *in vivo*, além de utilizar a peçonha Ts como controle. A peçonha de Ts não foi capaz de induzir alterações nos níveis de alanina aminotransferase (ALT). ALT é encontrada predominantemente no citoplasma do hepatócito. Embora estudos farmacocinéticos em ratos demonstrem que as toxinas de Ts alcancem o fígado em altas concentrações após 15 minutos da inoculação, não existem ainda relatos de hepatotoxicidade relacionada à peçonha deste escorpião (Nunan et al., 2004; Nunan et al., 2003). Entretanto, a toxina Ts19 Frag-II (4 e 8 µg) aumentou significativamente os níveis de ALT no soro dos animais, indicando um possível dano hepático. O dano hepático induzido por acidentes escorpiônicos é raro, havendo poucos relatos na literatura. O trabalho de Pipelzadeh e colaboradores é um dos poucos estudos que verifica em ratos o dano hepático induzido pela peçonha do escorpião *Hemiscorpius lepturus* (Pipelzadeh et al., 2006). Desta forma, devido ao aumento de ALT, a hepatotoxicidade induzida pela toxina Ts19 Frag-II requer estudos mais aprofundados, como histologia do fígado. Por outro lado, tanto a toxina Ts19 Frag-II como a peçonha de Ts não induziram alterações significantes dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST). Embora alguns estudos já tenham demonstrado leve alteração desta enzima após envenenamento por Ts em camundongos (Pucca et al., 2012) e cães (Ribeiro et al., 2010). Mesmo assim, nota-se um pequeno aumento da enzima quando os camundongos receberam a peçonha de Ts. Assim, assumimos que, provavelmente, um aumento do número de animais poderia revelar significância estatística. AST é uma enzima encontrada no citoplasma e mitocôndrias do músculo

cardíaco, músculo esquelético, hepatócito e, em menor quantidade, no pâncreas e rins. Assim, alterações desta enzima não significam dano celular essencialmente do fígado.

Em relação à creatina cinase (CK), verificou-se que os níveis séricos desta enzima foram significativamente aumentados pela peçonha de Ts, o que não foi observado quando a toxina Ts19 Frag-II foi utilizada. Trabalhos anteriores descrevem o aumento de CK após o envenenamento pela peçonha de Ts (Bucarechi et al., 1995; Correa et al., 1997; Ribeiro et al., 2010). A enzima CK está presente em músculos esqueléticos (CK-MM), cardíacos (CK-MB) e no cérebro (CK-BB). Alterações cardiovasculares seguidas de lesão cardíaca estão frequentemente associadas ao envenenamento grave por Ts. A ocorrência de miocardite após o envenenamento pode ser atribuída a diversos fatores: grande liberação de catecolaminas, ação direta das toxinas nas fibras cardíacas e efeito sistêmico de citocinas (Gueron e Yaron, 1970; Ismail, 1995; Magalhaes et al., 1999; Meki et al., 2003; Meki e Mohey El-Dean, 1998; Pucca et al., 2015a; Raab, 1960; Sofer et al., 1996). Assim, a alteração de CK sérica é predominantemente devida aos danos impostos ao músculo cardíaco.

Análises de ureia e creatinina também foram realizadas. A peçonha de Ts induziu aumento dos dois analitos indicando disfunção renal nos animais, conforme já reportado (Pinto et al., 2010b; Pucca et al., 2012). Estudos histológicos em ratos demonstram que a peçonha de Ts e sua toxina majoritária (Ts1) induzem congestão renal com pequenas áreas hemorrágicas (Correa et al., 1997). Em relação à Ts19 Frag-II, esta foi apenas capaz de aumentar os níveis séricos de ureia quando utilizada em maior quantidade (8 µg). Em geral, ambos os componentes (ureia e creatinina) se alteram concomitantemente frente ao dano renal. Embora não foi detectada significância estatística no aumento da creatinina sérica quando os animais receberam a toxina Ts19 Frag-II, talvez pequenos ajustes experimentais (maior tempo antes da

análise, aumento do número de camundongos ou aumento da quantidade de toxina) poderiam modificar o resultado, já que nota-se um aumento de ureia nos animais que receberam a toxina, quando comparado ao controle negativo. De qualquer forma, o aumento de ureia já indica uma possível alteração renal.

A peçonha de Ts, assim como a toxina Ts19 Frag-II não induziram modificações significantes nos níveis séricos de glicose, lactato desidrogenase (LDH) e ácido úrico. A hiperglicemia já foi reportada após o envenenamento pela peçonha de Ts. No entanto, ela é observada após 1 hora do desafio (Pucca et al., 2012) e, no nosso estudo, o soro foi coletado após 6 horas da administração da peçonha, o que poderia resultar em níveis de glicose já restabelecidos (níveis basais). A ausência de alterações nos níveis de LDH e ácido úrico após no envenenamento por Ts também já é conhecida e confirmam nossos resultados (Ribeiro et al., 2010).

As proteínas séricas dos animais também foram analisadas. A toxina Ts19 Frag-II induziu um aumento de β -globulinas (4 e 8 μ g) e uma diminuição de γ -globulinas. As β -globulinas são representadas por diferentes proteínas que incluem transferrina, hemopexina, beta lipoproteína, IgA e componente C3 do complemento, dos quais a transferrina e o C3 são considerados os mais importantes do ponto de vista clínico (Naoum e Naoum, 2012). Especula-se que o aumento da porcentagem de β -globulinas pode ter sido ocasionado pelo aumento de C3. Estudos demonstram que a produção aumentada de TNF- α (que será discutida a seguir) é capaz de aumentar a produção dos componentes C3 e C4 do complemento (Ueda et al., 1996). Ainda, neutrófilos ativados via TNF- α são capazes de produzir C3. No entanto, estudos complementares ainda são necessários para explicar este fenômeno. Em outros estudos, a peçonha de Ts também induziu um aumento de β -globulinas, utilizando a via intraperitoneal, ratos Swiss e dose de 250 μ g/Kg de peçonha. No entanto, nesse mesmo

estudo, também foi evidenciado o aumento de albumina, α -globulinas e γ -globulinas (Pessini et al., 2003). Por outro lado, a toxina Ts19 Frag-II e a peçonha de Ts induziram uma diminuição na porcentagem de γ -globulinas. A banda de γ -globulinas consiste em IgM, IgG e proteína C reativa (neste caso não observamos fibrinogênio porque utilizamos o soro e não o plasma). Embora não ser previsto um aumento de anticorpos (γ -globulinas) após 6 horas de desafio, era esperado um aumento dessa banda devido a proteína C reativa (proteína inflamatória de fase aguda). Dessa maneira, este resultado deverá ser posteriormente explorado.

