UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Priscila Carmanhan Lima

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Priscila Carmanhan Lima

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Eliane Candiani Arantes

Ribeirão Preto
2014

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 31/03/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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

Carmanhan Lima, Priscila
Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. Ribeirão Preto, 2014.
103 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia
Orientadora: Arantes, Eliane Candiani.

1. Toxina. 2. Escorpião. 3. Citocinas. 4. *Tityus serrulatus.*
5. Ts19 frag I.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Carmanhan Lima

Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof ª. Dr ª Eliane Candiani Arantes

Aprovado em: ____ / ____ / 2014

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico esta dissertação a ***Deus****, ao meu marido* ***Israel****, aos meus pais,* ***Marcos Aurélio e Carla****, e a todos os* ***amigos*** *que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por seu cuidado para comigo ao longo de toda a minha vida e por não me deixar desistir, renovando minhas forças nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Eliane Candiani Arantes, pela oportunidade, paciência e por compartilhar seu tempo e conhecimentos comigo.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli e a Karina F. Zoccal, do Laboratório de Inflamação de Imunologia das Parasitoses, pela disposição e colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao programa de Pós Graduação em Toxicologia.

Ao meu querido amigo e esposo Israel, por seu amor, carinho, compreensão, dedicação, companheirismo, suporte emocional, suporte financeiro, ou seja, muito obrigada por contribuir de todas as formas possíveis para a realização deste trabalho. Eu te amo e sou muito grata por tudo!

Ao meu pai Marcos por sempre se preocupar com meu almoço nos finais de semana e feriados que passei no laboratório e por ser uma pessoa linda, amorosa que me inspira e motiva.

À minha mãe Carla por sua amizade, carinho e grande exemplo profissional.

Ao meu irmão Marcos Boanerges por todos os momentos divertidos que tanto me distraíram nestes anos.

Ao meu avô Antonio que nos deixou, mas sempre contribuiu para a minha criação e educação com muito amor.

À Karla e à Manú pela amizade e por todas as dicas e auxílio científico que contribuíram imensamente para a realização deste trabalho e para minha formação.

Aos meus amigos do laboratório de Toxinas Animais que tanto me ajudaram e tornaram o trabalho mais aprazível (Felipe, Fernando, Iara, Johara, Ernesto, Francielle, Mateus, Elisa, Fernanda).

Aos meus tios Avelino e Jaqueline por me acolherem em seu lar.

À minha sogra Cristina e ao meu sogro Silvio por sua amizade e ajuda.

“Porventura pode uma mulher esquecer-se tanto de seu filho que cria que não se compadeça dele, do filho do seu ventre? Mas ainda que esta se esquecesse dele, contudo Eu não me esquecerei de ti.”

(Isaías 49:15)

RESUMO

CARMANHAN LIMA, P. **Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*.** 2014. 103 f. - Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Envenenamentos por animais peçonhentos são frequentes e quase 35% dos acidentes são ocasionados por escorpiões, especialmente por *Tityus serrulatus.* A peçonha do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* tem despertado o interesse médico e científico por ser uma mistura complexa de mucopolissacarídeos, inibidores de proteases, histamina, neurotoxinas, entre outros componentes. As neurotoxinas são as principais responsáveis pelos sintomas do envenenamento, por possuírem alta afinidade e seletividade para canais iônicos sensíveis à voltagem. Além de induzirem a liberação de neurotransmissores, as neurotoxinas também são capazes de estimular a liberação de citocinas, principalmente nos casos de envenenamento de maior gravidade. Os objetivos deste trabalho focaram o isolamento e a caracterização de uma nova toxina, denominada Ts19 fragmento I (Ts19 frag I) presente nas frações VII e VIII obtidas por cromatografia da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-celulose-52. Entre os componentes preponderantes destas frações estão a Ts4, um peptídeo não tóxico que induz reações alérgicas, e a Ts3-KS, que interage com canais para sódio e foi capaz de induzir a liberação de IL-6. As frações VII e VIII foram aplicadas em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm) e os picos 19, 22 (Ts19 frag I) e 23 foram recromatografados em coluna C18 (2,1 x 250 mm). O sequenciamento por degradação de Edman permitiu a determinação de 57 resíduos de aminoácidos da Ts19 frag I, incluindo 6 resíduos de cisteína. Esta proteína mostrou compartilhar um elevado grau de identidade sequencial com outras toxinas que atuam em canais para K^+ depositadas em bancos de dados. Sua massa molar íntegra de 6.571,3165 Da foi determinada por espectrometria de massas. Os ensaios funcionais em células de linhagem de macrófagos peritoneais demonstraram que a Ts19 frag I (50 µg/mL) estimulou a liberação de óxido nítrico, IL-6 e não foi citotóxica na dose utilizada. Um ensaio para verificar a atividade hemolítica da Ts19 frag I também foi realizado e nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL esta não demonstrou atividade citolítica. Nas frações VII e VIII também foram encontradas a Ts2, como um contaminante do pico 22, e a Ts19 frag II, cujo precursor é a Ts19 frag I. A Ts19 frag II presente no pico 19 foi sequenciada e mostrou-se contaminada com a Ts19 frag I.

Palavras-chave: toxina, escorpião, citocinas, *Tityus serrulatus*, Ts19 frag I.

ABSTRACT

CARMANHAN LIMA, P. **Isolation and structural and functional characterization of a novel toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom.** 2014. 103 f. - Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Poisonings by venomous animals are frequent and almost 35 % of the accidents are caused by scorpions, especially by *Tityus serrulatus*. The venom of the yellow scorpion *Tityus serrulatus* has aroused scientific and medical interest, since it is a complex mixture of mucopolysaccharides, protease inhibitors, histamine, neurotoxins and other components. The neurotoxins are the main responsible for the symptoms of poisoning by having high affinity and selectivity for voltage-sensitive ion channels. In addition to inducing neurotransmitter release, neurotoxins are also able to stimulate the release of cytokines, especially in cases of severe poisoning. The objectives of this study focused on the isolation and characterization of a novel toxin, named Ts19 fragment I (Ts19 frag I) present in fractions VII and VIII obtained by chromatography of *Tityus serrulatus* venom on CM-cellulose-52 column. Among the predominant components of these fractions are Ts4, a non-toxic peptide that induces allergic reactions, and Ts3-KS, which interact with sodium channels and was able to induce the release of IL-6. Fractions VII and VIII were applied to C18 reverse phase column (4.6 x 250 mm) and the peaks 19, 22 (Ts19 frag I) and 23 were rechromatographed on C18 (2.1 x 250 mm) column. Sequencing by Edman degradation allowed the determination of 57 amino acid residues of Ts19 frag I, including six cysteine residues. This protein showed to share a high degree of sequence identity with other toxins acting on K^+ channels deposited in databases. Its full molar mass of 6.571,3165 Da was determined by mass spectrometry. The functional assays in cell line of peritoneal macrophages showed that Ts19 frag I (50 µg/mL) stimulated the release of nitric oxide, IL-6 and was not cytotoxic in the dose used. A test to verify the hemolytic activity of Ts19 frag I was also performed and concentrations of 25 µg/mL and 50 µg/mL of toxin showed no cytolytic activity. In the fractions VII and VIII were also found Ts2, as a contaminant of the peak 22, and Ts19 frag II, whose precursor is the Ts19 frag I. The Ts19 frag II present in peak 19 was sequenced and showed to be contaminated with Ts19 frag I.

Keywords: toxin, scorpion, cytokines, *Tityus serrulatus*, Ts19 frag I

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos aparelhos inoculadores de animais peçonhentos..... 4

Figura 2. Representação da glândula parotóide de sapos..... 5

Figura 3. Morfologia do escorpião *Tityus serrulatus*..... 8

Figura 4. Representação gráfica do número de acidentes escorpiônicos no Brasil entre os anos de 2000 a 2012..... 10

Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de óbitos decorrentes de escorpiônismo nas regiões brasileiras em 2011..... 10

Figura 6. Representação das subunidades α e β do canal para os íons sódio dependentes de voltagem..... 19

Figura 7. Representação da subunidade α do canal para os íons potássio..... 22

Figura 8. Estruturas de toxinas que atuam em canais para os íons sódio e potássio..... 25

Figura 9. Perfil cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em coluna de CMC-52..... 42

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%..... 44

Figura 11. Perfil cromatográfico da fração VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB em coluna de fase reversa C18..... 46

Figura 12. Alinhamento múltiplo entre toxinas de escorpiões que atuam em canais para os íons potássio..... 53

Figura 13. Recromatografia das subfrações F19, F22 e F23 em coluna C18 Phenomenex peptides..... 57

Figura 14. Espectrometria de massas das subfrações F22.6..... 59

Figura 15. Gráficos mostram os efeitos das toxinas em estimular a produção de óxido nítrico..... 62

Figura 16. Gráficos representam os efeitos das toxinas na liberação de citocinas..... 65

Figura 17. Placa para verificar a atividade hemolítica..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características morfológicas e distribuição dos escorpiões do gênero *Tityus* no Brasil..... 7

Tabela 2. Recuperação das frações obtidas da cromatografia da peçonha de *Tityus serrulatus*..... 43

Tabela 3. Recuperação da cromatografia da fração VII-VIII..... 47

Tabela 4. Recuperação da cromatografia da fração VII..... 48

Tabela 5. Recuperação da cromatografia da fração VIIIA..... 49

Tabela 6. Recuperação da cromatografia da fração VIIIB..... 50

Tabela 7. Sequências primárias das subfrações 22 e 23 isoladas das frações VII-VIII..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM-celulose	Carboxi-Metil-Celulose
FOXP3	Fator Nuclear
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas (fast Protein liquid Chromatography)
IL	Interleucina
K_V	Canal para Potássio Sensível à Voltagem
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio]
Na_V	Canal para Sódio Sensível à Voltagem
NO	Óxido Nítrico
rBmK CTa	Clorotoxina-símile recombinante do escorpião *Buthus matensii*
SAA	Soroantiaracnídeo
SAE	Soroantiescorpiônico
ShK	Toxina do *Stichodactyla helianthus*
SNC	Sistema Nervoso Central
STX	Saxitoxina
TFA	Ácido trifluoracético
TGF-β	Fator de Crescimento e Transformador β
TH1	Linfócito T Auxiliar 1 (T cell Helper 1)
TH2	Linfócito T Auxiliar 2 (T cell Helper 2)
TLRs	Receptores do tipo Toll (Toll like receptors)
TNF	Fator de Necrose TumoralFator de Necrose Tumoral α
TNF-α	Linfócito T Regulatório
Treg	Linfócito T Regulatório
Ts	*Tityus serrulatus*
TTX	Tetrodotoxina

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de Figuras iii
Lista de Tabelas iv
Lista de Abreviaturas e Siglas v

1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1. Toxinas como medicamentos..... 1
1.2. Animais venenosos e peçonhentos..... 3
1.3. Escorpiões..... 5
1.4. Escorpionismo..... 9
1.5. Manifestações clínicas..... 11
1.6. Composição da peçonha de *Tityus serrulatus*..... 12
1.7. Sistema nervoso e potencial de ação..... 15
1.8. Toxinas com ação em canais iônicos 17
1.9. Toxinas escorpiônicas e modulação da resposta imunológica..... 26
1.10. Toxinas escorpiônicas e citotoxicidade 28
2. OBJETIVOS..... 30
2.1. Objetivos gerais..... 31
2.2. Objetivos específicos..... 31
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 32
3.1. Equipamentos e reagentes..... 33
3.2. Animais..... 33
3.3. Peçonha de *Tityus serrulatus* 34
3.4. Preparo da amostra..... 34
3.5. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de *Tityus serrulatus*..... 34
3.6. Eletroforese para proteínas básicas 35
3.7. Cromatografia de fase reversa das frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB 35
3.8. Recromatografia de fase reversa das subfrações 19, 22 e 23 35
3.9. Sequenciamento amino-terminal das toxinas..... 36
3.10. Determinação da massa molar por espectrometria de massas..... 36
3.11. Cultura de linhagem celular 37

3.12. Avaliação da viabilidade celular 37
3.13. Avaliação da liberação de óxido nítrico 38
3.14. Avaliação da liberação de citocinas 38
3.15. Avaliação da atividade hemolítica 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40
4.1. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de *Tityus serrulatus* 41
4.2. Cromatografia de fase reversa das Frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB 45
4.3. Sequenciamento amino-terminal das toxinas isoladas 51
4.4. Recromatografia de fase reversa das subfrações 19, 22 e 23 56
4.5. Espectrometria de massas da fração F22.6 58
4.6. Avaliação da viabilidade celular 60
4.7. Avaliação da liberação de óxido nítrico..... 61
4.8. Avaliação da liberação de citocinas..... 64
4.9. Avaliação da atividade hemolítica 66
5. CONCLUSÕES..... 68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 71
ANEXOS..... 86

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxinas como medicamentos

Desde os primórdios o homem faz uso da biodiversidade animal e vegetal, com o objetivo de assegurar sua sobrevivência. Este extrai da natureza alimentos e insumos para produção de medicamentos, confecção de ferramentas, armas e outros utensílios (HENDERSON, 2012).

O Brasil está entre os países com a maior biodiversidade do planeta, fruto de sua elevada extensão territorial e concentração de florestas tropicais, em especial a Floresta Amazônica, a qual equivale a 13,1% da biota mundial (LEWINSOHN et al., 2005).

Estima-se que um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos de origem natural, dos quais 25% foram de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003).

Além disso, muitos fármacos presentes no mercado mundial são consequência de pesquisas com animais peçonhentos.

O fármaco Eptifibatide ou Integrilin® (Schering-Plough), sintetizado a partir da barbourina isolada da peçonha de serpente *Sistrurus miliarius barbouri*, é também bastante conhecido e utilizado para o tratamento de trombose. Outro medicamento derivado de peçonhas animais muito utilizado a Ziconotida ou Prialt® (Elan Corporation), isolada da peçonha do caracol marinho *Conus magnus,* a qual se apresenta como um forte analgésico para pacientes com câncer e AIDS ou que sofrem espasmos graves decorrentes de lesões medulares (PENN; PAICE, 2000; RIDGEWAY; WALLACE; GERAYLI, 2000).

A Gomesina é um peptídeo antimicrobiano isolado dos hemócitos (células que tem papel no sistema imune de vertebrados) da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Sua sequência contém 18 resíduos de aminoácidos e possui quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto (BARBOSA et al., 2007). O peptídeo tem amplo espectro de atividade contra bactérias, protozoários, células tumorais e fungos. Sua ação antifúngica foi analisada isoladamente, e em associação com antifúngicos pertencentes à classe dos azólicos e demonstrou efeito inibitório sobre o crescimento do

isolado 78 de leveduras *Candida albicans* (a qual é resistente ao fluconazol, segundo testes *in vitro)*. A biodisponibilidade foi testada e revelou que, cinco minutos após sua administração, a Gomesina concentra-se em órgãos de tropismo dos fungos e não é tóxica para animais.

No Brasil, foi desenvolvida uma cola de fibrina a partir da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que é usada para a fixação e integração de enxerto de pele. A nova cola de fibrina é biodegradável, livre de componentes do sangue humano em sua composição, evitando desta forma a transmissão de diversas doenças. A cola de fibrina também demonstrou alta capacidade adesiva. Seu mecanismo de ação envolve a coagulação sanguínea, em que a trombina cliva o fibrinogênio em fibrina (BARROS et al., 2009).

Na América Central, foi isolada da peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* a margotoxina. Esta toxina apresentou similaridade estrutural e homologia em sua sequência com a caribdotoxina e iberotoxina, as quais atuam bloqueando canais para potássio, apresentando uma alta especificidade e seletividade para K_v1.3. Estudos relacionam os canais K_v1.3 e a proliferação de células cancerosas. A margatoxina foi utilizada no tratamento de adenocarcinoma de pulmão humano e demonstrou bloquear significativamente K_v 1.3, reduzindo o crescimento das células cancerígenas (JANG et al., 2011).