A capacidade da toxina Ts19 Frag-II em modular as respostas imunológicas também foi avaliada. Para isso foram avaliadas 11 citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α e IFN- γ) e óxido nítrico (NO). Sabe-se que tanto a peçonha como toxinas isoladas de Ts são capazes de induzir alterações imunológicas em murinos (Pessini et al., 2003; Pessini et al., 2008; Zoccal et al., 2011b; Zoccal et al., 2013b) e humanos (Fukuhara et al., 2003b). Em nossos estudos, a peçonha de Ts foi capaz de aumentar significativamente apenas a produção da citocina IL-6. A literatura demonstra que *in vitro* a peçonha pode aumentar a produção das citocinas IL-6 e TNF- α por macrófagos peritoneais (J744.1) após 24 h de cultura (Zoccal et al., 2011b). Já *in vivo*, a administração intraperitoneal da peçonha (250 μ g/Kg) em camundongos Swiss induziu aumento de IL-6 e TNF- α após 4 horas da inoculação, voltando a níveis normais após 8 horas do desafio. Assim, como nesse estudo o soro foi coletado após 6 horas da administração da peçonha, pode ser que isso impossibilitou a detecção do aumento da citocina TNF- α . O uso de um diferente modelo murino (BALB/c), as diferentes concentrações da peçonha e a variação entre lotes de peçonha também são variáveis que podem ter influenciado nos diferentes resultados.

Com relação à toxina Ts19 Frag-II, essa foi capaz de induzir aumento significativo das citocinas IL-6 (8 µg), TNF-α e IL-17A (4 e 8 µg). Todas são consideradas citocinas pró-inflamatórias e apresentam diferentes funções (pleitropismo) e redundância (diferentes citocinas desempenhando uma mesma função) na resposta imune, o que é comum entre classes de citocinas. A citocina IL-6 é produzida principalmente por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Entre suas principais funções, destacam-se sua capacidade de induzir febre através da produção de prostaglandina (PGE2) pelo hipotálamo, além de induzir aumento de proteínas de fase aguda e vasodilatação (Abbas et al., 2012; Scheller et al., 2011; Villiger et al., 1991). A citocina TNF-α é produzida, majoritariamente, por macrófagos, embora já tenha sido detectada em culturas de linfócitos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e neurônios. Considerada a citocina reguladora máster da resposta pró-inflamatória (Maini et al., 1995), ela é capaz de induzir vasodilatação, aumento de selectinas e integrinas no endotélio vascular (levando a migração de neutrófilos) e aumento de mediadores lipídicos como PGE2 e fator ativador de plaquetas (PAF) (Abbas et al., 2012), além de amplificar a dor local via aumento da expressão do canal Nav1.7 (Tamura et al., 2014). Não é ao acaso que, atualmente, as terapias avançadas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas (como artrite reumatoide e doença de Crohn) têm como alvo essas duas citocinas (IL-6 e TNF-α) com o uso de anticorpos monoclonais. É o caso do anticorpo monoclonal anti-TNF-α Adalimumab (Humira®, AbbVie Inc.) e o anti-IL-6 Tocilizumab (Actemra®, Genentech). Nesse sentido, devido a toxina Ts19 Frag-II aumentar essas duas citocinas, podemos concluir que trata-se uma toxina pró-inflamatória.

O aumento da citocina IL-17A pela toxina Ts19 Frag-II pode ser considerado um resultado inédito. Até o momento, essa citocina ainda não havia sido avaliada após envenenamento por Ts. Desde 1986 e até algum tempo atrás, linfócitos T CD4+

(auxiliares ou *helpers*) eram divididos em duas subpopulações Th1 ou Th2, sendo diferenciados por distintos padrões de citocinas, fatores de transcrição e funções (Mosmann et al., 1986). Células Th1 produzem IFN- γ e são reguladas pela produção de IL-12 via o fator de transcrição Tbet, sendo importantes para a resposta imunológica contra patógenos intra e extracelulares. Já as células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e são reguladas pelo fator de transcrição GATA3, sendo importantes para resposta a parasitas, alérgenos e controle da resposta Th1 (Abbas et al., 2012; Zhu et al., 2010). Posteriormente, foi descrito uma terceira subpopulação de linfócito T, denominada células T regulatórias ou Tregs. Apesar da existência de células T supressoras ser conhecida desde a década de 90 (Gershon e Kondo, 1970), as células Tregs foram realmente caracterizadas, incluindo seu fator de transcrição Foxp3⁺, apenas em 2001, demonstrando serem importantes no controle das respostas imunes e na prevenção da autoimunidade (Brunkow et al., 2001; Sakaguchi et al., 2008; Shevach, 2001).

A célula Th17 foi descoberta logo depois, quando Zhang *et al.* (2003), estudando o modelo murino de esclerose múltipla (EAE, *experimental autoimmune encephalopathy*), verificou que a resposta imunopatológica da EAE era independente de IL-12, ou seja, não era ocasionada por uma resposta Th1 (Zhang et al., 2003). Mas foi em 2006 que as células Th17 foram realmente caracterizadas, destacando a importância das citocinas IL-6 e TGF- β na sua diferenciação e na ativação do seu fator de transcrição ROR γ t (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). As células Th17 estão envolvidas com a resposta imunológica às bactérias extracelulares, fungos e autoimunidade. As principais citocinas produzidas por células Th17 são IL-22, IL-17A e IL-17F (Swain et al., 2012). As citocinas IL-17A e IL-17F compartilham 50% de homologia, assim apresentam ações biológicas semelhantes. A citocina IL-17A induz

a produção de citocinas inflamatórias por outras células (TNF- α , IL-1, IL-6, G-CSF e GM-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2 e CCL7), peptídeos antimicrobianos (defensinas) e produção de metaloproteases (MMP1, MMP3 e MMP13) por fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, resultando em um recrutamento acentuado de monócitos e neutrófilos para o local inflamado (Iwakura et al., 2011). Já a citocina IL-17F é uma fraca produtora desses componentes inflamatórios, o que explica a preferência dos estudos em quantificar a citocina IL-17A. No entanto, apesar de as células Th17 ser a fonte de IL-17 mais estudada, existem outras células capazes de produzir esta citocina. Células da imunidade inata como neutrófilos, monócitos, células matadoras naturais (NK, *natural killers*) e células linfoides indutoras (LTis, *lymphoid tissue inducer*), demonstraram ser fontes de IL-17A e IL-17F (Cua e Tato, 2010). Nesse sentido, o aumento da citocina IL-17A no soro dos animais induzido pela toxina Ts19 Frag-II (4 e 8 μ g) poderiam ser resultado da ativação de células Th17 ou de células da imunidade inata. No entanto, devido ao curto tempo decorrido da inoculação até a coleta de soro (6 horas), especulamos que seja resultado de células da imunidade inata.

Para verificar se a toxina Ts19 Frag-II estaria ativando a resposta Th17, ensaios *in vitro* com culturas de células T CD4⁺ foram realizados. Interessantemente, os resultados demonstraram que a toxina Ts19 Frag-II (2 μ g) induziu diminuição significativa da diferenciação de células Th17. Ainda, foi capaz de modular a função dessas células, ou seja, diminuiu a produção das citocinas IL-17A e IL-22. Nesse contexto, os resultados comprovam que o aumento de IL-17 no soro dos animais é resultado da ativação de células inatas tais como neutrófilos, monócitos, células NK e LTis. De qualquer forma, o aumento da produção das citocinas IL-6, TNF- α e IL-17 induzidas pela toxina, demonstram o grande potencial inflamatório da Ts19 Frag-II. No

entanto, os resultados supressores da Ts19 Frag-II *in vitro* deverão ser mais explorados, uma vez que poderiam ser utilizados em modelos de doenças autoimunes.

O óxido nítrico (NO) também foi avaliado no soro dos animais. O NO apresenta funções importantes na fisiopatologia de várias doenças, bem como nos envenenamentos escorpiônicos (Grisham et al., 1999; Pessini et al., 2006; Petricevich, 2010; Petricevich e Pena, 2002). Ainda, em pequenas quantidades, o NO contribui para a integridade e função de membranas, participa da neurotransmissão e regula a expressão gênica em células do sistema imune (Bredt e Snyder, 1994). A peçonha de Ts não foi capaz de induzir aumento da produção de NO *in vivo*, embora exista trabalho que demonstre seu aumento *in vitro* (Zoccal et al., 2011b). Por outro lado, a toxina Ts19 Frag-II (8 µg) aumentou significativamente a produção de NO. Recentemente, nosso grupo relatou que a toxina Ts19 Frag-I é capaz de induzir a liberação de NO no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais murinos (J774.1) (Lima et al., 2015). Sabendo que a toxina Ts19 Frag-II difere da Ts19 Frag-I em apenas 9 resíduos de aminoácidos, este resultado já era esperado. Assim, os efeitos de toxinas β-KTx na resposta inflamatória via NO deve ser melhor explorada, a fim de entender o papel destas moléculas no quadro de envenenamento.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A toxina Ts19 Frag-II foi pela primeira vez isolada, sua molécula caracterizada (sequência primária e massa) e classificada (β -KTx). Ainda, baseando-se nos resultados obtidos e na literatura, foi proposto um novo mecanismo de processamento pós-transducional, denominado *post-splitting*, responsável pela geração da Ts19 Frag-II a partir da Ts19. Posteriormente, diferentes ensaios foram realizados a fim de elucidar suas atividades biológicas. A toxina Ts19 Frag-II demonstrou bloquear seletivamente canais Kv1.2; não apresentou atividade hemolítica; não induziu algesia; aumentou níveis séricos de ureia, ALT e β -globulina, além de diminuir a porcentagem de γ -globulina; aumentou a produção das citocinas IL-6, TNF- α , IL-17A e NO; e induziu menor diferenciação de células Th17 e produção de IL-17 e IL-22 (Fig. 35). Assim, foi demonstrado que a nova toxina possui atividade neurotóxica e pró-inflamatória, e poderia contribuir significativamente para o quadro de envenenamento ocasionado pelo escorpião *T. serrulatus*. Adicionalmente, sua seletividade para o canal Kv1.2 faz com que essa toxina possa ser utilizada como ferramenta molecular para o estudo deste tipo de canal iônico. Deve-se considerar também seu uso potencial como modelo para o desenvolvimento de fármacos para tratar doenças autoimunes, devido à sua ação supressora em células Th17.