Da anêmona do mar denominada *Stichodactyla helianthus*, isolou-se a toxina ShK, que apresenta ação de bloqueio de canais para potássio do tipo K_v1.3. Um análogo desta toxina vem sendo produzido e testado em humanos desde 2011. Em modelos animais a ShK demonstrou um relevante potencial terapêutico no tratamento de doenças auto-imunes entre elas, esclerose múltipla, artrite reumatoide, glomerulonefrite auto-imune e psoríase (CHI et al., 2012).

Estudos demonstraram que a clorotoxina, presente na peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* encontrado na África em especial no Egito, interagem de modo muito específico com a superfície celular de gliomas, bloqueando canais para cloreto presente nas mesmas (LEWIS; GARCIA, 2003). Os gliomas são tumores que tem sua origem a partir das células da glia, deste modo aparecem inicialmente no cérebro e coluna vertebral, são tumores com elevado grau de agressividade e o prognóstico na maioria dos casos é negativo. Uma nova toxina presente na peçonha do escorpião chinês *Buthus*

*matensii Karsch (*rBmK Cta) também tem sido estudada. Trata-se de uma clorotoxina-símile, que já foi clonada e sequenciada. O novo peptídeo tem 68% de identidade em sua sequência de aminoácidos com a clorotoxina. Estudos mostraram que a rBmK CTa é capaz de inibir o crescimento de células de glioma, em doses muito baixas, apresentando toxicidade específica, sem efeito significativo sobre os astrócitos normais. Tais peptídeos são relevantes ferramentas para o desenvolvimento de novas drogas anti-neoplásicas (FU et al., 2007).

1.2. Animais Venenosos e Peçonhentos

Os animais venenosos e peçonhentos provocam deslumbre há milhares de anos nos povos do Mediterrâneo e Oriente, uma vez que tais animais estão na cultura desses povos em inúmeros mitos e lendas (CLOUDSLEY-THOMPSON, 2001). No Egito, uma das primeiras grandes civilizações da humanidade, é nítida a relevância dos animais peçonhentos, a exemplo os escorpiões, pois sua imagem está associada à divindade Seth a qual simboliza violência, traição, maldade, etc. (WIKIPEDIA, 2013).

Do antigo Egito destaca-se também o Papiro de Ebers, 1.500 a.C, um dos documentos mais remotos e importantes relacionados à medicina. Neste há uma lista com os mais diversos elementos utilizados na medicina, dentre estes toxinas oriundas de vegetais, metais e venenos animais (OGA, CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Com o desenvolvimento da ciência e da medicina, as toxinas desses animais estão cercadas de mitos e realidades (HARVEY; OVERVIEW, 2009). A principal forma de distinguir os animais venenosos e peçonhentos está relacionada ao mecanismo de envenenamento da vítima baseado na presença ou não de aparato inoculador. São animais peçonhentos aqueles que têm glândulas inoculadoras de peçonha, ferrões, aguilhões ou dentes por onde a peçonha possa passar de forma ativa (Figura 1). Entre estes animais, encontram-se as aranhas, serpentes, abelhas, escorpiões, vespas, arraias, etc. Por sua vez, os animais que não possuem dispositivo responsável pela inoculação são denominados venenosos (Figura 2). O envenenamento neste

caso ocorre por um mecanismo passivo, por compressão, como no caso de acidentes com lagartas, sapos, rãs, taturanas, etc. (PARANÁ, 1997).

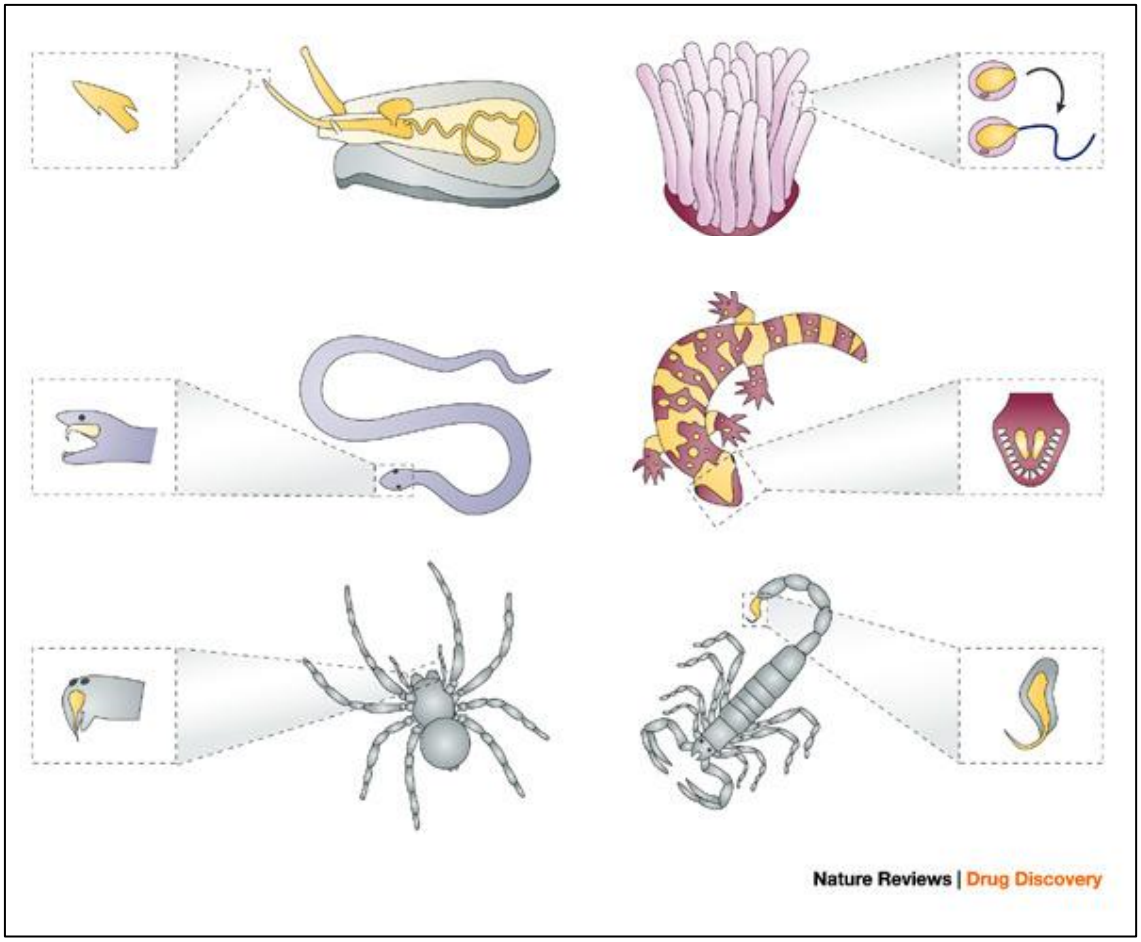

Figura 1. Representação dos aparelhos inoculadores da peçonha de diferentes animais peçonhentos. Conus (arpão/nematocisto), Anêmona (nematocisto), Escorpião (aguilhão), Serpente (dentes/presas), Monstro-de-Gila ou ''lagarto''(dentes incisivos) e aranha (quelíceras) (LEWIS; GARCIA, 2003).

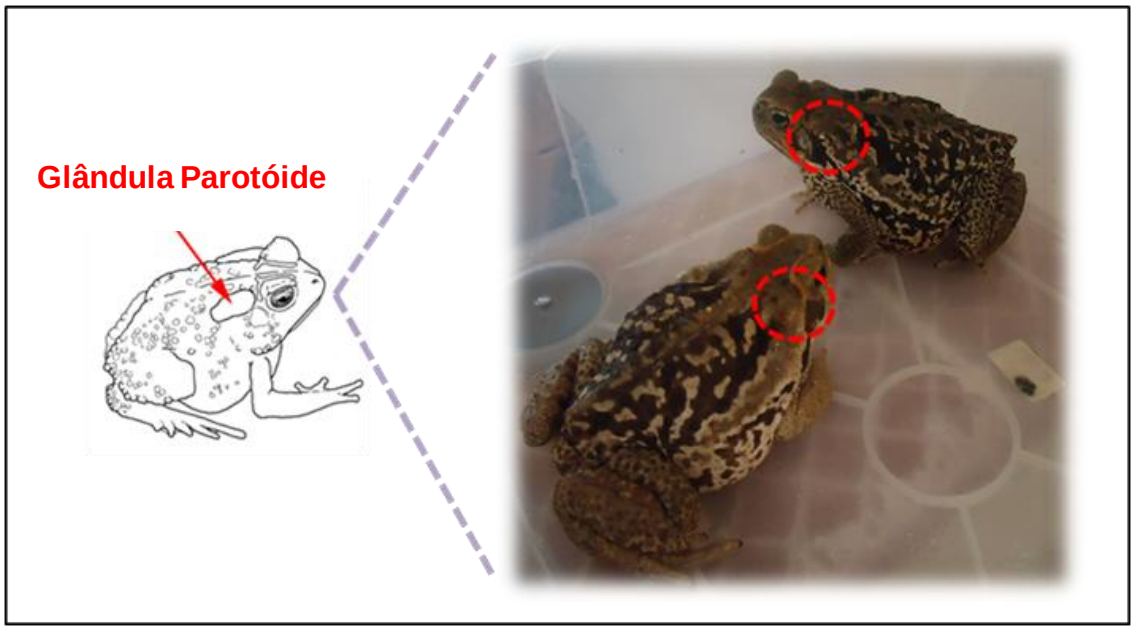

Figura 2. Representação da glândula parotóide de sapo. As glândulas são responsáveis pela produção de veneno e através da compressão o mesmo é liberado, causando o envenenamento (Foto do Laboratório de Toxinas Animais FCFRP-USP).

1.3. Escorpiões

Escorpiões são animais perigosos, de hábitos noturnos e cuja característica mais marcante é a alta toxicidade de sua peçonha (MARCUSSI et al., 2011). Estes animais são os aracnídeos mais antigos encontrados na Terra, havendo relatos de sua existência há mais de 400 milhões de anos (MA et al., 2012).

As principais funções da peçonha escorpiônica são a imobilização da presa e defesa contra predadores, contribuindo significativamente para a preservação morfológica dos escorpiões ao longo de seu processo evolutivo (MA et al., 2012). Além disso, peculiaridades encontradas no organismo dos escorpiões, como a baixa taxa metabólica e a baixa perda cutânea de água também contribuíram para sua evolução (COLOGNA et al., 2009).

Os escorpiões habitam savanas, florestas tropicais, regiões litorâneas, desertos, cavernas, ou seja, estão amplamente distribuídos em todo o mundo, com exceção da Antártica (KOMPOSCH, 2010).

Em geral, as espécies de escorpiões apresentam características morfológicas semelhantes, como seu esqueleto externo (quitinoso), quatro

pares de pernas, quelíceras e pedipalpos (MARCUSSI et al, 2011). O seu corpo é dividido em cefalotórax (prossoma), tronco (mesossoma) e falsa cauda (metassoma). O prossoma é coberto por uma carapaça na qual se encontram um par de olhos medianos e até 6 pares de olhos laterais. No opistossoma, constituído por mesossoma (abdômen) e metassoma (falsa cauda) existem até 12 segmentos, sendo os últimos responsáveis pela formação da falsa cauda do animal (MARCUSSI et al, 2011). No telson, encontra-se o aparato responsável pela inoculação da peçonha denominado aguilhão e as glândulas elaboradoras da mesma. O corpo dos escorpiões em sua totalidade é dotado de cerdas, que funcionam como órgãos sensoriais amoldados para captar sensações químicas, variações de umidade e térmicas (MARCUSSI et al., 2011). Na porção ventral dos escorpiões, existe um par de pentes ou pectinas, cujas funções são captar as vibrações do ambiente e atuar como quimiorreceptores (MARCUSSI et al., 2011).

Atualmente, são descritas aproximadamente 1.500 espécies de escorpiões no mundo, as quais foram distribuídas segundo sua classificação filogenética e taxonômica em 6 superfamílias, 13 famílias, 18 subfamílias, 10 tribos e 2 subtribos (PRENDINI; WHEELER, 2005; SOLEGLAD et al., 2005). Aproximadamente 34 espécies pertencentes à família Buthidae são consideradas perigosas para o homem, sendo os gêneros *Tityus, Centruroides, Mesobuthus, Hemiscorpius, Parabuthus, Leiurus, Buthus, Androctonus Hottenta* e *Androctonus* os principais representantes da família Buthidae (Chippaux and Goyffon, 2008).

No Brasil, o gênero *Tityus* é o responsável pelos casos de escorpionismo registrados. Já foram descritas 13 espécies diferentes no país (Tabela 1), porém *Tityus serrulatus* (Ts), conhecida como escorpião amarelo (Figura 3), é a espécie mais perigosa (PETRICEVICH; LEBRUN, 2005), sendo a responsável pelo maior número de acidentes e também pelos mais graves, com maior incidência no Nordeste e Sudeste do país.

Tabela 1 – Características morfológicas e distribuição geográfica dos escorpiões do gênero *Tityus* no Brasil. Tabela adaptada de dados publicados por Marcussi et al. (2011) e Brasil (2012).

Gênero *Tityus* (Espécies Peçonhentas no Brasil)	Características Físicas (Identificação do animal)	Distribuição no Brasil *(Onde é encontrado)*
T. serrulatus	Tronco escuro, pernas e cauda amarelas, falsa cauda serrilhada.	Minas, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás.
T. bahiensis	Tronco e cauda na coloração marrom/avermelhada espinho subaculear no telson	São Paulo, Santa Catarina, Bahia, Mato Grosso do Sul
T. paraensis ou obscururs	Animal totalmente negro	Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia
T. metuendus	Tronco vermelho-escuro, com manchas amarelo-avermelhadas em suas pernas; na cauda há um espessamento entre os dois últimos artículos	Pará e Acre
T. trivittatus	Coloração amarelo-escura ou marrom-clara; tem três faixas longitudinais escuras quase negras; pode apresentar algumas variações na coloração	Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, Minas Gerais
T. stigmurus	Corpo amarelado, espinho subaculear no telson e serrilha na cauda.	Encontrado somente no Nordeste do país
T. brazilae	Pedipalpos, pernas e metassoma amarelo-avermelhados com manchas escuras; mesossoma amarelo-avermelhado com três tiras na parte dorsal.	Bahia, Espírito Santo e Sergipe
T. cambridge	Perna, pedipalpos e metassoma pretos.	Amapá e Pará
T. confluens	Pedipalpos, pernas e metassoma amarelo-escuros e mesossoma marrom.	Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Tocantins.
T. costatus	Prossoma, pernas, mesossoma e metassoma marrom-amarelados com pontos escuros nas pernas e pedipalpos.	Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo.
T. faciolatus	Pernas, mesossoma, prossoma e metassoma marrom-amarelados; apresenta três listras escuras longitudinais na parte dorsal do mesossoma e também manchas nas pernas e pedipalpos.	Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais.
T. mattogrossensis	Pernas, prossoma, mesossoma e metassoma marrom-amarelados e com manchas escuras no quarto e quinto segmentos metassomais.	Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins.
T. neglectus	Pernas, prossomas, mesossoma e metassoma marrom-amarelados ou marrom-avermelhados com uma mancha escura e triangular no prossoma.	Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Bahia e Alagoas.

O *T. serrulatus* é encontrado em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás (Tabela 1). Apresenta tronco escuro e pedipalpos, falsa cauda e pernas amareladas. No lado dorsal da cauda há uma "serrilha" característica da espécie, origem do epíteto específico "*serrulatus*" na espécie (LUTZ; MELLO, 1922; MARCUSSI et al., 2011). Ele pode atingir até 7 cm de comprimento e, diferentemente da maioria dos escorpiões que se reproduzem sexuadamente, é capaz de reproduzir-se de maneira assexuada por (partenogênese) dando origem a outras fêmeas, que darão continuidade a esta forma de reprodução (COLOGNA et al., 2009).