Figura 35. Resumo do resultados obtidos no presente estudo: caracterização molecular e funcional da Ts19 Frag-II.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN S. PILLAI, Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Elsevier, 2012
- ABDEL-MOTTALEB, Y., F. V. CORONAS, A. R. DE ROODT, L. D. POSSANIE J. TYTGAT. "A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new alpha-KTX subfamily." *FEBS Lett* 580(2): 592-596, 2006
- Almeida, R. B. (2010). Atlas of the species of *Tityus* C. L. Koch, 1836. Master, Universidade de São Paulo.
- ALVARENGA, E. R., T. M. MENDES, B. F. MAGALHÃES, F. F. SIQUEIRA, A. E. DANTAS, T. M. BARROCA, C. C. HORTAE E. KALAPOTHAKIS. "Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland." *Journal of Genetics* 2: 210-220, 2012
- ARANTES, E. C., W. A. PRADO, S. V. SAMPAIOE J. R. GIGLIO. "A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin." *Toxicon* 27(8): 907-916, 1989
- BLAUSTEIN, M. P., R. S. ROGOWSKI, M. J. SCHNEIDER B. K. KRUEGER. "Polypeptide toxins from the venoms of Old World and New World scorpions preferentially block different potassium channels." *Mol Pharmacol* 40(6): 932-942, 1991
- Bordon, K. C. F., C. T. Colognae E. C. Arantes (2015). Scorpion venom research around the world: *Tityus serrulatus*. Scorpion Venoms. P. Gopalakrishnakone, L. D. Possani; and R. C. R. d. I. Vega. Netherlands, Springer.
- BOSMANS, F.E K. J. SWARTZ. "Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins." *Trends Pharmacol Sci* 31(4): 175-182, 2010
- BOSMANS, F.E J. TYTGAT. "Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins." *Toxicon* 49: 142 - 158, 2007
- BREDT, D. S.E S. H. SNYDER. "Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium." *Neuron* 13(2): 301-313, 1994
- BRUNKOW, M. E., E. W. JEFFERY, K. A. HJERRILD, B. PAEPER, L. B. CLARK, S. A. YASAYKO, J. E. WILKINSON, D. GALAS, S. F. ZIEGLERE F. RAMSDELL. "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* 27(1): 68-73, 2001
- BUCARETCHI, F., E. C. BARACAT, R. J. NOGUEIRA, A. CHAVES, F. A. ZAMBRONE, M. R. FONSECAE F. S. TOURINHO. "A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37(4): 331-336, 1995
- BUCARETCHI, F., L. C. FERNANDES, C. B. FERNANDES, M. M. BRANCO, C. C. PRADO, R. J. VIEIRA, E. M. DE CAPITANIE S. HYSLOP. "Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil." *Toxicon* 89: 17-25, 2014
- BURCHERL, W. "Acúleos que matam." *Revistas dos Tribunais*: 153, 1979
- CARMO, A. O., B. B. OLIVEIRA-MENDES, C. C. HORTA, B. F. MAGALHÃES, A. E. DANTASE L. M. CHAVES. "Molecular and functional characterization of metalloproteases, new metalloproteases from *Tityus serrulatus* venom gland." *Toxicon* 90C: 45-55, 2014
- CARRITHERS, L. M., P. HULSEBERG, M. SANDORE M. D. CARRITHERS. "The human macrophage sodium channel NaV1.5 regulates mycobacteria processing through organelle polarization and localized calcium oscillations." *FEMS Immunol Med Microbiol* 63(3): 319-327, 2011
- CARVALHO, M. G. P.E W. R. LOURENÇO. "A new family of fossil scorpions from the Early Cretaceous of Brazil." *Earth and Planetary Sciences* 332(11): 711-716, 2001
- CATTERALL, W. A. "The molecular basis of neuronal excitability." *Science* 223(4637): 653-661, 1984

- Centro-de-Vigilância-Epidemiológica. "Acidentes por Animais Peçonhentos." from http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/peco_dados.html.
- CERNI, F. A. (2012). Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7. Mestrado, Universidade de São Paulo.
- CERNI, F. A., M. B. PUCCA, F. G. AMORIM, K. DE CASTRO FIGUEIREDO BORDON, J. ECHTERBILLE, L. QUINTON, E. DE PAUW, S. PEIGNEUR, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom." *Peptides*, 2015
- CERNI, F. A., M. B. PUCCA, S. PEIGNEUR, C. M. CREMONEZ, K. C. BORDON, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K(+) channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure." *Toxins (Basel)* 6(3): 892-913, 2014
- Cestele, S.e W. A. Catterall (2009). Toxins Targeting Mammalian Sodium Channels. Animal Toxins: State of the Art. M. E. de Lima. Belo Horizonte, UFMG: 100-117.
- CHEN, Z., Y. HU, S. HAN, S. YIN, Y. HE, Y. WU, Z. CAO E W. LI. "ImKTx1, a new Kv1.3 channel blocker with a unique primary structure." *J Biochem Mol Toxicol* 25(4): 244-251, 2011
- CHIPPAUX, J. P.E M. GOYFFON. "Epidemiology of scorpionism: a global appraisal." *Acta Trop* 107(2): 71-79, 2008
- COLOGNA, C. T., S. MARCUSSI, J. R. GIGLIO, A. M. SOARESE E. C. ARANTES. "*Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview." *Protein Pept Lett* 16(8): 920-932, 2009
- COLOGNA, C. T., S. PEIGNEUR, J. C. ROSA, H. S. SELISTRE-DE-ARAUJO, W. A. VARANDA, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Purification and characterization of Ts15, the first member of a new alpha-KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*." *Toxicon* 58(1): 54-61, 2011
- COLOGNA, C. T., S. PEIGNEUR, J. K. RUSTIGUEL, M. C. NONATO, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom." *FEBS J* 279(8): 1495-1504, 2012
- CORPET, F. "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." *Nucleic Acids Res* 16(22): 10881-10890, 1988
- CORREA, M. M., S. V. SAMPAIO, R. A. LOPES, L. C. MANCUSO, O. A. CUNHA, J. J. FRANCOE J. R. GIGLIO. "Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I." *Toxicon* 35(7): 1053-1067, 1997
- CUA, D. J.E C. M. TATO. "Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system." *Nat Rev Immunol* 10(7): 479-489, 2010
- CUMMINS, T. R., P. L. SHEETSE S. G. WAXMAN. "The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain." *Pain* 131(3): 243-257, 2007
- CUPO, P., M. JURCA, M. M. AZEEDO-MARQUES, J. S. OLIVEIRAE S. E. HERING. "Severe scorpion envenomation in Brazil." *Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 36: 67-76, 1994
- DI, Z. Y., Z. Z. YANG, S. J. YIN, Z. J. CAO E W. X. LI. "History of study, updated checklist, distribution and key of scorpions (Arachnida: Scorpiones) from China." *Dongwuxue Yanjiu* 35(1): 3-19, 2014
- DIB-HAJJ, S. D., A. M. BINSHTOK, T. R. CUMMINS, M. F. JARVIS, T. SAMADE K. ZIMMERMANN. "Voltage-gated sodium channels in pain states: role in pathophysiology and targets for treatment." *Brain Res Rev* 60(1): 65-83, 2009
- DIEGO-GARCIA, E., Y. ABDEL-MOTTALEB, E. F. SCHWARTZ, R. C. DE LA VEGA, J. TYTGATE L. D. POSSANI. "Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms." *Cell Mol Life Sci* 65(1): 187-200, 2008
- DOS SANTOS, J. S., Protocolos Clínicos e de Regulação, Elsevier, 2012

- DOS SANTOS, M. D., T. J. PORTO, R. M. LIRA-DA-SILVAE T. K. BRAZIL. "Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenco, 1997 and notes about males of *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae)." *Zookeys*(435): 49-61, 2014
- EDMAN, P.E G. BEGG. "A protein sequenator." *Eur J Biochem* 1(1): 80-91, 1967
- ESCOUBAS, P., S. DIOCHOT, M. L. CELERIER, T. NAKAJIMAE M. LAZDUNSKI. "Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies." *Mol Pharmacol* 62(1): 48-57, 2002
- FET, V., W. SISSOM, D., G. LOWEE M. BRAUNWALDER, E., Catalog of the Scorpions of the World (1958 - 1998), *New York Entomological Society*, 2000
- FIALHO, E. M. S., M. C. G. MACIEL, A. C. B. SILVA, A. S. REIS, A. K. M. ASSUNCAO, T. S. FORTES, L. A. SILVA, R. N. M. GUERRA, F. H. KWASNIEWSKIE F. R. F. NASCIMENTO. "Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom." *Toxicon* 58(6-7): 480-485, 2011
- FUKUHARA, Y. D., M. L. REIS, R. DELLALIBERA-JOVILIANO, F. Q. CUNHA E. A. DONADI. "Increased plasm levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patientis moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting." *Toxicon* 41: 49-55, 2003a
- FUKUHARA, Y. D., M. L. REIS, R. DELLALIBERA-JOVILIANO, F. Q. CUNHA E. A. DONADI. "Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting." *Toxicon* 41(1): 49-55, 2003b
- GAO, B., S. PEIGNEUR, J. TYTGATE S. ZHU. "A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom." *Biochimie* 92(12): 1847-1853, 2010
- GARCIA, M. L., A. GALVEZ, M. GARCIA-CALVO, V. F. KING, J. VAZQUEZE G. J. KACZOROWSKI. "Use of toxins to study potassium channels." *J Bioenerg Biomembr* 23(4): 615-646, 1991
- GARCIA, M. L., Y. GAO, O. B. MCMANUSE G. J. KACZOROWSKI. "Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure." *Toxicon* 39(6): 739-748, 2001
- GAZARIAN, K. G., T. GAZARIAN, R. HERNÁNDEZE L. D. POSSANI. "Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines." *Vaccine* 23(26): 3357-3368, 2005
- GERSHON, R. K.E K. KONDO. "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* 18(5): 723-737, 1970
- GOHAR, O. "Contribution of ion channels in pain sensation." *Modulator* 32: 75, 2005
- GOLDIN, A. L. (2006). Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels, Jeffrey J. Clare, Derek J. Trezise.
- GORDON, D., P. SAVARIN, M. GUREVITZE S. ZINN-JUSTIN. "Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels." *J. Toxicol. (Toxin Rev.)* 17: 131-159, 1998
- GOUET, P., E. COURCELLE, D. I. STUARTE F. METOZ. "ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript." *Bioinformatics* 15(4): 305-308, 1999
- GREEN, L. C. R. D. L., K.; WAGNER, D.A.; RAND, W.; ISTAFAN, N.; YOUNG, V.R. "Nitrate biosynthesis in man." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 7764, 1981
- GRISHAM, M. B., D. JOURD'HEUILE D. A. WINK. "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." *Am J Physiol* 276(2 Pt 1): G315-321, 1999
- GUAN, Z., N. A. YATESE R. BAKHTIAR. "Detection and characterization of methionine oxidation in peptides by collision-induced dissociation and electron capture dissociation." *J Am Soc Mass Spectrom* 14(6): 605-613, 2003
- GUERON, M.E R. YARON. "Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting. Clinicopathologic correlations." *Chest* 57(2): 156-162, 1970
- GUTMAN, G. A., K. G. CHANDY, S. GRISSMER, M. LAZDUNSKI, D. MCKINNON, L. A. PARDO, G. A. ROBERTSON, B. RUDY, M. C. SANGUINETTI, W. STUHMER X. L. WANG. "International Union