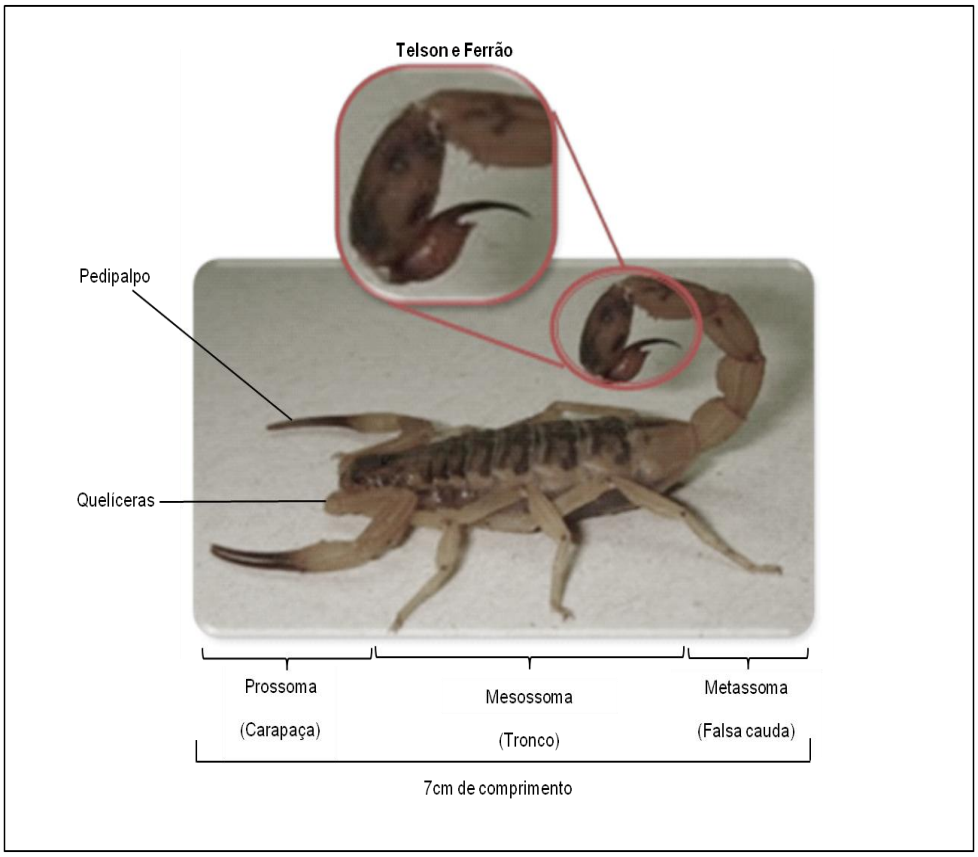

Figura 3. Morfologia do escorpião *Tityus serrulatus.* (Foto do Laboratório de Toxinas Animais FCFRP-USP).

A gestação dos escorpiões compreende um período de 3 a 6 meses e podem ocorrer oscilações no número de filhotes. O escorpião *T. serrulatus* apresenta, em média, 10 filhotes, enquanto que em algumas espécies observam-se até 90 filhotes (BARRAVIERA, 1994; LOURENÇO; CUELLAR,

1995). Os escorpiões alimentam-se de cupins, baratas e outros insetos. Seus predadores são sapos, gaviões, galinhas, etc.

1.4. Escorpionismo

Os acidentes envolvendo escorpiões representam um grave problema de saúde pública em determinadas regiões do Brasil e nas mais diferentes partes do mundo (RIBEIRO et al., 2010).

Anualmente, ocorrem 1,5 milhões de acidentes envolvendo escorpiões no mundo, esses culminam em cerca de 2.600 óbitos (CHIPPAUX, 2012). No Brasil, observa-se um aumento no número de casos de escorpionismo na última década (Figura 4), consequência do crescimento urbano desenfreado e da ausência de infraestrutura e saneamento, aliados à migração e fácil adaptação deste animal ao ambiente urbano, o qual fornece as condições necessárias para sua proliferação (BRASIL, 2012).

Em 2012, foram notificados 63.871 acidentes causados por escorpiões no Brasil (Figura 4); porém, há indícios de que o número seja ainda maior, pois muitos dos acidentes envolvendo animais peçonhentos no país não são notificados, consequência da falta de conscientização da população em relação ao ocorrido e de falhas na identificação do quadro clínico por parte das equipes de saúde (BRASIL, 2010). Além disso, em 2012, foram notificados 94 óbitos (Figura 5) por acidente escorpiônico, com destaque para as regiões Sudeste e Nordeste (BRASIL, 2012).

O maior registro destes acidentes concentra-se no quarto trimestre do ano. As regiões do corpo mais atingidas são os membros superiores, em pessoas com faixa etária de 20 a 49 anos.

Tomando por base esses fatos relatados, é nítida a necessidade de se adotar medidas para evitar acidentes com escorpiões, entre elas merece destaque a limpeza e manutenção da organização do ambiente urbano, a fim de evitar o acúmulo de entulhos e lixo.

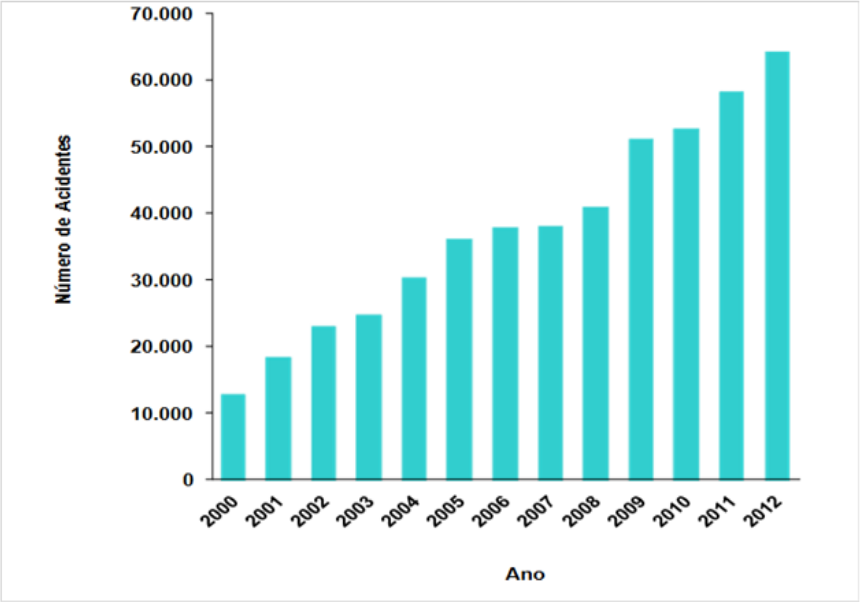

Figura 4. **Representação gráfica do número de acidentes escorpiônicos no Brasil entre os anos de 2000 a 2012.** Os dados para a construção do gráfico foram retirados da tabela presente no site do Ministério da Saúde (BRASIL, 201).

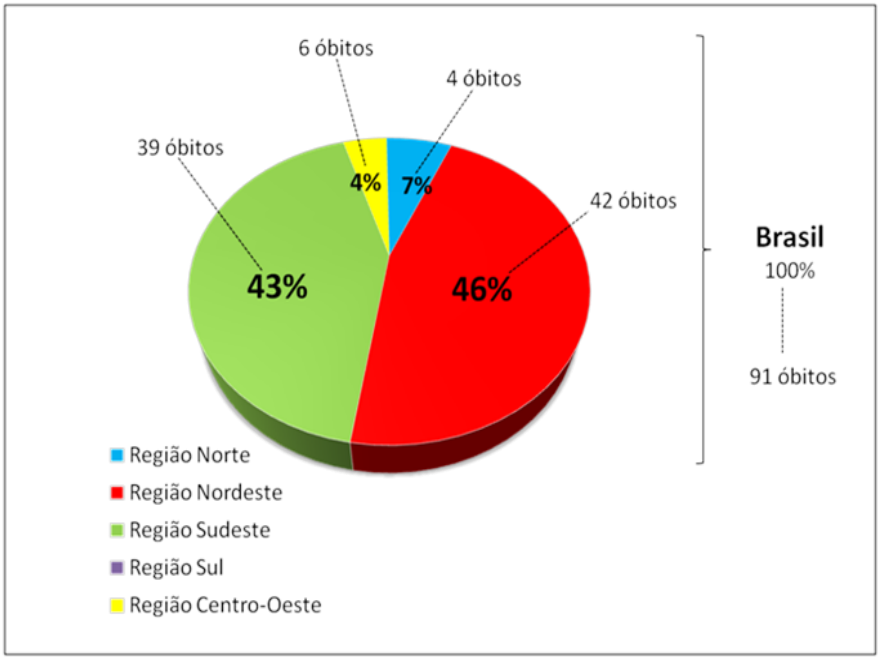

Figura 5. **Representação gráfica da porcentagem de óbitos decorrentes de escorpionismo que ocorreram nas regiões brasileiras em 2011.** Os dados para a construção do gráfico foram retirados da tabela presente no site do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013).

1.5. Manifestações Clínicas

As principais manifestações clínicas por acidentes escorpiônicos são locais. A dor no local da picada é frequente (95% dos casos) e de intensidade variável, desde leve até muito intensa, às vezes até mesmo insuportável, manifestando-se sob a forma de agulhada, ardor ou queimação e, em alguns casos, acompanhada de parestesia. Esta dor pode ainda irradiar-se até a raiz do membro acometido, o que exacerba a percepção de palpação na área. No local da picada também se pode observar hiperemia, fasciculação, sudorese, pieloereção, eritema e edema (SANTOS et al., 2012). As manifestações sistêmicas ocorrem em menor proporção e as neurotoxinas são as principais responsáveis por estas manifestações, devido aos seus efeitos colinérgicos e adrenégicos. Entre as manifestações sistêmicas estão: sudorese excessiva, vômitos, náuseas, agitação alternada com sonolência, diarreia, sialorreia, cefaleia, arritmias respiratórias, hipertensão ou hipotensão, priapismo e calafrios (SANTOS et al., 2012). Os sintomas mais graves consistem em crises convulsivas, tremores, espasmos, alterações cardíacas e edema agudo de pulmão, devido ao influxo de Ca^{+2} e liberação de neurotransmissores dos terminais nervosos simpáticos, parassimpáticos, e medula adrenal (ULUG et al., 2012), podendo até mesmo, em casos mais graves, levar o paciente a óbito (FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994).

O tratamento se faz com anestésicos (lidocaína a 2%) sem vasoconstritor (1-2 mL para crianças e 3-4 mL para adulto) no local da picada ou por bloqueio. Este procedimento pode ser repetido por até três vezes com intervalo de 60 minutos e/ou utilização de analgésicos não-opióides de uso oral ou via parenteral (SANTOS et al., 2012). Mesmo nos casos mais leves, o paciente sempre deve receber assistência médica e ficar em observação por um período de 4 a 6 horas após a picada (COLOGNA et al., 2009).

Nos casos mais graves o soro deve ser administrado. O soro antiescorpiônico (SAE) é uma solução de imunoglobulinas de cavalos específicas, purificadas e concentradas; e sua administração ocorre por via parenteral. Na ausência do SAE, ou caso exista dúvida quanto à identificação do animal (aranha ou escorpião), o soro antiaracnídeo (SAA) deve ser administrado (PUCCA, 2012).

Idosos e crianças são mais sensíveis à peçonha, por isso a maioria dos casos graves está nesse grupo (MARCUSSI et al., 2011).

1.6. Composição da Peçonha de *Tityus serrulatus*

A peçonha do escorpião *T. serrulatus*, é obtida através da estimulação elétrica do télson do animal, tem aspecto leitoso, é opalescente e constituída por uma mistura de muco, proteínas básicas neurotóxicas, nucleotídeos, aminoácidos e enzimas (VASCONCELOS et al., 2005). A composição da peçonha pode variar de acordo com os hábitos alimentares, região geográfica e variações genéticas (MARCUSSI et al., 2011).

A peçonha do escorpião amarelo é uma importante fonte de proteínas neurotóxicas, capazes de interagir com alta especificidade a canais iônicos (COLOGNA et al., 2009). Tal fato desperta o interesse de pesquisadores em isolar e caracterizar tais proteínas e peptídeos, visando tratamentos mais eficazes nos casos de envenenamento e a compreensão de mecanismos fisiológicos, patológicos e biológicos (DE LA VEGA; SCHWARTZ; POSSANI, 2010).

A função primordial dessas neurotoxinas consiste no ataque e imobilização da presa. Porém, exerce uma função secundária ao ser usada como mecanismo de defesa contra predadores (BOSMANS; TYTGAT, 2007). Mohammed (1944) descreveu os primeiros métodos de purificação e caracterização de toxinas presentes na peçonha de escorpiões egípicios.

Em 1970, Miranda e colaboradores, desenvolveram um método para a purificação de toxinas dos escorpiões *Androctonus australis, Leiurus quinquestriatus quinquestriatus, Buthus occitanus tunetanu*, isolando 11 toxinas ativas em insetos, mamíferos e crustáceos (MIRANDA et al., 1970).

No Brasil, o escorpião *Tityus serrulatus,* ou escorpião amarelo, tem sido o alvo de inúmeras pesquisas e muitas de suas toxinas já foram isoladas e caracterizadas. Os primeiros trabalhos foram realizados nas décadas de 60 e 70, por Diniz e Gonçalves (1960). No mesmo período, a Tityustoxina (Ts1) foi purificada e caracterizada.

No ano de 1989, Arantes e colaboradores desenvolveram uma nova metodologia para a purificação da peçonha do escorpião amarelo, na qual foi

abolido o uso de filtração em gel em Sephadex. A partir da realização de cromatografia da peçonha bruta do escorpião *T. Serrulatus* em coluna de CM-Celulose-52, foram obtidas treze frações (I-XIII), dentre as quais a XIII foi considerada pura e denominada TsTX-I (ARANTES et al., 1989).

Estudos posteriores envolvendo a caracterização dessa toxina apontaram para uma possível confusão envolvendo nomenclaturas, uma vez que a fração XIII mostrou ser a mesma isolada por Possani et al. (1977) como TsTX-γ (ARANTES et al., 1989).

Atualmente esta fração é denominada Ts1 (COLOGNA et al., 2009), sendo a toxina de maior toxicidade e a mais abundante na peçonha do escorpião *T. serrulatus*. Pertence à classe das β-neurotoxinas e é tóxica para mamíferos e insetos ao interagir com o sítio 4 de canais para sódio (ARANTES et al., 1989).

A Ts2 foi isolada e caracterizada como uma toxina em 1992 por Mansuelle e colaboradores. Esta toxina também é conhecida como TsTX-III, III-8, entre outras denominações (MARCUSSI et al., 2012). A Ts2 foi inicialmente considerada uma β-neurotoxina, por apresentar 72% de identidade com a Ts1 em sua sequência de aminoácidos (MANSUELLE et al., 1992). No entanto, Sampaio et al. (1991) observaram que a Ts2 apresentava uma clássica característica das α-neurotoxinas, uma vez que a Ts2 prolonga a duração do potencial de ação do nervo vago de coelhos. Foram constatadas diferenças imunológicas entre a Ts1 e Ts2. Levando em consideração estes resultados contraditórios, Cologna et al. (2012) avaliaram esta toxina em canais para sódio clonados e expressos em *Xenopus laeves* e confirmaram que a mesma retarda a inativação de canais para Na^+, mostrando ação de α-neurotoxina (COLOGNA et al., 2012).

A Ts3 foi chamada de Tityustoxina ou TsTX, apresenta 62 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 7.240 Da e capacidade de inibir a inativação de canais para sódio, sendo assim, uma α-neurotoxina. Esta interage com o sítio 3 de canais para sódio e é capaz de induzir a liberação de diversos mediadores químicos, tais como a acetilcolina e catecolaminas. Esta toxina também exerce ação sobre a despolarização das fibras nitrégicas e liberação de óxido nítrico, levando ao relaxamento do músculo liso cavernoso (MARCUSSI et al., 2011).

Na peçonha do *T. serrulatus* foi encontrado um peptídeo não tóxico, porém este desencadeou reações alérgicas, lacrimação e liberação de neurotransmissores. Tal peptídeo foi denominado Ts4. A Ts5 apresenta 64 residuos de aminoácidos, massa molar de 7.200 Da e alta letalidade. É uma α-neurotoxina da peçonha do escorpião amarelo e bloqueia o sistema de inativação dos canais para sódio.

As toxinas com atividade específica para canais para potássio, Ts6, Ts7, Ts8 e Ts9, agem em diversos subtipos de canais para K^+ e são basicamente constituídas por uma α-hélice e folhas-β estabilizadas por até 4 pontes dissulfeto (BLAUSTEIN et al., 1991; NOVELLO et al., 1999).