- of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 473-508, 2005
- HABIB, A. M., J. N. WOODE J. J. COX. "Sodium channels and pain." *Handb Exp Pharmacol* 227: 39-56, 2015
- Hodgson, E. (2010). Introduction to toxicology. Textbook of Modern Toxicology. E. Hodgson. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 3.
- HU, H. J., Y. CARRASQUILLO, F. KARIM, W. E. JUNG, J. M. NERBONNE, T. L. SCHWARZE R. W. T. GEREAU. "The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity." *Neuron* 50(1): 89-100, 2006
- ISMAIL, M. "The scorpion envenoming syndrome." *Toxicon* 33(7): 825-858, 1995
- IWAKURA, Y., H. ISHIGAME, S. SAJOE S. NAKAE. "Functional specialization of interleukin-17 family members." *Immunity* 34(2): 149-162, 2011
- KACZOROWSKI, G. J.E M. L. GARCIA. "Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels." *Curr Opin Chem Biol* 3(4): 448-458, 1999
- LANDOULSI, Z., F. MICELI, A. PALMESE, A. AMORESANO, G. MARINO, M. EL AYEYB, M. TAGLIALATELAE R. BENKHALIFA. "Subtype-selective activation of K(v)7 channels by AaTXKbeta(2)(-)(6)(4), a novel toxin variant from the *Androctonus australis* scorpion venom." *Mol Pharmacol* 84(5): 763-773, 2013
- LEGROS, C., B. CEARD, P. E. BOUGISE M. F. MARTIN-EAUCLAIRE. "Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels." *FEBS Lett* 431(3): 375-380, 1998
- LIKES, K., W. BANNER, JR.E M. CHAVEZ. "Centruroides exilicauda envenomation in Arizona." *West J Med* 141(5): 634-637, 1984
- LIMA, P. C., K. C. BORDON, M. B. PUCCA, F. A. CERNI, K. F. ZOCCAL, L. H. FACCIOLIE E. C. ARANTES. "Partial purification and functional characterization of Ts19 Frag-I, a novel toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom." *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 21: 49, 2015
- LOURENÇO, W. R. "Parthenogenesis in scorpions: some history - new data." *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14(1): 19-44, 2008
- Lourenço, W. R. (2015). Scorpion Diversity and Distribution: Past and Present. Scorpion Venoms. P. Gopalakrishnakone;, L. D. Possani; and R. C. R. d. l. Vega. Netherlands, Springer: 3-24.
- LUTZ, A.E O. MELLO. "Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*." *Folha Médica* 3: 26, 1922
- MAGALHAES, M. M., M. E. PEREIRA, C. F. AMARAL, N. A. REZENDE, D. CAMPOLINA, F. BUCARETCHI, R. T. GAZZINELLIE J. R. CUNHA-MELO. "Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting." *Toxicon* 37(8): 1155-1164, 1999
- MAINI, R. N., M. J. ELLIOTT, F. M. BRENNANE M. FELDMANN. "Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA)." *Clin Exp Immunol* 101(2): 207-212, 1995
- MANGAN, P. R., L. E. HARRINGTON, D. B. O'QUINN, W. S. HELMS, D. C. BULLARD, C. O. ELSON, R. D. HATTON, S. M. WAHL, T. R. SCHOEBE C. T. WEAVER. "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* 441(7090): 231-234, 2006
- MARCUSSI, S., E. C. ARANTES, A. M. SOARES, J. R. GIGLIOE M. V. MAZZI, Escorpiões: Biologia, envenenamentoe mecanismos de ação de suas toxinas. São Paulo, FUNPEC, 2011
- MEKI, A. R., Z. M. MOHAMEDE H. M. MOHEY EL-DEEN. "Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 in scorpion envenomed children." *Toxicon* 41(2): 129-137, 2003
- MEKI, A. R.E Z. M. MOHEY EL-DEAN. "Serum interleukin-1beta, interleukin-6, nitric oxide and alpha1-antitrypsin in scorpion envenomed children." *Toxicon* 36(12): 1851-1859, 1998
- MILJANICH, G. P. "Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain." *Curr Med Chem* 11(23): 3029-3040, 2004

- Ministério-da-Saúde (2009). Manual de Controle de Escorpiões. D. d. V. Epidemiológica. Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde. **1**: 8.
- MORAND, K., G. TALBOE M. MANN. "Oxidation of peptides during electrospray ionization." *Rapid Commun Mass Spectrom* 7(8): 738-743, 1993
- MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLINE R. L. COFFMAN. "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* 136(7): 2348-2357, 1986
- MOUHAT, S., N. ANDREOTTI, B. JOUIROUE J. M. SABATIER. "Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels." *Curr Pharm Des* 14(24): 2503-2518, 2008
- Naoum, P. C.e P. F. Naoum (2012). Proteínas plasmáticas de interesse clínico. Eletroforeses. P. C. Naoum. Santos, Santos Editora: 297.
- NIELSEN, L. L.E A. D. BARON. "Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4) for the treatment of type 2 diabetes." *Curr Opin Investig Drugs* 4(4): 401-405, 2003
- NUNAN, E. A., V. ARYA, G. HOCHHAUS, V. N. CARDOSOE T. MORAES-SANTOS. "Age effects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats." *Braz J Med Biol Res* 37(3): 385-390, 2004
- NUNAN, E. A., M. F. MORAES, V. N. CARDOSOE T. MORAES-SANTOS. "Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats." *Life Sci* 73(3): 319-325, 2003
- Oga, S., M. M. A. Camargoe J. A. O. Batistuzzo (2008). Introdução à Toxicologia. Fundamentos de Toxicologia. A. S. Paulo.
- OPIE, L. H.E H. KOWOLIK. "The discovery of captopril: from large animals to small molecules." *Cardiovasc Res* 30(1): 18-25, 1995
- PARDO, L. A.E W. STUHMER. "The roles of K(+) channels in cancer." *Nat Rev Cancer* 14(1): 39-48, 2014
- PEIGNEUR, S., C. T. COLOGNA, C. M. CREMONEZ, B. G. MILLE, M. B. PUCCA, E. CUYPERS, E. C. ARANTESE J. TYTGAT. "A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Nav-type isoforms." *Neuropharmacology* 95: 269-277, 2015
- PEIGNEUR, S., D. J. ORTS, A. R. PRIETO DA SILVA, N. OGUIURA, M. BONI-MITAKE, E. B. DE OLIVEIRA, A. J. ZAHARENKO, J. C. DE FREITASE J. TYTGAT. "Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels." *Mol Pharmacol* 82(1): 90-96, 2012
- PESSINI, A. C., A. M. DE SOUZA, L. H. FACCIOLO, Z. M. GREGORIOE E. C. ARANTES. "Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice." *Int Immunopharmacol* 3(5): 765-774, 2003
- PESSINI, A. C., A. KANASHIRO, C. MALVAR DDO, R. R. MACHADO, D. M. SOARES, M. J. FIGUEIREDO, E. KALAPOTHAKISE G. E. SOUZA. "Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws." *Toxicon* 52(7): 729-736, 2008
- PESSINI, A. C., D. R. SANTOS, E. C. ARANTESE G. E. SOUZA. "Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats." *Toxicon* 48(5): 556-566, 2006
- PETRICEVICH, V. L. "Scorpion Venom and the Inflammatory Response." *Mediators Inflamm*, 2010
- PETRICEVICH, V. L.E C. F. PENA. "The dynamics of cytokine d nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom." *Mediators Inflamm* 11(3): 173-180, 2002
- PIMENTA, A. M. C., R. STOCKLIN, P. FAVREAU, P. E. BOUGISE M. F. MARTIN-EAUCLAIRE. "Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, *Buthidae*)." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(17): 1562-1572, 2001

- PINTO, L. G., T. M. CUNHA, S. M. VIEIRA, H. P. LEMOS, W. A. VERRI, JR., F. Q. CUNHA E S. H. FERREIRA. "IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice." *Pain* 148(2): 247-256, 2010a
- PINTO, M. C. L., M. M. MELO, M. E. R. COSTA E C. R. LABARRERE. "Hematological and biochemical profiles of rats submitted to experimental poisoning with *Tityus serrulatus* venom." *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* 62(2): 350-356, 2010b
- PIPELZADEH, M. H., A. R. DEZFULIAN, M. T. JALALIE A. K. MANSOURI. "In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from Hemiscorpius lepturus scorpion." *Toxicon* 48(1): 93-103, 2006
- POSSANI, L. D., B. SELISKI E G. B. GURROLA (1999). Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺ channels. Perspective in drug discovery and design. Netherlands: 15-40.
- PUCCA, M. B., F. G. AMORIM, F. A. CERNI, C. BORDON KDE, I. A. CARDOSO, F. A. ANJOLETEE E. C. ARANTES. "Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity." *Toxicon* 90: 326-336, 2014
- PUCCA, M. B., T. B. BERTOLINI, F. A. CERNI, K. C. BORDON, S. PEIGNEUR, J. TYTGAT, V. L. BONATO E. C. ARANTES. "Immunosuppressive evidence of *Tityus serrulatus* toxins Ts6 and Ts15: insights of a novel K(+) channel pattern in T cells." *Immunology* 147(2): 240-250, 2016a
- PUCCA, M. B., F. A. CERNI, F. A. CORDEIRO, S. PEIGNEUR, T. M. CUNHA, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception in vivo." *Toxicon* 119: 244-252, 2016b
- PUCCA, M. B., F. A. CERNI, E. LOPES, P. JUNIOR, K. C. BORDON, F. G. AMORIM, F. A. CORDEIRO, H. T. LONGHIM, C. M. CREMONEZ, G. H. DE OLIVEIRA E. C. ARANTES. "*Tityus serrulatus* venom - a lethal cocktail." *Toxicon*, 2015a
- PUCCA, M. B., F. A. CERNI, S. PEIGNEUR, K. C. BORDON, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Revealing the Function and the Structural Model of Ts4: Insights into the "Non-Toxic" Toxin from *Tityus serrulatus* Venom." *Toxins (Basel)* 7(7): 2534-2550, 2015b
- Pucca, M. B., F. N. Oliveira, E. F. Schwartz, E. C. Arantes R. M. Lira-Da-Silva (2015c). Scorpionism and dangerous species of Brazil. Scorpion Venoms. P. Gopalakrishnakone, L. D. Possani; and R. C. R. d. I. Vega. Netherlands, Springer.
- PUCCA, M. B., S. PEIGNEUR, C. T. COLOGNA, F. A. CERNI, K. F. ZOCCAL, C. BORDON KDE, L. H. FACCIOLE, J. TYTGATE E. C. ARANTES. "Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages." *Biochimie* 115: 8-16, 2015d
- PUCCA, M. B., K. F. ZOCCAL, E. C. RONCOLATO, T. B. BERTOLINI, L. B. CAMPOS, C. T. COLOGNA, L. H. FACCIOLE, E. C. ARANTESE J. E. BARBOSA. "Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom." *J Immunotoxicol* 9(2): 173-183, 2012
- RAAB, W. "Key position of catecholamines in functional and degenerative cardiovascular pathology." *Am J Cardiol* 5: 571-578, 1960
- RASMUSSEN, S. E. S. E. HUSTED. "[Tirofiban (Aggrastat). A non-peptide glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor]." *Ugeskr Laeger* 163(4): 461-465, 2001
- RIBEIRO, E. L., M. C. PINTO, C. R. LABARRERE, P. R. PAES, F. O. PAES-LEME, C. CHAVEZ-OLORTEGUE M. M. MELO. "Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom." *Toxicon* 55(6): 1125-1131, 2010
- ROBBINS, C. A. E. B. L. TEMPEL. "Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models." *Epilepsia* 53 Suppl 1: 134-141, 2012
- ROBBINS, J. "KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Ther* 90(1): 1-19, 2001

- ROGOWSKI, R. S., B. K. KRUEGER, J. H. COLLINSE M. P. BLAUSTEIN. "Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4): 1475-1479, 1994
- SAKAGUCHI, S., T. YAMAGUCHI, T. NOMURAE M. ONO. "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* 133(5): 775-787, 2008
- SCHAGGER, H.E G. VON JAGOW. "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal Biochem* 166(2): 368-379, 1987
- SCHELLER, J., A. CHALARIS, D. SCHMIDT-ARRASE S. ROSE-JOHN. "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 878-888, 2011
- SCHEY, K. L.E E. L. FINLEY. "Identification of peptide oxidation by tandem mass spectrometry." *Acc Chem Res* 33(5): 299-306, 2000
- SHEVACH, E. M. "Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells." *J Exp Med* 193(11): F41-46, 2001
- SOFER, S., M. GUERON, R. M. WHITE, M. LIFSITZE R. N. APTE. "Interleukin-6 release following scorpion sting in children." *Toxicon* 34(3): 389-392, 1996
- STEVENS, M., S. PEIGNEURE J. TYTGAT. "Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels." *Front Pharmacol* 2: 71, 2011
- SWAIN, S. L., K. K. MCKINSTRYE T. M. STRUTT. "Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses." *Nat Rev Immunol* 12(2): 136-148, 2012
- SWARTZ, K. J.E R. MACKINNON. "An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a *Chilean tarantula*." *Neuron* 15(4): 941-949, 1995
- TAKACS, Z.E S. NATHAN. "Animal venoms in medicine." *Encyclopedia of toxicology* 1: 252-259, 2014
- TAMURA, R., T. NEMOTO, T. MARUTA, S. ONIZUKA, T. YANAGITA, A. WADA, M. MURAKAMIE I. TSUNEYOSHI. "Up-regulation of NaV1.7 sodium channels expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons." *Anesth Analg* 118(2): 318-324, 2014
- UEDA, Y., K. NAGASAWA, H. TSUKAMOTO, T. HORIUCHI, H. NISHIZAKA, K. IKEDAE Y. NIHO. "Production of the third and fourth component of complement (C3, C4) by smooth muscle cells." *Immunology* 89(2): 183-188, 1996
- VANDENBERG, J. I., M. D. PERRY, M. J. PERRIN, S. A. MANN, Y. KEE A. P. HILL. "hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance." *Physiol Rev* 92(3): 1393-1478, 2012
- VELDHOEN, M., R. J. HOCKING, C. J. ATKINS, R. M. LOCKSLEYE B. STOCKINGER. "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* 24(2): 179-189, 2006
- VENANCIO, E. J., F. C. PORTARO, A. K. KUNIYOSHI, D. C. CARVALHO, G. PIDDE-QUEIROZE D. V. TAMBOURGI. "Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms." *Toxicon* 69: 180-190, 2013
- VILLIGER, P. M., M. T. CRONIN, T. AMENOMORI, W. WACHSMANE M. LOTZ. "IL-6 production by human T lymphocytes. Expression in HTLV-1-infected but not in normal T cells." *J Immunol* 146(2): 550-559, 1991
- WANG, X., Y. UMETSU, B. GAO, S. OHKIE S. ZHU. "Mesomartoxin, a new K(v)1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter." *Biochem Pharmacol* 93(2): 232-239, 2015
- WHITFIELD, R. P. "An American Silurian Scorpion." *Science* 6(130): 87-88, 1885
- WULFF, H., P. A. CALABRESI, R. ALLIE, S. YUN, M. PENNINGTON, C. BEETONE K. G. CHANDY. "The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS." *J Clin Invest* 111(11): 1703-1713, 2003