Os peptídeos Ts10 e Ts14 potencializam a ação da bradicinina, que é um mediador relacionado à vasodilatação e ao processo inflamatório. As toxinas Ts11, Ts12 e Ts13 ainda não tiveram suas funções esclarecidas. Esses peptídeos apresentam massas moleculares de 2.900 a 3.000 Da e são ligados por 4 pontes dissulfeto. São, deste modo, os peptídeos mais compactos presentes na peçonha do escorpião *T. serrulatus* (COLOGNA et al., 2009).

A toxina Ts15 contém 36 resíduos de aminoácidos, 3.956 Da e pI igual ou maior que 9,3. Bloqueia canais para potássio $K_v1.2$ e K_v 1.3 e seu mecanismo de ação consiste em um bloqueio físico do canal (COLOGNA et al., 2011).

A Ts16 ou Tityustoxina-16, com 29 resíduos de aminoácidos, bloqueia canais para potássio e pertence à subfamília α-Ktx20. Sua massa molecular de 3.325 Da foi determinada por espectrometria de massas (BORDON et al., 2011)).

Em 2012, Alvarenga e colaboradores obtiveram através do transcriptoma da glândula produtora de peçonha de *Tityus serrulatus* três novas toxinas denominas Ts17, Ts18 e Ts19. As toxinas Ts17 e Ts18 apresentam similaridade com toxinas de escorpiões que atuam em canais para os íons Na^+, porém é de suma importância a concretização de ensaios funcionais para ratificação. A Ts17 apresentou 85% de identidade com a Ts5 e 86% de identidade com a Ts3, também foi possível observar 95% de identidade com a sequencia da TBtx5 de *Tityus bahiensis. A* análise da Ts17 demonstrou que esta possivelmente apresenta motivo GKK em sua porção C-terminal (ALVARENGA et al, 2012).

Quando analisada em BLAST a Ts18 foi alinhada com um peptídeo que atua em canais para Na^+, oriundo do escorpião *H. Judaicus,* dada à similaridade entre os mesmos. Porém, a Ts18 é dotada de algumas peculiaridades observadas nas KTxs. Entre estas, o fato da Ts18 ser uma toxina mais curta que as outras que apresentam função em canais para os íons sódio. Ela, como as KTxs, tem seis cisteínas em sua constituição, ou seja, apresenta três pontes dissulfeto (ALVARENGA et al, 2012).

A Ts19 é uma toxina que pertence às KTxs e na sequência que corresponde ao peptídeo maduro foram identificadas três pontes dissulfetos. Entre as toxinas que apresentam identidade com a Ts19, apenas a oriunda de *Mesobuthus martensi* (BmtxK) foi submetida a ensaios para verificar sua ação funcional, demonstrando sua capacidade de bloquear canais permeáveis aos íons potássio (ZHU et al., 1999).

Outros componentes relevantes da peçonha de escorpião são pouco estudados, como as proteases e as hialuronidases. A hialuronidase é uma enzima encontrada na peçonha de abelhas, escorpiões, serpentes. Esta enzima é responsável por acelerar a degradação de hialuronan da matriz extracelular, propiciando uma rápida difusão das toxinas no organismo da vítima. Possani e colaboradores (1977) evidenciam que a peçonha de *Tityus serrulatus* apresentava atividade hialuronidásica. Em 2001, Pessini e colaboradores conseguiram isolar a hialuronidase da peçonha de *Tityus serrulatus* através de troca catiônica em CM-celulose em pH 7,8 seguida por recromatografia da fração com atividade na mesma coluna em pH 4,7 (PESSINI et al., 2001).

Em 2002, Almeida e colaboradores identificaram proteases na peçonha dos escopiões *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*. As enzimas com atividade proteolítica estão presentes nas peçonhas e venenos e podem estar relacionadas ao processamento pós-transducional das toxinas (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 1994).

1.7. Sistema Nervoso e Potencial de Ação

Através de potenciais de ação, ocorre a transmissão de informações no organismo humano, as quais estão relacionadas à execução das mais distintas

e complexas atividades, entre elas, a secreção de hormônios, sensações térmicas, andar, pensar, entre outras tantas (GUYTON; HALL, 2002).

A transmissão destas informações ocorre devido a formação de cadeias neuronais, as quais são capazes de transmitir informações entre os neurônios e os músculos. O mecanismo de abertura e fechamento de canais iônicos dependentes de voltagem para Na^+, K^+, Ca^{2+} são controlados por alterações no potencial transmembrânico.

Na parte interna da membrana da fibra nervosa, há o potencial de membrana de aproximadamente -70 mV a -90 mV, o qual é resultado de diferenças de concentração iônica entre o meio interno e externo da membrana e da maior permeabilidade aos íons K^+ e Cl^- em condição de repouso (GUYTON; HALL, 2002).

Durante o potencial de ação ocorre a passagem de corrente elétrica através da fibra nervosa ao axônio. Devido a essa corrente elétrica, os canais para sódio são abertos (estado ativado) e então, ocorre a propagação do potencial de ação ao longo de toda extensão da fibra nervosa (GUYTON; HALL, 2002).

O potencial de ação incide em uma série de variações de potencial de membrana. Essas variações então resultam na difusão de sinal ao longo da fibra nervosa. A variação brusca do potencial de membrana (negativo) para a positividade e logo em seguida seu retorno ao estado inicial (negativo), é chamado de potencial de ação ou impulso nervoso (CATTERALL, 1984).

Através desse mecanismo, as informações são conduzidas de uma parte do organismo para outras partes do mesmo. A consequente despolarização da célula propicia uma alteração conformacional nos canais para cálcio dependentes de voltagem, os quais mudam para seu estado ativado, e possibilitam o influxo de cálcio para o interior da célula (BAUERFEIND et al., 1995).

Sobrevém então a mobilização da vesícula sináptica, e ocorre a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Quando liberados na fenda sináptica, os neurotransmissores podem ligar-se com auto-receptores da membrana pré-sináptica, inibindo sua liberação, ou mesmo aos receptores pós-sinápticos, gerando potenciais excitatórios ou inibitórios (COLOGNA et al.; 2011).

Dessa forma, pode-se observar o modo como os canais iônicos estão intimamente ligados ao processo de neurotransmissão e consequentemente com a efetivação de inúmeras atividades. Existem diversos neurotransmissores os quais podem ser divididos em dois grandes grupos: os peptídeos e as pequenas moléculas, como exemplos as aminas biogênicas e aminoácidos (SNYDER, 2009). Destacam-se os neurotransmissores glutamato (excitatório) e o GABA (inibitório). O aumento de neurotransmissores na fenda sináptica desencadeia os efeitos de envenenamento.

As toxinas escorpiônicas podem atuar aumentando a permeabilidade da membrana aos íons sódio e a outros íons, mas também podem inibir ou induzir a liberação e captação de neurotransmissores, por causarem alterações na permeabilidade da membrana (COLOGNA et al., 2009).

1.8. Toxinas com Ação em Canais Iônicos

Os canais iônicos sensíveis a voltagem são proteínas integrais de membrana que apresentam permeabilidade seletiva ao íons Na^+, K^+, Cl^- ou Ca^{2+}, os quais são fundamentais no processo de geração e propagação de sinais elétricos em células excitáveis.

Esses canais alteram a sua conformação para aberto, fechado ou inativado, em função do potencial de membrana, propiciando um movimento eficiente e rápido de íons específicos a favor do gradiente eletroquímico. Desta maneira, correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, levando à despolarização ou repolarização da membrana (CATTERALL, 1984).

A maioria das toxinas escorpiônicas são polipeptídios que apresentam alta afinidade e especificidade para canais iônicos (POSSANI et al., 2000). As principais toxinas de escorpiões podem ser divididas em dois grupos: toxinas de cadeia longa, que apresentam de 59 a 72 resíduos de aminoácidos estabilizados por 4 pontes dissulfeto, e toxinas de cadeia curta, as quais têm de 22 a 42 resíduos de aminoácidos estabilizadas por 3 a 4 pontes dissulfeto (POSSANI, 2012). As toxinas de cadeia longa afetam principalmente canais para íons sódio dependentes de voltagem, enquanto as toxinas de cadeia curta afetam canais dependentes de voltagem permeáveis aos íons potássio.

Entre os canais iônicos, os canais para sódio foram os primeiros a serem descobertos. Esses canais são os responsáveis pelo influxo de íons sódio para o interior celular e realizam assim a despolarização da membrana, dando início ao potencial de ação em células nervosas, endócrinas, musculares, etc. (CATTERALL et al., 2007).

Os canais para sódio estão distribuídos ao longo da membrana plasmática de todas as células animais. Tais canais são proteínas transmembrana fundamentais no processo de geração e propagação dos potenciais de ação, através do aumento dependente de voltagem da permeabilidade da membrana ao sódio (MARCUSSI et al., 2011).

As proteínas que constituem os canais para sódio dependentes de voltagem formam poros na membrana celular, que permitem que os íons sódio atravessem de forma seletiva a membrana. A subunidade α (Fig. 6) formadora do poro (de 220 kDa a 260 kDa) é constituída por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo seis segmentos de α-hélice (S1-S6).

A subunidade α pode estar associada a uma ou duas subunidades β auxiliares (33-36 kDa). Duas funções básicas associadas a essa são modulação da atividade do canal e interação entre as células (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

Na subunidade α os segmentos S4 são positivamente carregados e atuam como sensores de voltagem do canal. São os responsáveis pela ativação, ou abertura do canal. A inativação ocorre devido à presença no segmento S6 de uma alça intracelular que liga os domínios (DII e DIV), a qual se desloca para o poro do canal logo após a despolarização.

A alça entre os segmentos S5-S6 funciona como um filtro de seletividade (CESTÈLE; CATTERALL, 2000; MARCUSSI et al., 2011).

Foram identificadas e funcionalmente caracterizadas nove isoformas de canais para sódio dependentes de voltagem denominadas, $Na_v1.1$-$Na_v1.9$. De acordo com Catterall et al. (2007), estudos envolvendo canais para sódio desmonstraram que esses canais são alvos moleculares de uma ampla gama de neurotoxinas.

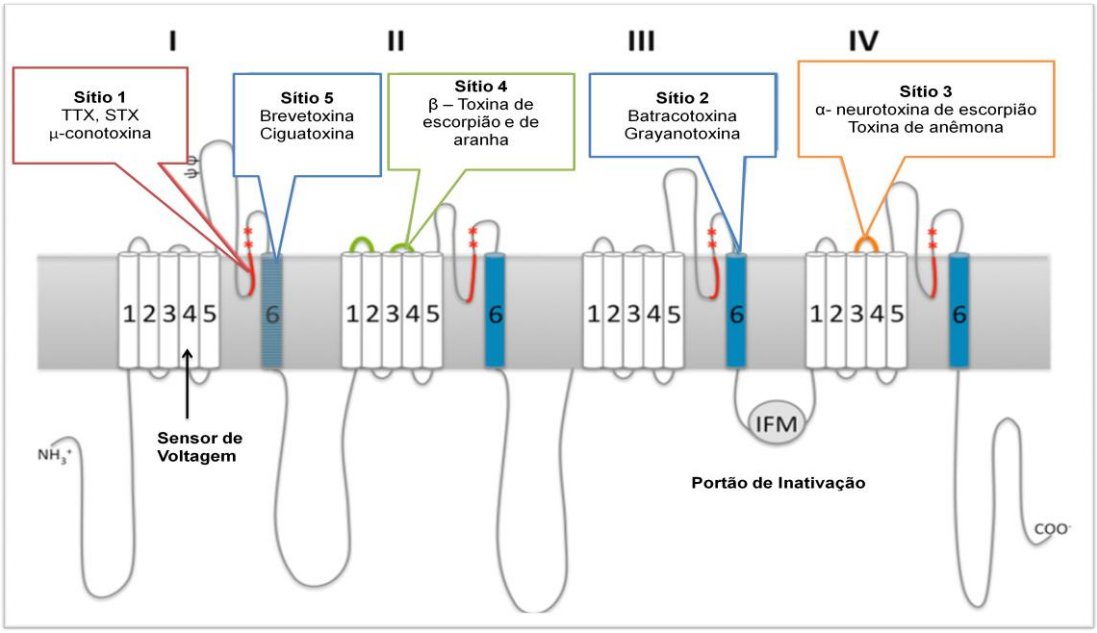

Figura 6. Representação do canal para sódio dependente de voltagem. Os domínios homólogos são numerados de I-IV e as α-hélices vão dos segmentos 1 ao 6. Os sensores de voltagem estão no segmento S4 e o portão de inativação (IFM) entre os domínios III e IV, os balões estão demonstrando os sítios nos quais as toxinas atuam. [*figura modificada conseguida de* (Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011)].

Canais para sódio são o alvo molecular de vários grupos de neurotoxinas que alteram fortemente a função do canal através de ligações a sítios receptores específicos. Devido sua elevada afinidade e especificidade, as neurotoxinas são importantes ferramentas para estudar a estrutura e a função de canais para sódio (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

As toxinas que atuam em canais para íons sódio agem alterando a cinética e a dependência de voltagem relacionada à ativação e inativação dos mesmos (CATTERALL et al., 2007).

Já foram identificados pelo menos 6 diferentes sítios de interação de toxinas em canais para sódio. As toxinas que interagem com o sítio 1 são subdivididas em dois grupos: o primeiro grupo é constituído por guanidinas heterocíclicas que têm como distinção a hidrossolubilidade. Pertencem a este grupo a tetrodotoxina (TTX) e saxitoxina (STX). O outro grupo é constituído pelas μ-conotoxinas peptídicas (MARCUSSI et al., 2011).

A TTX é uma potente toxina de origem marinha, isolada dos tecidos de várias espécies do peixe baiacu. A mesma também é encontrada em sapos, moluscos, caranguejos e polvos (CATTERALL et al., 2007). Em estudos relacionados a dor, a TTX tem sido utilizada para caracterizar funcionalmente

os canais para sódio dependentes de voltagem, os quais podem ser denifidos conforme a sua sensibilidade a esta toxina: TTX sensíveis e TTX resistentes.

Os canais para sódio exercem um papel relevante na função neuronal em condições fisiológicas e patológicas. Sendo os canais TTX sensíveis relacionados a alguns tipos de dor. Testes em animais e em humanos nos quais a TTX foi utilizada, demonstraram seu potencial terapêutico na dor (RAFAEL NIETO et al., 2012). Em um teste utilizando coelhos, a TTX foi administrada na córnea como anestésico tópico, apresentando ação prolongada (SCHWARTZ et al., 1998; RAFAEL NIETO et al., 2012).

A STX é produzida por dinoflagelados *Gonyaulax catenella*, que constituem o fitoplâncton base da cadeia alimentar marinha. Sendo assim, a STX é encontrada em mexilhões e mariscos que são aplicados na alimentação humana nas mais distintas regiões do planeta.

As µ-conotoxinas peptídicas são isoladas a partir da peçonha do caracol marinho *Conus geographus*, o qual pertence à classe Mollusca e ao filo Gastropoda. Este distinto habitante dos mares tropicais é temido pela toxicidade de sua peçonha que atua em canais para sódio (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

As toxinas citadas acima ocupam o sítio receptor 1 e bloqueiam fisicamente a abertura do poro do canal e consequentemente a condutância aos íons sódio. Acredita-se que a TTX e as µ-conotoxinas apresentem uma sobreposição, mas não sítios de ligação idênticos.

As grayanotoxinas são produzidas por plantas pertencentes à família Ericaceae, no gênero *Rhododendron* encontramos a Azaléia e Kalmia, plantas de grande beleza e popularidade. A doença do mel bravo, ou seja, a intoxicação alimentar decorrente do consumo de mel produzido a partir destas plantas apresenta como sintomas: fraqueza, transpiração excessiva, tonturas, náuseas, vômitos entre outros sintomas nos casos leves. No entanto, podem ocorrer complicações cardíacas que podem até mesmo levar o paciente a óbito (KOCA; KOCA, 2007).

A batracotoxina encontrada na pele do sapo *Phyllobates aurotaenia* e nas penas e pele da ave *Pitohui dichrous* é uma potente neurotoxina e, assim como a grayanotoxina, liga-se ao sítio 2 dos canais para sódio dependentes de voltagem. Tais toxinas ligam-se preferencialmente ao estado ativado dos

canais para sódio e provocam a ativação persistente dos mesmos, o que propicia através de um mecanismo alostérico, o boqueio da inativação do canal para sódio e o deslocamento da dependência de voltagem de ativação para potenciais de membrana mais negativos (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

No sítio 3 de canais para sódio ligam-se vários grupos de toxinas polipeptídicas: α-toxinas de escorpião, toxinas de anêmonas do mar e algumas toxinas de aranhas.

As α-toxinas escorpiônicas são uma família de neurotoxinas constituída por polipeptídeos, cada um contendo 60 a 70 resíduos de aminoácidos, estabilizados por quatro pontes dissulfeto. Elas são divididas em três grupos conforme as suas características farmacológicas em mamíferos e insetos: α-clássicas, α-símile e anti-inseto (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

As α-toxinas escorpiônicas afetam a inativação dos canais para sódio, tornando esta lenta e normalmente incompleta, por meio de ligações com regiões específicas da subunidade α do canal (S3, S4 do domínio IV; S5, S6, dos domínios I e IV), resultando assim em um prolongamento da fase de repolarização e do potencial de ação (CATTERALL et al., 2007).

Ao sítio 4 se ligam as β-neurotoxinas de escorpião que são capazes de alterar a dependência de voltagem da ativação dos canais para potenciais de membrana mais negativos, porém sem que o sistema de inativação do canal seja afetado. Essas toxinas desencadeiam potenciais de ação repetitivos (MARCUSSI et al., 2011).

As ciguatoxinas e brevetoxinas ligam-se ao sítio 5 dos canais para sódio. Essa toxinas são de origem marinha, produzidas a partir de dinoflagelados. As mesmas causam potenciais de ação espontâneos, alteram a dependência de voltagem dos canais para sódio e bloqueiam a sua inativação (MARCUSSI et al., 2011).

Ao sítio 6 ligam-se as δ-conotoxinas isoladas do caracol marinho, as quais retardam a inativação dos canais para sódio. São polipeptídeos com cerca de 30 resíduos de aminoácidos e apresentam alta toxicidade para moluscos e baixa toxicidade para vertebrados (LEIPOLD et al., 2005).

Os canais para potássio são provavelmente o tipo mais antigo de canais iônicos, sendo encontrados em seres como bactérias e em organismos mais complexos como os humanos (COLOGNA et al., 2009). Exercem um

importante papel na regulação da excitabilidade da membrana, e estão relacionados com doenças genéticas e adquiridas, uma vez que anormalidades em proteínas desses canais levam ao mal funcionamento de neurônios, músculo liso, células cardíacas, entre outros (SHIEH et al., 2000).

Canais para potássio dependentes de voltagem são constituídos por associação de 4 subunidades α (Fig. 7) maiores e quatro subunidades β menores. Sendo a subunidade α formada por seis segmentos transmembrana (S1-S6).

A região S4 é sensível à voltagem, por possuir vários resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Os segmentos S5 e S6 juntamente com o *loop* originam a região formadora do poro, já os seguimentos S3 e S4 constituem uma estrutura que se assemelha a um remo, cuja função é a abertura e fechamento do canal (CATERRALL et al., 2007; DOYLE et al., 1998).

Em apenas uma família há mais de 40 tipos diferentes de canais, os quais são separados em até 12 subfamílias conforme sua homologia na sequência de aminoácidos K_V1-K_V12 (GUTMAN et al., 2005).

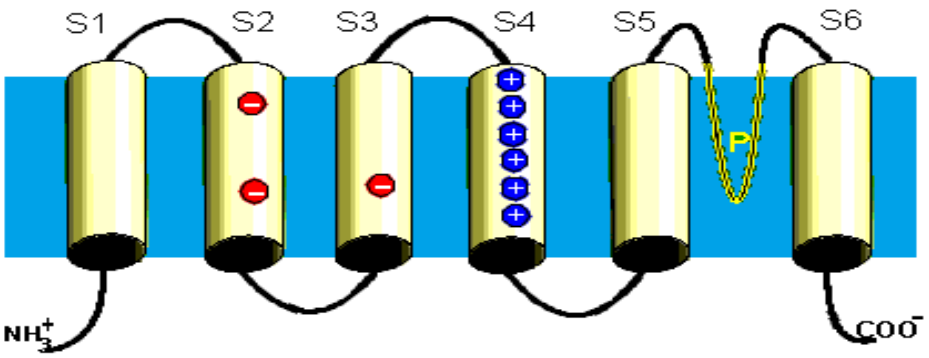

Figura 7 - Representação da subunidade α do canal para potássio. Na figura estão representados os 6 segmentos transmembrana que constituem a subunidade α do canal (INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2012).

As subfamílias dos canais para K^+ são estruturalmente similares, as quais se organizam em tetrâmeros de 4 subunidades alfa e unidos originam complexos homo e heteromultiméricos. A subfamília mais examinada dos canais para potássio é a K_v1, ou Shaker, a qual é codificada por 8 genes distintos, promulgando 8 subtipos de canais para potássio ($K_v1.1$-$K_v1.8$).

Estes 8 subtipos de canais podem ser achados em diferentes regiões do organismos, tais como: o coração (K_v1.1, K_v1.2, K_v1.3 a K_v1.8), músculo liso (K_v1.2 e 1.5), cérebro (K_v1.1 a K_v1.4; K_v1.6 e K_v1.8), pulmão (K_v1.3 a K_v1.7), entre outros locais (MOUHAT et al., 2008).

As isoformas K_v1.1 e K_v1.3, constituem os principais alvos de toxinas e estão presentes em pontos relevantes do organismo. As isoformas K_v2.1 e K_v2.2 acarretam a subfamília Shab, também conhecida como K_v2. Elas são encontradas em neurônio, cérebro, coração, rim, pulmão, retina e pâncreas. Apresentam ligantes específicos para toxinas de alguns aracnídeos, como aranhas, mas não interagem com toxinas de escorpiões (MOUHAT et al., 2008).

No cérebro são encontradas isoformas da família (K_v3) ou Shaw, a qual é codificada por quatro genes distintos. Apenas três isoformas representam o K_v4, subfamília Shal, presentes no cérebro, musculatura lisa e coração, as quais são bloqueadas por toxinas de escorpiões e aranhas (MOUHAT et al., 2008). As subfamílias K_v5, K_v6, K_v8 e K_v9 podem desenvolver canais heteromultiméricos com subunidades α da subfamília Kv2. Porém, quando sozinhas, não são capazes de compor canais funcionais para potássio (MOUHAT et al., 2008). Foram descobertas por último as três subfamílias *Eag* (K_v10, K_v11 e K_v12), cujas isoformas foram encontradas no sistema nervoso central. Sabe-se pouco sobre tais isoformas, porém a K_v10.1 ou EAG, tem sido estudada e relacionada com transformações oncogenéticas (MOUHAT et al., 2008).

Muito do conhecimento sobre a estrutura e fisiologia dos canais para potássio foi adquirido e compreendido através da ligação e ação de peptídicos específicos isolados a partir de diferentes peçonhas e venenos (DE LA VEGA; POSSANI, 2004).

A primeira toxina de escorpião que mostrou alterar a permeabilidade de canais para potássio em axônio gigante de lula foi isolada a partir da peçonha do escorpião *Centruroides noxius* (HODGKIN; HUXLEY, 1952). Posteriormente, ocorreu a descoberta da caribdotoxina (MILLER et al., 1985) que intensificou os estudos na área, pois o peptídeo demonstrou ser um excelente modelo de ligante para canais para potássio, propiciando desta

forma avanços nos estudos envolvendo estrutura e função dos canais (DE LA VEGA; POSSANI, 2004).

Visando uma melhor classificação desses novos peptídeos, as toxinas para canais permeáveis aos íons potássio foram agrupadas em 4 famílias α, β, γ, e k-toxina escorpiônicas (DE LA VEGA; POSSANI, 2004).

A maioria das toxinas escorpiônicas que interagem com canais para potássio são peptídeos pequenos, com aproximadamente 30-40 resíduos de aminoácidos estabilizados por três a quatro pontes dissulfeto. Em sua conformação tridimensional observam-se três fitas beta antiparalelas ligadas por pontes dissulfeto a uma região α-helicoidal (COLOGNA et al., 2009).

A menor toxina escorpiônica que interage com canais para íons potássio descrita é a de *Tityus obscurus* (denominação antiga *Tityus cambridgei*), com 23 resíduos de aminoácidos. As toxinas mais longas, com 64 resíduos de aminoácidos cada, são as β-KTX, AaTXKb e BmTXKb2 (DE LA VEGA; POSSANI, 2004). As toxinas de *Tityus serrulatus* que atuam em canais para potássio são Ts6 (α-$KTx_{12.1}$), Ts7 (TsTX-Kα), Ts8 (TsTX-Kβ), Ts9 (Ts Kappa), Ts15 (COLOGNA et al., 2011; MARCUSSI et al., 2011).

Em 1997 foi proposto que as toxinas apresentam um par de aminoácidos-chave na sua estrutura, denominado díade funcional, que desempenha um papel fundamental para a interação das toxinas com canais para potássio descritos na família Shaker. A díade funcional é formada por uma lisina (Lys) e, um resíduo de aminoácido com caracteristícas hidrofóbicas, como leucina (Leu), tirosina (Tyr) ou fenilalanina (Phe), com uma distância de separação de aproximadamente 7 Å (DAUPLAIS et al., 1997).

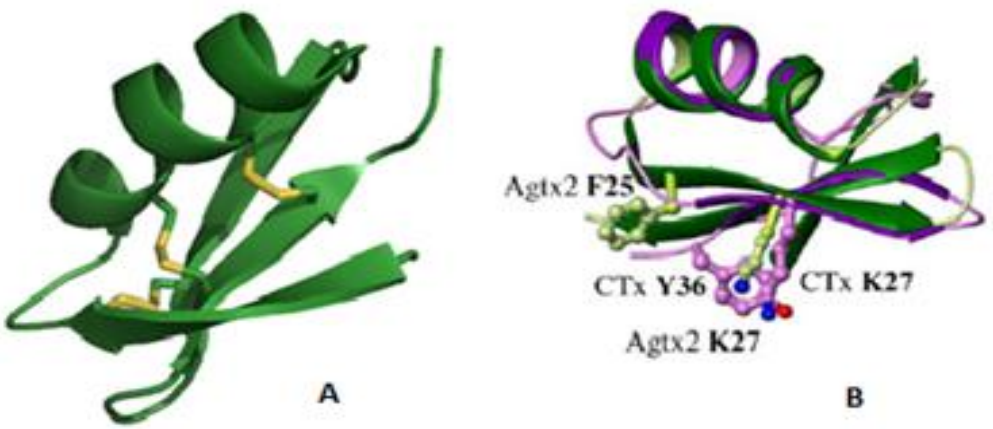

Figura 8- A) Estrutura tridimensional da angiotoxina. B) Sobreposição das estruturas tridimensionais da angiotoxina (verde) e da caribdotoxina (roxa), toxinas isoladas da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Apresentam alta identidade estrutural, com três fitas beta anti-paralelas ligadas a uma região α-helicoidal, típico de toxinas que interagem com canais para potássio. A díade funcional está representada pelo aminoácido K (lisina), e pelo resíduo de característica hidrofóbica tirosina ou fenilalanina (DE LA VEGA; POSSANI, 2004).

As estruturas tridimensionais das toxinas escorpiônicas apresentam o mesmo padrão de enovelamento, porém com diferentes especificidade e seletividade para os diversos subtipos de canais. Isto se deve a substituições de alguns resíduos de aminoácidos e/ou posição distinta na estrutura tridimensional da molécula, não sendo a díade o único fator a determinar o local de ligação da toxina ao alvo (DE LA VEGA; POSSANI, 2004).

Em 2007 eram conhecidos mais de 120 peptídeos que interagiam com canais para potássio, e já havia conhecimento de que os peptídeos presentes na peçonha dos escorpiões possuem capacidade de distinguir entre os diferentes subtipos de canais para potássio (KOMINSKY-ATIAS; SOMECH; ZILBERBERG, 2007).

As peçonhas dos escorpiões, de uma forma geral, são ricas fontes de peptídeos com ação em canais para potássio, sendo desta forma uma ferramenta valiosa para a melhor compreensão da estrutura e do mecanismo de funcionamento do canal, além de apresentar um promissor potencial terapêutico e biotecnológico até mesmo no ramo agrícola. Como exemplo, há o isolamento da toxina BoiTx1 a partir da peçonha do escorpião *Buthus occitanus israelenses*. Este novo membro da família das toxinas α-KTx3 é potente contra insetos e não agressiva para mamíferos, sendo um investimento promissor

para o desenvolvimento de novos inseticidas (KOMINSKY-ATIAS; SOMECH; ZILBERBERG, 2007).

Há poucos estudos sobre toxinas de escorpiões que atuam em canais para cloreto e canais para cálcio. As toxinas que atuam nos canais para cloreto, comumente, tem de 35 e 38 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto. Algumas destas biomoléculas são dotadas de alto potecial terapêutico no combate ao câncer, como a clorotoxina isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus* e a rBmK Cta, uma clorotoxina-símile isolada do escorpião *Buthus matensii Karsch*, como citado anteriormente no item 1.1. (NUNES, 2008).

1.9. Toxinas Escorpiônicas e Modulação da Resposta Imunonológica

Grande parte das toxinas escorpiônicas são polipeptídios que demonstram alta afinidade e especificidade para canais iônicos (POSSANI, et al., 2000).

Os canais iônicos são extremamente importantes para a sobrevivência e ativação de diversos tipos celulares que não estão presentes no sistema nervoso, como células de Leydig (DOEPNER et. al., 2005), linfócitos (ROBERT et al., 2011), macrófagos (SANTONI et al., 2013), células cardíacas, etc.

Na literatura existem vários trabalhos demonstrando alterações imunológicas desencadeadas por toxinas da peçonha do escorpião amarelo *T. serrulatus* (PUCCA, 2012; PESSINI et al., 2003; PETRICEVICH et al., 2007; ZOCCAL *et al.*, 2011).

O estudo de alterações imunológicas induzidas por toxinas escorpiônicas é relevante, pois uma resposta inflamatória sistêmica, como o edema pulmonar, é a principal causa de morte entre as crianças nestes acidentes e está asssociada a ampliação dos níveis de quimiocinas e citocinas (PESSINI et al., 2003).

As citocinas são as grandes responsáveis pela emissão de sinais durante a resposta imunológica. São produzidas por várias células do sistema imune, tanto da imunidade inata como adaptativa. Dentre estas células, se destacam os macrófagos, células essenciais da resposta imune inata, e as células T auxiliares ou T $CD4^+$, as quais, por apresentarem subpopulações, são

capazes de produzir citocinas direcionadas a uma resposta imune específica (contra vírus, bactérias, fungos, etc.) (VIANNA, 2009).

As células T $CD4^+$ estão distribuídas em subpopulações funcionais, destacando-se as células TH1, TH2, TH17 e Treg (reguladoras). As citocinas produzidas por células TH1 são designadas pro-inflamatórias e compreendem as citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF-α. As células TH2 são conhecidas por duas citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 (VIANNA, 2009). Recentemente, foi descoberta em camundongo e humanos a subpopulação TH17, denominada assim por produzir principalmente as citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22. Em ratos, TH17 mostrou estar envolvida no combate de bactérias e fungos e estar relacionada a algumas patologias como a esclerose múltipla, psoríase e outras doenças inflamatórias (KORN et al., 2009). A subpopulação Treg ou células T regulatórias é caracterizada pela expressão de $CD25^+$ e do FOXP3 (fator nuclear). As Tregs são divididas em duas subpopulações, Treg natural, conhecida principalmente pela produção da citocina IL-2 e Treg induzida envolvida na liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF-β (MELO; CARVALHO, 2009).

Os macrófagos são células fagocitárias e constituem o mecanismo de defesa do sistema imune inato, sendo as primeiras células a chegar ao tecido lesado. Eles se originam de monócitos sanguíneos e podem ser encontrados em diferentes tecidos (macrófagos residentes), apresentando diferentes denominações, como osteoclastos (ossos), células de Kuppfer (fígado), macrófagos alveolares (pulmões), etc. (LIMA et al., 2007). Os macrófagos comumente participam do final do processo inflamatório agudo, fagocitando restos celulares, patógenos e contribuindo para a recuperação tecidual através da liberação de citocinas, que induzem o recrutamento de fibroblastos, que ajudam a recuperar o dano tecidual. Os macrófagos também são considerados células apresentadoras de antígenos e ativam a resposta adaptativa (LIMA et al., 2007). Estas células são usualmente ativadas por componentes de vírus, bactérias, fungos, entre outros. Estes componentes ligam-se a receptores nestes macrófagos conhecidos como receptores do tipo *Toll* ou TLRs (do inglês *Toll Like Receptors*), os quais são capazes de induzir a liberação de radicais livres, óxido nítrico e citocinas inflamatórias (LIMA et al., 2007).

Além de microrganismos, outros agentes externos também capazes de ativar o sistema imune são as peçonhas animais. Em especial, a peçonha escorpiônica apresenta neurotoxinas que se ligam aos sítios específicos de canais iônicos presentes na membrana celular de leucócitos (ELGAR et al., 2006). Estas são as principais responsáveis pelo efeito tóxico da peçonha e consequentemente pelas manifestações clínicas (FREIRE-MAIA, 1995).

Alterações imunológicas induzidas pela peçonha do escorpião amarelo *T. serrulatus* foram relatadas por Petricevich e colaboradores em 2007. Os autores observaram *in vitro* a ação da toxina Ts1 de *T. serrulatus* em macrófagos murinos e verificaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas, especialmente TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-1 e IL-10 (PETRICEVICH et al., 2007).

Também já é descrito o aumento do número total de leucócitos circulantes em camundongos expostos a toxina Ts1 (majoritária na peçonha de *Tityus serrulatus*), concomitantemente ao aumento das citocinas inflamatórias IL-6, TNF-α, IL-1α e IL-1β em seres humanos (FUKUHARA *et al.*, 2003; PESSINI et al., 2003). Em estudos recentes, Zoccal e colaboradores (2011; 2012) relataram elevados níveis de IL-6 e TNF-α em culturas de macrófagos peritoneais J774.1 estimuladas com a peçonha bruta de *T. serrulatus* ou por suas toxinas Ts1, Ts2 e Ts6 (ZOCCAL *et al.*, 2012).

Diante disso, estudos sobre os efeitos imunomodulatórios das toxinas escorpiônicas são de suma importância para a compreensão dos mecanismos relacionados à ativação de células do sistema imune, assim como para a descoberta de novos fármacos.

1.10. Toxinas Escorpiônicas e Citotoxicidade

Na cultura Oriental é comum o uso de venenos e peçonhas no tratamento de diversas doenças como o câncer, convulsões e patologias relacionadas com a dor. A peçonha consiste em uma rica mistura de componentes com atividade biológica, é formada por diversas proteínas e peptídeos com as mais distintas funções biológicas, por exemplo: neurotoxinas, peptídeos potenciadores de bradicinina, componentes citotóxicos, etc.

(POSSANI et al., 2010). A denominação citotoxicidade incide na capacidade em ocasionar morte celular ou conter o crescimento celular.

Recentemente, há um grande enfoque nos peptídeos com atividade citotóxica, pois segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) as doenças infecciosas e o câncer estão entre as principais causas de morte humana que acometem a população mundial. Os quimioterápicos encontrados no mercado têm inúmeras desvantagens, visto que grande parte dos seus alvos moleculares se encontra não apenas em células doentes, por apresentarem baixa seletividade. As toxinas de escorpião ligam-se específica e seletivamente a domínios celulares e demonstram serem moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos.

O estudo da peçonha do escorpião cubano *Rhopalurus junceus* é um exemplo da capacidade citotóxica destes componentes e tem despertado grande interesse de estudiosos do mundo todo, devido ao popularmente denominado “óleo de escorpião”, amplamente utilizado pela polulação no tratamento de retenção urinária e câncer (GARCÍA et al., 2010). Em 2010, García e colaboradores realizaram ensaios colorimétricos (MTT) a fim de investigar a capacidade citotóxica da peçonha do escorpião *Rhopalurus junceus* e de suas respectivas frações proteicas em células de linhagem tumorais NCI-H292 (carcinoma de pulmão), Hep-2 (carcinoma de laringe humano), Hela (carcinoma cervical humano) e MRC-5 (linhagem diploide) (fibroblastos de pulmão) (GARCÍA et al., 2010). A peçonha mostrou ser capaz de levar as células tumorais a apoptose, enquanto a fração III inibiu o crescimento tumoral do Hela (carcinoma cervical humano) e a fração IV apresentou atividade citotóxica contra a linhagem celular NCI-H292 (carcinoma de pulmão) (GARCÍA et al., 2010). Diferentes tipos de canais para os íons potássio estão ligados a metástase em humanos, entre eles os $K_V11.1$ e $K_{ir}4.2$.

As toxinas encontradas na peçonha dos escorpiões *Mesobuthus eupeus* (Bekm-1) e *Androctonus mauretanicus* (AmmTx3) demonstraram bloquear canais para os íons potássio e reduzir a evolução dos casos de metástases.

De acordo com os fatos abordados e com o desejo de contribuir para o desenvolvimento da ciência, o presente trabalho visa o isolamento, a caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina presente nas frações VII e VIII da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

Isolar componentes presentes nas frações VII e VIII da peçonha de *Tityus serrulatus* e avaliar atividades tóxicas destes componentes.

2.2. Objetivos específicos:

I. Purificar a toxina utilizando cromatografia de troca catiônica, seguida de cromatografia líquida rápida de proteínas em fase reversa (RP-FPLC) com coluna C-18.

II. Caracterizar a toxina purificada através da determinação da massa molecular e sequenciamento de aminoácidos.

III. Caracterizar funcionalmente as toxinas isoladas utilizando ensaios de liberação de citocinas, citotoxicidade e atividade hemolítica.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e Reagentes

- Balança Analítica Digital – *Ohaus*
- Balança Eletrônica Digital *BG-400 – Gehaka*
- Centrífuga Eppendorf *5415R*
- Centrífuga *Sorvall Biofuge Primo R*
- Espectrofotômetro *U-2001 – Hitachi*
- Freezer -70ºC – *Forma Scientific*
- Liofilizador *Flex-Dry™ MP – FTS Systems*
- pHmetro – modelo 8010 – *QUAL**X**TRON*
- Sequenciador automatizado *Shimadzu PPSQ-33*
- Sistema de Ultrapurificação de Água *Milli-Q® – Millipore Corporation*, USA
- Sistema de Cromatografia Líquida *ÄktaBasic UPC* equipado com duas bombas, detector ultravioleta (UV), detector de condutividade, coletor de frações, acoplado a um microcomputador – *GE*
- Sistema Eletroforético – *Pharmacia Biotech*
- Acrilamida – *Sigma Chem. Co.*
- Bis-acrilamida – *Sigma Chem. Co.*
- Resina de troca iônica *CM-Celulose-52- Whatman®*

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. O Anexo B apresenta o Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus de Ribeirão Peto (Protocolo n°11.1.1432.53.5).

3.3. Peçonha de *Tityus serrulatus*

A extração da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* foi realizada por meio da estimulação elétrica do telson do animal. Após a extração, a peçonha foi dessecada e armazenada a -20°C. Foram utilizados vários escorpiões provenientes do Serpentário do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sendo os animais utilizados nesse processo oriundos de diferentes regiões do estado de São Paulo. O Anexo A apresenta o Certificado de Regularidade do Biotério Central emitido pelo IBAMA.

3.4. Preparo da amostra

A peçonha de *Tityus serrulatus* foi dessecada em dessecador a vácuo durante 6 horas. Cerca de 50 mg da peçonha foram dispersos em 0,5 mL de bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, e centrifugados a 15.700 *x g* a 4 °C, por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso outras três vezes, resultando em cerca de 2 mL de peçonha solúvel, os quais foram armazenados durante 12 horas a 4 °C e, posteriormente, centrifugados. O sobrenadante foi utilizado para o fracionamento em coluna de CM-Celulose-52.

3.5. Cromatografia da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-celulose-52

A cromatografia da peçonha solúvel de *Tityus serrulatus* foi realizada segundo o descrito por Arantes et al.(1989) e modificado por Cerni (2012). Foi utilizada uma coluna de 1,6 x 100 cm empacotada com resina CM-celulose-52 microgranular (Whatman). Após o empacotamento, a coluna foi conectada ao sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) *Äkta UPC 900* (GE Healthcare) e equilibrada com uma solução de bicarbonato de amônio 0,05 M durante 10 horas, sob vazão de 0,5 mL/min.

A amostra foi aplicada à coluna com o uso de uma pipeta e o sistema gerou resultados expressos no cromatograma, em 280 nm. A coluna foi inicialmente eluída com uma solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8 (100% de Tampão A) e foi iniciado então um gradiente linear de

concentração de bicarbonato de amônio 0,6 M (Tampão B) até atingir 100% de Tampão B após 440 mL de eluição. A concentração (100% de B) foi mantida por mais 140 mL, decaindo (0 mL) para 0% de Tampão B. Em seguida à cromatografia, foi realizada eletroforese utilizando gel de poliacrilamida 10% para proteínas básicas com as frações obtidas.

3.6. Eletroforese para proteínas básicas (PAGE)

A eletroforese em gel (8 cm x 7 cm x 0,75 mm) de poliacrilamida (10%) para proteínas básicas foi efetuada com as frações obtidas da cromatografia. Após a cromatografia em CM Celulose-52, o gel foi corado com solução corante (*Coomassie Brilliant Blue*) e descorado com acido acético 10% (V/V). As amostras aplicadas no gel foram preparadas em solução de sacarose a 20% (m/V) e a fucsina básica foi aplicada no centro da placa como indicador.

3.7. Cromatografia de fase reversa das frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB

As frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB (4 mg), obtidas da cromatografia em CM-celulose-52, foram dispersas em 1000 µL de solução contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (V/V) e centrifugadas a 15.700 *x g*, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido a cromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, Shimadzu, com partículas de 5 µm) acoplada a sistema *FPLC Äkta UPC 900* e eluída com uma solução de TFA 0,1% (Solução A), sob vazão de 0,7 mL/min. Após a eluição de aproximadamente 4 mL, iniciou-se um gradiente linear de concentração de solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%) até atingir 100%. As frações obtidas foram congeladas a -80°C e, posteriormente, liofilizadas.

3.8. Recromatografia de fase reversa das subfrações 19, 22 e 23

As subfrações 19, 22 e 23 foram dispersas em 1000 µL de solução contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (V/V) e centrifugada a 15.700 *x g*, a 4°C, por 10 minutos. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta*

Purifier UPC-10 com coluna C18 (2,1 x 250 mm, com partículas de 3,6 µm, Phenomenex), equilibrada com a Solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 0,4 mL/min e temperatura de 25°C. As amostras foram inicialmente eluídas com Solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila Solução B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1% (V/V).

3.9. Sequenciamento amino-terminal das toxinas

A análise da sequência N-terminal das toxinas isoladas das frações VII e VIII foi realizada em sequenciador automático de proteínas PPSQ-33A (Shimadzu). A sequência foi obtida pelo método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), o qual é composto por três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. O aminoácido derivado da reação com o fenilisotiocianato (PITC) é convertido a PTH-aminoácido, um derivado de feniltioidantoína, que por sua vez é cromatograficamente separado em coluna de fase reversa em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A quantificação e identificação das amostras foram realizadas por comparação com padrão de 25 pmol de cada aminoácido, analisado no início de cada sequenciamento.

3.10. Determinação da massa molecular por espectrometria de massas

As toxinas presentes nas frações VII-VIII foram analisadas no laboratório de Produtos Naturais Bioativos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. As análises foram realizadas por MALDI-TOF/TOF (Ultraflextrem, Bruker), ou seja, no espectrômetro de ionização e dessorção laser assistida por matriz acoplada a um analisador por tempo de voo (Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry).

Os espectros de massas foram contraídos no modo linear após a calibragem do equipamento com um padrão utilizado para proteínas (Bruker peptide calibration standard II). As amostras foram ressuspendidas em uma solução 80% (V/V) de acetonitrila (ACN) e 0,2% (V/V) de acido trifluoroacético

(TFA) e combinadas na proporção 1:1 com a matriz DHB (ácido 2,5-dihidróxido benzóico) 5mg/mL.

3.11. Cultura de linhagem celular

A linhagem celular de macrófagos de camundongos BALB/c (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK) J774.1 foi cultivada em meio RPMI-1640 (ATCC, Rockville, MD, EUA) adicionado de 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab®) e de sulfato de gentamicina 1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente ocorreu a formação das monocamadas de células (80% de confluência), as células foram extraídas por meio de raspagem com suportes plásticos apropriados (rodos) e centrifugadas a 2000xg, a 10°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 10 mL de meio completo RPMI 1640 para avaliação da viabilidade celular, realizada em microscópio óptico. A contagem de células foi realizada através da câmara de Newbauer (BOECO®, Hamburg, Alemanha) com o corante Azul de Tripan (Gibco®, Grand Island, NY, EUA). Foram plaqueadas $2{,}5 \times 10^4$ células por poço em microplacas de 96 poços e posteriormente incubadas a 37°C, CO_2 5% por 18 horas para a adesão das mesmas.

3.12. Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular na presença de toxina foi realizada pela técnica colorimétrica que utiliza o brometo de tiazolil (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio - MTT). Após o cultivo da linhagem celular (item 3.11.), as placas contendo as células J774.1 previamente estimuladas foram preenchidas com RPMI (200 µL/poço) sem soro e sem vermelho de fenol, mas contendo o corante MTT 0,5 mg/mL (M-5655, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), previamente filtrado em membrana de 0,22 µm. Posteriormente, as células foram incubadas por 3 horas, tempo necessário para ocorrer a redução do sal de tetrazólio a formazan. A seguir, 50 µL de SDS 20% diluído em HCl 0,01M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foram acrescentados em cada poço. As placas ficaram em temperatura ambiente até

completa solubilização do sal. A absorbância foi medida em 550 nm em leitor de microplacas (mod. 960, Metertech Inc.®, Taiwan). A citotoxicidade das toxinas foi expressa em porcentagem relativa à citotoxicidade observada nas células não estimuladas.

3.13. Avaliação da liberação de óxido nítrico

A quantidade de nitrito presente nos sobrenadantes foi avaliada por intermédio de um indicador da produção de óxido nítrico segundo o método de Griess (Green et al., 1981). A quantidade de nitrito (NO_2) presente nas amostras foi obtida através de uma curva de calibração usando uma diluição seriada de $NaNO_2$. O ensaio foi realizado em quadruplicata, e a absorbância foi medida em 540 nm 10 minutos após a adição de $NaNO_2$.

3.14. Avaliação da liberação de citocinas

A produção de citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10, produzidas por células J774.1, foi medida através do ensaio imunoenzimático de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). A quantificação das citocinas foi definida utilizando anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e padrões de citocinas, segundo instruções do fabricante (R & D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). A absorbância das reações foi medida por leitor de microplacas com filtro de 405 nm (µQuant, Bio-Tec, São Paulo, SP) e a concentração de citocinas foi calculada através de uma curva de calibração da citocina recombinante. A sensibilidade do teste foi <10 pg/mL; os limites de detecção dos *kits* das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 foram 2000, 1000 e 2000 pg/mL, respectivamente.

3.15. Avaliação da atividade Hemolítica

O ensaio para verificar a atividade hemolítica utilizou glóbulos vermelhos de rato wistar. A coleta de sangue foi realizada em tubos heparinizados submetidos a centrifugação para separar o plasma, o qual foi descartado. Posteriormente, os eritrócitos foram lavados por três vezes com uma solução

de PBS e centrifugados a 1000 *xg*, durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o volume dos eritrócitos foi medido.

Em seguida, a agarose foi dissolvida em PBS e aquecida em micro-ondas até obter uma suspensão transparente e fluida. A suspensão esfriou até uma temperatura entre 70-75 °C e foi adicionado o cloreto de cálcio sob agitação com um bastão de vidro. Quando a temperatura da suspensão atingiu 60°C foram acrescentadas a azida de sódio e a gema de ovo. A suspensão esfriou até 45°C, e os eritrócitos foram adicionados com agitação suave. Em uma placa de petri nivelada foram adicionados 25 mL de meio e as bolhas formadas foram removidas antes de ocorrer a polimerização.

Após a polimerização, foram feitos poços no gel com a ajuda de uma ponteira (3-4mm de diâmetro), onde as amostras foram aplicadas. A placa foi deixada na estufa a uma temperatura de 37° C por 18 horas. A avaliação da atividade hemolítica foi baseada pela medição do halo esbranquiçado que se formou no controle positivo (melitina).

4. Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de *Tityus serrulatus*

Após a coleta da peçonha por eletrochoque equivalente a 12V na membrana dos últimos segmentos do telson do escorpião, a mesma foi dessecada à vácuo (MARCUSSI et al., 2011). Como a peçonha contém muco, várias proteínas e íons, é indispensável a centrifugação para separar o muco da solução proteica (MARCUSSI et al., 2011).

Posteriormente, a peçonha solúvel do escorpião *Tityus serrulatus* foi fracionada como descrito no item 3.5. Para o fracionamento da peçonha bruta foi empregado o método inicialmente descrito por Arantes et al. (1989) e modificado por Cerni et al. (2012). Em 1989, Arantes e colaboradores desenvolveram um processo simplificado para a cromatografia da peçonha de *Tityus serrulatus* utilizando coluna de troca catiônica CMC-52 e gradiente convexo de concentração do tampão bicarbonato de amônio. Foram obtidas treze frações proteicas. Nesta cromatografia a fração XIII, identificada como Ts1 ou TsTX-I, a primeira toxina quimicamente caracterizada e mais abundante da peçonha de *Tityus serrulatus*, foi considerada homogênea .

A cromatografia realizada utilizando o método otimizado por Cerni et al. (2012) apresentou perfil semelhante ao descrito por Arantes et al. (1989), mas com melhor resolução dos componentes da peçonha. As frações VI, VIII, IX, XI e XII foram subdivididas em duas cada (VIA-VIB, VIIIA-VIIIB, IXA-IXB, XIA-XIB e XIIA-XIIB) (Fig. 9). Todas as frações obtidas foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C. As frações VII e VIIIA e VIIIB foram as utilizadas no presente estudo.

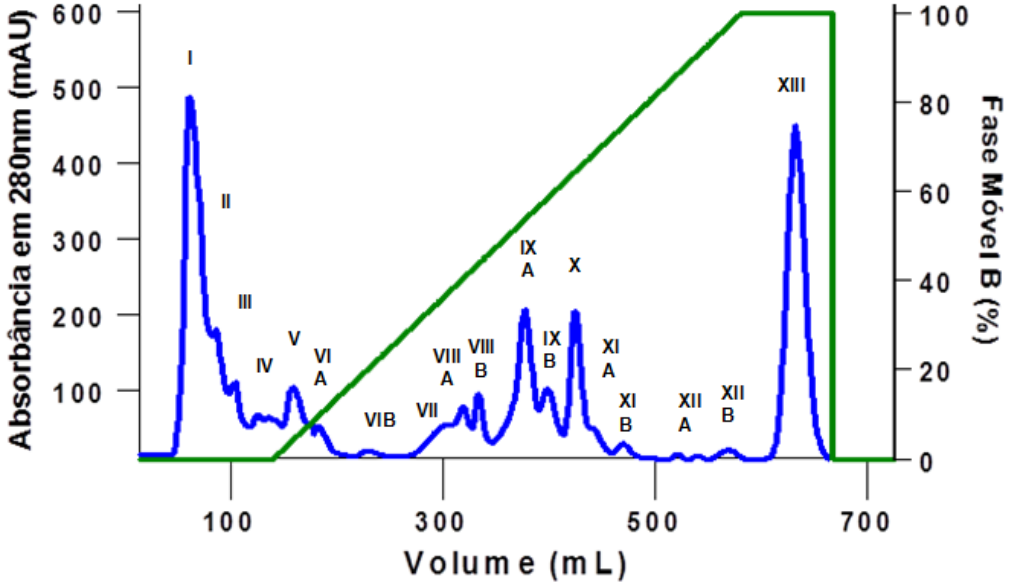

Figura 9- Perfil cromatográfico da peçonha solúvel de *Tityus serrulatus* em CM-celulose-52. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna de (1,6 x 100,0) cm empacotada com resina carboximetilcelulose-52, equilibrada com tampão A (bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8), sob vazão de 0,5 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra foi eluída com gradiente linear de concentração (0 a 100%) de tampão B (bicarbonato de amônio 0,6 mol/L, pH 7,8), representado pela linha verde. Volume coletado por tubo: 4,0 mL.

A porcentagem de recuperação das frações obtidas na cromatografia da peçonha bruta de *Ts em* sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna de (1,6 x 100,0) cm empacotada com resina carboximetilcelulose-52 é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Recuperação das frações obtidas na cromatografia da peçonha de *Tityus serrulatus*. Calculada pelo software Unicorn do sistema FPLC Äkta UPC 900.

Fração	Eluído (%)
I	23,66%
II	4,91%
III	3,34%
IV	3,69%
V	4,26%
VIA	1,70%
VIB	0,47%
VII	3,08%
VIIIA	2,75%
VIIIB	2,46%
IXA	10,25%
IXB	4,15%
X	6,58%
XIA	1,70%
XIB	1,09%
XIIA	0,86%
XIIB	1,1%
XIII	24,52%

A primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de troca catiônica fraca, em resina de CM-celulose-52 que consiste em um polímero contendo grupos aniônicos, em que o fracionamento é consequência da diferença na carga das proteínas (LEHNINGER, 2010). O uso do gradiente linear de concentração possibilitou a otimização do fracionamento dos componentes da peçonha. Proteínas com a mesma carga da resina eluíram primeiro, seguidas das proteínas de carga diferente à carga apresentada pela resina, eluindo de acordo com a ordem da densidade da carga de proteína (DEVLIN, 1998). O procedimento de purificação mostrou-se adequado, apresentando uma boa resolução (Fig. 9) dos componentes da peçonha de *Tityus serrulatus*, como mostrado no gel da Figura 10.

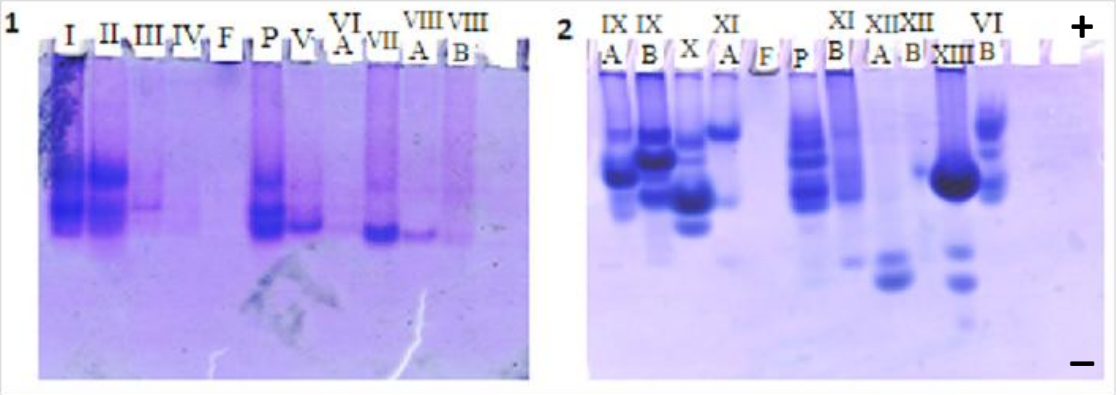

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) para proteínas básicas. Condições para pré-corrida e corrida: 100 V, 40 mA, 15 W, por 50 minutos. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-350* (0,2% em água: metanol, 1:1, v/v), e descorado com ácido acético 7% (v/v). **Gel 1**. Poço 1: Fração I; Poço 2: Fração II; Poço 3: Fração III; Poço 4: Fração IV; Poço 5: Fucsina, Poço 6: Peçonha; Poço 7: Fração V; Poço 8: Fração VIA; Poço 9: Fração VII; Poço 10: Fração VIIIA; Poço 11: Fração VIIIB. **Gel 2.** Poço 1: IXA; Poço 2: Fração IXB; Poço 3: Fração X; Poço 4: Fração XIA; Poço 5: Fucsina; Poço 6:Peçonha; Poço 7: Fração XIB; Poço 8: Fração XIIA; Poço 9: Fração XIIB; Poço 10: XIII; Poço 11: Fração VIB.

A eletroforese em gel é uma técnica para a separação de moléculas, que se baseia na migração de partículas pelo gel por meio da aplicação de uma diferença de potencial. No gel para proteínas básicas (Fig. 10), as proteínas são separadas por cargas e migram através do gel até o eletrodo negativo. Em pH 4,5 (ácido), os aminoácidos da cadeia lateral ficam carregados positivamente e as proteínas mais básicas, ou seja, com mais cargas positivas migram com maior facilidade pelo gel. As frações XIIA e XIII apresentam as proteínas mais básicas presentes na peçonha de *Tityus serrulatus*, pois se observam bandas proteicas que migraram mais do que nas demais frações.

Apesar de a primeira etapa cromatográfica conseguir um bom fracionamento da peçonha, observa-se, pela eletroforese, que todas as frações são compostas por mais de um componente, indicando a necessidade de passos cromatográficos adicionais para o isolamento das toxinas presentes em cada fração.

4.2. Cromatografia de fase reversa das Frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB.

Após a cromatografia em CM-celulose-52, foi realizada uma segunda etapa de purificação das frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB. A técnica de separação adotada foi cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*) em coluna de fase reversa (Fig. 11). Esta técnica de fracionamento surgiu em 1982 e foi inicialmente denominada cromatografia líquida de desempenho rápido para distinguir-ser da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE). A FPLC foi aplicada inicialmente apenas às proteínas e peptídeos; porém, a ampla versatilidade de resinas e de tampões propiciou sua utilização em outras separações. Uma das principais diferenças entre as técnicas HPLC e FPLC é a capacidade de suportar pressões, sendo que a técnica de HPLC suporta pressões mais elevadas (WIKIPEDIA, 2013).

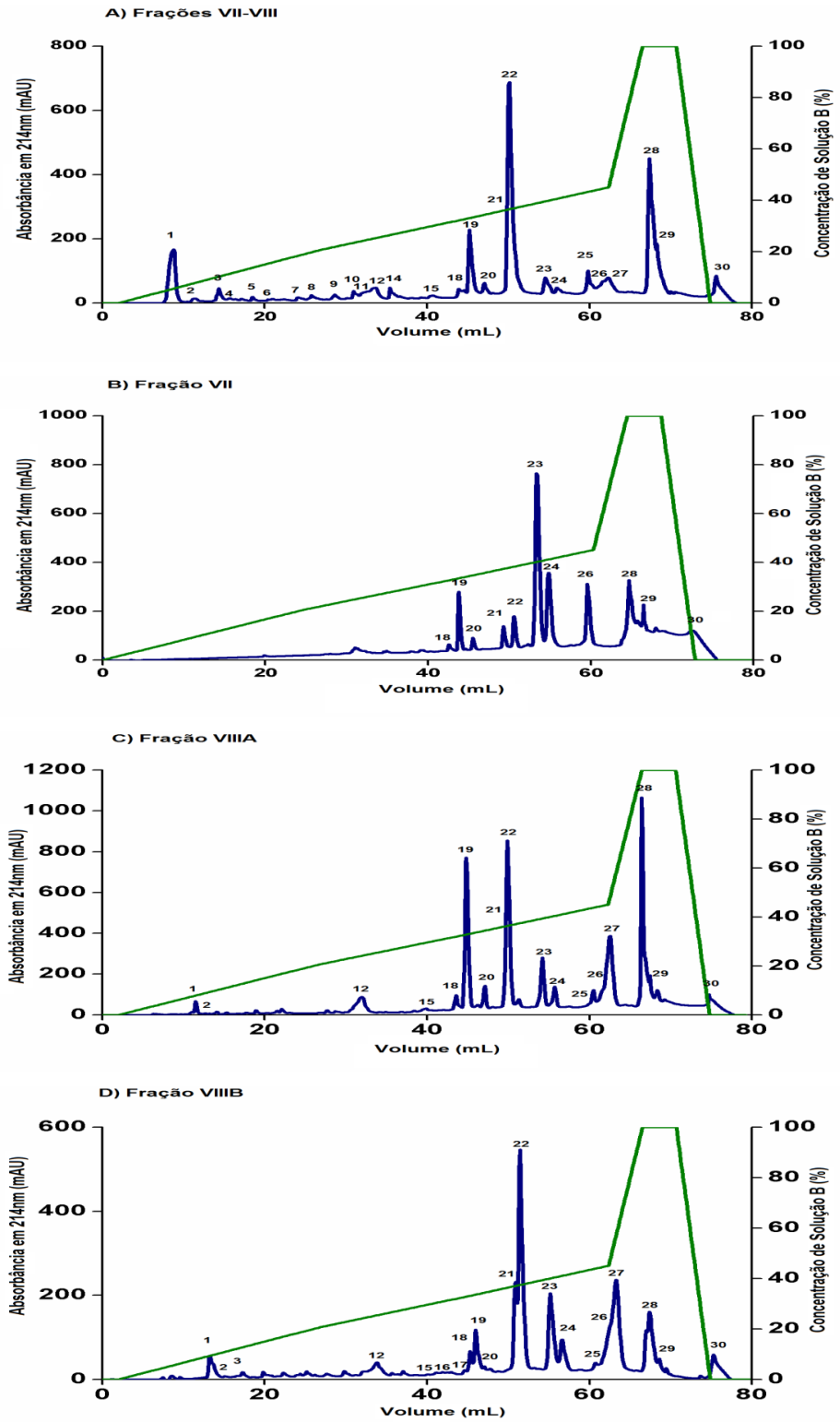

Figura 11. Perfil cromatográfico das frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB (4 mg) de *Tityus serrulatus* em coluna de fase reversa C18. A) Fração VII-VIII. B) Fração VII. C) Fração VIIIA. D) Fração VIIIB. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 (0,46 mm x 25 cm, com partículas de 5 µm, Shimadzu), equilibrada com a Solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 0,7 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (1 mL) foi inicialmente eluída com Solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (Solução B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha verde. Volume por tubo: 0,3 mL.

Tabela 3 – Recuperação das subfrações obtidas da cromatografia da fração VII-VIII. Calculada pelo software Unicorn do sistema FPLC Äkta UPC 900.

Fração VII-VIII	Eluído (%)
1	6,36%
2	0,67%
3	1,30%
4	0,83%
5	0,48%
6	1,44%
7	0,92%
8	1,12%
9	1,43%
10	1,24%
11	1,45%
12	2,24%
14	1,98%
15	2,16%
18	2,05%
19	5,72%
20	2,08%
21	9,91%
22	13,84%
23	3,16%
24	3,58%
25	3,66%
26	2,11%
27	4,49%
28	13,48%
29	8,16%
30	4,14%

Tabela 4 – Recuperação das subfrações obtidas da cromatografia da fração VII. Calculada pelo software Unicorn do sistema FPLC Äkta UPC 900.

Fração VII	Eluído (%)
18	0,70%
19	5,71%
20	1,16%
21	2,35%
22	3,81%
23	29,13%
24	12,85%
26	9,04%
28	12,26%
29	13,10%
30	9,90%

Tabela 5 – Recuperação das subfrações obtidas da cromatografia da fração VIIIA. Calculada pelo software Unicorn do sistema FPLC Äkta UPC 900.

Fração VIIIA	Eluído (%)
1	0,94%
2	0,36%
12	4,14%
15	2,21%
18	2,35%
19	11,34%
20	4,47%
21	3,34%
22	13,11%
23	5,39%
24	5,12%
25	3,38%
26	3,43%
27	12,78%
28	13,61%
29	9,59%
30	4,45%

Tabela 6 – Recuperação das subfrações obtidas da cromatografia da fração VIIIB. Calculada pelo software Unicorn do sistema FPLC Äkta UPC 900.

Fração VIIIB	Eluído (%)
1	2,47%
2	0,55%
3	0,85%
12	5,16%
15	0,64%
16	3,00%
17	0,72%
18	1,84%
19	3,85%
20	2,95%
21	6,05%
22	18,31%
23	9,19%
24	5,36%
25	2,08%
26	20,44%
27	2,57%
28	6,85%
29	3,13%
30	3,98%

Após a cromatografia da fração VII-VIII foram obtidas mais de 20 subfrações (Fig. 11A). No cromatograma referente à fração VII (Fig. 11B) foram obtidas as subfrações 18-24, 26, 28-30, na fração VIIIA as subfrações 1, 2, 12, 15, 18-30 e na VIIIB as subfrações 1, 2, 3, 12, 15-30. Os picos preponderantes nas frações VII-VIII são 19, 21-22, 28; na VII, 23, 24, 26 e 28, na fração VIIIA por sua vez são os picos 19, 22, 27, 28 e na VIIIB os picos 21, 22, 23 e 27.

A denominação das frações foi feita com base na cromatografia das frações VII-VIII, para que os componentes idênticos pudessem ser reunidos, aumentando assim a recuperação de cada toxina. Isso se fez necessário

porque a resolução dos picos VII-VIII no primeiro processo cromatográfico não foi muito efetivo na separação das toxinas, causando a eluição de um mesmo componente em mais de uma fração.

Em cromatografia de fase reversa a fase estacionária é formada normalmente por resina dotada de grupamentos com características apolares, octanoil (C-8), octadecil (C18), entre outros (SILVA, 2004). Os peptídeos e proteínas são dessorvidos, de maneira seletiva, da coluna C18 com um gradiente crescente de concentração de acetonitrila. Estes são eluídos segundo sua hidrofobicidade, sendo os mais hidrofóbicos eluídos no final do processo (SILVA, 2004).

A mudança no fracionamento por CM-celulose-52 dos picos VII-VIII em VII, VIIIA e VIIIB levou a uma melhor resolução e separação dos componentes presentes nestas frações. Contribuiu significativamente para a presente pesquisa, pois demonstra de forma clara que a subfração de interesse 22 é mais abundante na fração VIIIB, como podemos observar na tabela 6.

As subfrações por sua vez foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C. As subfrações 22 e 23 foram submetidas ao sequenciamento N-terminal. As frações VII e VIII foram escolhidas por serem as frações menos estudadas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus.* Nestas frações apenas a Ts4 e a Ts8 são conhecidas e ainda existem muitos outros picos que são eluídos e que podem ser possíveis novas neurotoxinas.

4.3. Sequenciamento amino-terminal

As subfrações 22 e 23 das frações VII-VIII foram sequenciadas através do método de degradação de Edman, como descrito no item 3.9. O pico 22 denominado Ts19 frag I, apresentou uma sequência inédita (Fig. 12) quando comparada com sequências depositadas nos principais bancos de dados utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Posteriormente, esta sequência foi encontrada no transcriptoma.da glândula de *T. serrulatus* (ALVARENGA et al., 2012). Foram determinados 57 resíduos de aminoácidos da nova toxina (Tabela 7), a qual apresenta 6 resíduos de cisteína e sua região N-terminal é formada por KIK.

Tabela 7. Sequência em aminoácidos dos componentes das subfrações 22 e 23 obtidas das frações VII-VIII, VII, VIIIA e VIIIB da peçonha de *Tityus serrulatus*.

Subfração	Sequência*	Identidade (Blast)
22.5	KIKEKIIEAK DKMKAGWERL TSQSEYACPA IDKFCEDHCA AKKAVGKCDD FKCNCIK	Ts19 frag I (Nova toxina)
23.7	KKDGYPV EYDNCAYICW NYDNAYCDKL CKDKKADSGY CYWVHILCYC YGLPDSEPTK TNGKCKS	Ts3-KS (Precursor)
23.4	GREGYPADSK GCKITCFLTA AGYCNTECTL KKGSSGYCAW PACYCYGLPE SVKIWTSETN KC	Ts4

* Os resíduos de cisteína foram destacados em amarelo.

* Os resíduos com características básicas foram destacados em rosa (lisina K, arginina R, histidina H).

O *ProtParam tool* foi usado para predizer os parâmetros físicos e químicos da toxina: a Ts19 frag I encontrada na subfração 22 apresenta pI teórico de 8,57 para os 57 resíduos de aminoácidos sequenciados. Esse pI ainda não foi confirmado experimentalmente, mas a maioria das toxinas de *Tityus serrulatus* apresentam pI maior que 7 devido à grande frequência de resíduos de aminoácidos básicos, como lisinas, argininas e a histidina. A Ts19 frag I apresenta doze lisinas (21,1% do total dos resíduos de aminoácidos), uma arginina e uma histidina.

Esta toxina foi denominada **Ts19 frag I** por ser a **19°** toxina identificada na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (**Ts**), **frag I** por esta toxina ser um **fragmento da Ts19** encontrada no transcriptoma, ou seja, não possui o peptídeo sinal nem os primeiros 8 resíduos subsequentes ao peptídeo sinal.

Em 2012, Alvarenga e colaboradores realizaram o transcriptoma da glândula de *T. serrulatus* e foram obtidas três sequências completas de toxinas denominadas Ts17, Ts18 e Ts19. A Ts19 encontrada através do transcriptoma apresenta identidade com a Ts19 frag I, o que é possível verificar no alinhamento das sequências (Figura 12).

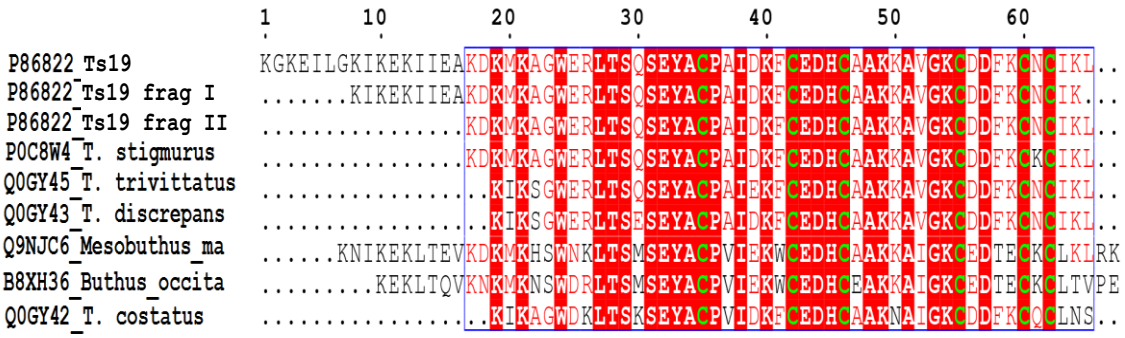

Figura 12. Alinhamento múltiplo entre toxinas que atuam em canais para os íons potássio e a toxina Ts19 frag I de *Tityus serrulatus*. Os aminoácidos em branco e vermelho delimitam as regiões conservadas (alto consenso) e os aminoácidos em preto indicam os resíduos de baixo consenso. Os resíduos de cisteína estão destacados em verde. O alinhamento foi realizado no programa MultAlin (CORPET, 1988) e a figura criada no programa ESPript (GOUET et al., 1999).

Na análise do alinhamento, a toxina Ts19 frag I (P86822) apresentou identidade com as sequências previamente depositadas de toxinas que atuam em canais para potássio de outras espécies de escorpiões: Ts19 (P86822), Ts19 frag II (P86822), *Tityus stigmurus* (P0C8W4), *Tityus trivittatus* (Q0GY45), *Tityus discrepans* (Q0GY43), *Mesobuthus martensii* (Q9NJC6), *Buthus occitanus israelis* (B8XH36), *Tityus costatus* (Q0GY42), (Fig. 12).

Dentre as espécies de *Tityus*, essa toxina apresentou identidade de 93% com a de *Tityus costatus*, 75% com *Tityus discrepans*, 91% com *Tityus trivittatu*s. A identidade com a espécie *Mesobuthus martensii* foi de 69%.

A sequencia da Ts19 foi obtida por meio do transcriptoma da glândula produtora de peçonha de *Tityus serrulatus* (Alvarenga et al., 2012). As sequencias da Ts19 frag I e Ts19 frag II foram obtidas por sequenciamento amino-terminal das toxinas isoladas da peçonha. A Ts19 frag I é precursora da Ts19 frag II, a primeira tem 9 aminoácidos distintos em sua porção N-terminal.

Algumas toxinas com N-terminal KIK, como a Ts19 frag I, são capazes de bloquear canais para potássio (LEGROS et al., 1998), podem ter ação citolítica, antimicrobiana e hemolítica (ZHU; TYTGAT, 2004). Atribui-se ao domínio N-terminal destes peptídeos a ação citolítica e antimicrobiana e à região C-terminal o bloqueio de canais iônicos. Este peptídeo parece pertencer às β-KTX-símiles (RATES et al., 2008). As β-KTxs são polipeptídeos que contêm 45 a 68 resíduos de aminoácidos, incluindo 6 cisteínas e os dois

domínios estruturais. No domínio N-terminal há uma α-hélice e o C-terminal é rico em cisteína (DIEGO-GARCIA et al., 2008).

Peptídeos como a Ts19 frag I estão amplamente distribuídos na peçonha dos escorpiões da família Buthidae, Caraboctonidae e Scorpionide. Estes foram inicialmente denominados peptídeos órfãos, devido a suas ações biológicas e farmacológicas pouco elucidadas (DIEGO-GARCIA et al., 2008).

De acordo com a similaridade de sequências, as toxinas pertencentes às β-KTX foram decompostas em três classes: **(1)** Pertencem a **classe 1** a TsTXKβ (TstβKTx), AaTXKβ, BmTXKβ2, TdiβKTx, e TcoβKTx, sendo que a TstβKTx demonstrou ser um bloqueador de canal Kv. **(2)** Na **classe 2** são incluídas a BmTXKβ, HgeβKTx, TcoKIK, TdiKIK e TtrKIK. Nesta classe destaca-se a BmTXKβ, que é bloqueador de canais para K^+ em miócitos atriais de coelhos, promovendo a inativação rápida das subunidades dos canais heteromultiméricos Kv4.2 e Kv4.3. Apesar do escorpião *Hadrurus gertschi* ou escorpião mexicano como é popularmente conhecido não apresentar importancia médica, um peptídeo interessante denominado HgeβKTX foi encontrado em sua peçonha. Segundo Diego-García e colaboradores (2008), este peptídeo mostrou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento das bactérias gram positivas *Staphilococcus aureus* e *Bacilus subtilis* em concentrações muito baixas. **(3)** Os membros da **classe 3** são as defensinas antimicrobianas scorpine, opiscorpine1-4, HgeScplp1, HgeScplp2, scorpine-símile cujas sequências apresentam similaridade com as sequências relatadas na classe 1 (ZHU *et al.*, 2010). Além disso, a scorpine é um agente anti-malaria (DIEGO-GARCIA et al., 2008).

O trabalho pioneiro a relatar um peptídeo β-KTX oriundo de *Tityus serrulatus* foi realizado por Rogoski e colaboradores em 1994, em que foi observado o bloqueio seletivo de canais para potássio dependentes de voltagem não-inativantes induzido pela TsTX-Kβ em sinaptossomas.

Posteriormente, Legros e colaboradores (1998) descobriram através da biblioteca de cDNA a sequência de nucleotídeos da toxina TsTX-Kβ e identificaram novas toxinas, AaTXKβ, BmTXKβ e BmTXKβ2, pertencentes às β-KTX oriundas das peçonhas do escorpião *Mesobuthus martensii,* comum na Ásia, e *Androctonus australis,* encontrado no norte da África.

Em peçonhas de escorpiões encontrados na América do Sul também foram descobertas toxinas pertencentes às β-KTX. Segundo estudos realizados por Diego-García et al. (2007) e Batista et al. (2007), um peptídeo isolado e caracterizado obtido da peçonha do escorpião *Tityus stgmurrus* mostrou ser idêntico a TsTX-Kβ. Toxinas como esta foram encontradas em outros escorpiões do gênero *Tityus*, entre eles *T. discrepans, T. costatus e T. Trivitattus* (DIEGO-GARCIA et al., 2008) *.*

Segundo Diego-Garcia et al*.* (2008) e Rates et al. (2008), muitos contrastes e suposições envolvem a função dos peptídeos pertencentes às β-KTX, uma vez que há poucos estudos concretos sobre estes peptídeos. Através do sequenciamento da Ts19 frag I também foi possível observar que a toxina não estava totalmente pura, tendo sido necessário realizar mais uma etapa cromatográfica, como descrito no item 3.8.

A subfração 23 apresentou a mesma sequência da Ts3 e, segundo o sequenciamento amino-terminal, estava contaminada com Ts4. A Ts4 foi purificada e sequenciada por Marangoni e colaboradores em (1990), tem 62 resíduos de aminoácidos e é considerada não tóxica para camundongos, pois quando injetada nestes animais (15 mg/Kg), não levou ao quadro clássico de toxicidade (MARCUSSI et al., 2011). Contudo, a Ts4 pode induzir reação alérgica (COLOGNA et al., 2010).

Chavez-Orlotegui et al. (2002) relatam que a Ts4 é capaz de induzir a produção de anticorpos policlonais que possivelmente têm a capacidade de neutralizar os efeitos da peçonha e desencadear o mecanismo de reação cruzada com outras toxinas da peçonha de escorpião.

4.4. Recromatografia de fase reversa das Subfrações 19, 22 e 23

Diversas subfrações, entre estas a 19, 22 e a 23 quando recromatografadas em coluna C18 (2,1 x 250 mm, com partículas de 3,6 µm, Phenomenex) demonstraram ter diversos contaminantes (Figura 13). O sequenciamento dos picos 19.1 e 19.2 comprovaram que estes picos correspondiam respectivamente às toxinas Ts19 frag I e Ts19 frag II. As toxinas Ts19 frag I e Ts19 frag II possivelmente são toxinas que atuam em canais para os íons potássio. As análises das sequências do N-terminal dos picos 22.4 e 22.5 demonstraram identidade dos mesmos com a Ts19 frag I; porém, ainda estavam contaminados. No pico 22.4 foi possível observar que a Ts19 frag I e o contaminante estavam presentes na mesma proporção. No pico 22.5, o contaminante estava presente em uma proporção menor, sendo desta forma a Ts19 frag I o componente mais abundante deste pico.

A análise das sequências do N-terminal permitiu identificar que o contaminante dos picos F22.4 e F22.5 apresentavam a sequência KKDGYPVEYDNCAVICWNYDNAYC que corresponde à Ts2 quando analisado no Blast. Na eletroforese em gel de poliacrilamida (figura 10) as frações também demonstraram que não estavam puras, necessitando de etapas adicionais para a sua purificação.

A Ts2 pertence às α-neurotoxinas e retarda a inativação de canais para sódio. Em 2012, Cologna e colaboradores realizaram ensaios de eletrofisiologia em subcanais $Na_V1.2$, $Na_V1.3$, $Na_V1.5$, $Na_V1.6$ e $Na_v1.7$ e observam a inibição da inativação rápida destes canais, os subcanais $Na_V1.4$, $Na_V1.8$ não foram afetados pela Ts2. A Ts2 também mudou de modo relevante a dependência de voltagem para ativação dos canais $Na_V1.3$.

A forte interação entre toxinas da peçonha e as semelhanças de carga e hidrofobicidade pode dificultar o isolamento das mesmas. A separação das subfrações F22.4 e F22.5 não foi efetiva nem mesmo com o uso de uma coluna de menor diâmetro interno e menor tamanho de partículas dotadas da tecnologia *core-shell* (partículas com núcleo fundido), com baixa transferência de massa, o que permite análises mais breves sem suscitar altas pressões e que propicia uma melhor separação dos componentes, com alta seletividade e eficiência (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