- YEUNG, S. Y., D. THOMPSON, Z. WANG, D. FEDIDAE B. ROBERTSON. "Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: significance for CNS and biophysical studies." *J Neurosci* 25(38): 8735-8745, 2005
- ZHANG, F., X. XU, T. LIE Z. LIU. "Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels." *Mar Drugs* 11(12): 4698-4723, 2013
- ZHANG, G. X., B. GRAN, S. YU, J. LI, I. SIGLIANTI, X. CHEN, M. KAMOUNE A. ROSTAMI. "Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system." *J Immunol* 170(4): 2153-2160, 2003
- ZHU, J., H. YAMANEE W. E. PAUL. "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* 28: 445-489, 2010
- ZOCCAL, K. F., S. BITENCOURT CDA, A. SECATTO, C. A. SORGI, C. BORDON KDE, S. V. SAMPAIO, E. C. ARANTESE L. H. FACCIOLI. "*Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators." *Toxicon* 57(7-8): 1101-1108, 2011a
- ZOCCAL, K. F., S. BITENCOURT CDA, C. A. SORGI, C. BORDON KDE, S. V. SAMPAIO, E. C. ARANTESE L. H. FACCIOLI. "Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production." *Toxicon* 61: 1-10, 2013a
- ZOCCAL, K. F., F. W. PAULA-SILVA, S. BITENCOURT CDA, C. A. SORGI, C. BORDON KDE, E. C. ARANTESE L. H. FACCIOLI. "PPAR-gamma activation by *Tityus serrulatus* venom regulates lipid body formation and lipid mediator production." *Toxicon* 93: 90-97, 2015
- ZOCCAL, K. F., B. C. S., A. SECATTO, C. A. SORGI, B. K. C. F., S. V. SAMPAIO, E. C. ARANTESE L. H. FACCIOLI. "*Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators." *Toxicon* 57(7-8): 1101-1108, 2011b
- ZOCCAL, K. F., B. C. S., C. A. SORGI, B. K. C. F., S. V. SAMPAIO, E. C. ARANTESE L. H. FACCIOLI. "Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production." *Toxicon* 61: 1-10, 2013b
- ZOCCAL, K. F., C. A. SORGI, J. I. HORI, F. W. PAULA-SILVA, E. C. ARANTES, C. H. SEREZANI, D. S. ZAMBONIE L. H. FACCIOLI. "Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality." *Nat Commun* 7: 10760, 2016

Anexos

8. ANEXOS

1. Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético

<small>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico</small>	3889511805160467
AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010214/2014-3	
<p>O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.</p>	
Instituição: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP CNPJ: 630.255.300/0001-04 Representante Legal: MARCO ANTONIO ZAGO Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa CPF: [REDACTED] RG: [REDACTED]	
Projeto: Isolamento, caracterização molecular e funcional de uma nova toxina presente na peçonha do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> Coordenador do Projeto: Eliane Candiani Arantes CPF: [REDACTED] RG: [REDACTED]	
Amostras a serem acessadas: Grupos Taxonômicos: <i>Tityus serrulatus</i> Tipo de material/quantidade de amostras: Será coletada aproximadamente 1g da peçonha bruta do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> .	
Local de depósito de subamostra: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO	
Equipe do projeto: ELIANE CANDIANI ARANTES / CPF [REDACTED] FELIPE AUGUSTO CERNI / CPF [REDACTED] IARA AIME CARDOSO / CPF [REDACTED] KARLA DE CASTRO FIGUEIREDO / CPF [REDACTED]	
Validade da Autorização: 15/05/2014 a 01/04/2016	

2. Certificado do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 197/2015, sobre o projeto intitulado “*Estudo da toxina Ts8 da peçonha de Tityus serrulatus: uma toxina específica para canais para potássio Kv4.2*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Thiago Mattar Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de janeiro de 2016.

We certify that the protocol nº 197/2015, entitled “*Study of Ts8 toxin from Tityus serrulatus venom: a specific toxin to Kv4.2 potassium channels*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 01/27/2016.

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

3. Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 13.1.41.53.4), intitulado: "Isolamento, Caracterização Molecular e Funcional de uma nova Toxina Presente na Peçonha do Escorpião *Tityus serrulatus*", de autoria de **Felipe Augusto Cerni** e de **Eliane Candiani Arantes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06.05.2013.

Colaboradores:

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.41.53.4), entitled: "Isolation, Molecular and Functional Characterization of a new Toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom", by **Felipe Augusto Cerni** and **Eliane Candiani Arantes**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, May, 6 2013.

Ribeirão Preto, 13 de maio de 2013.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro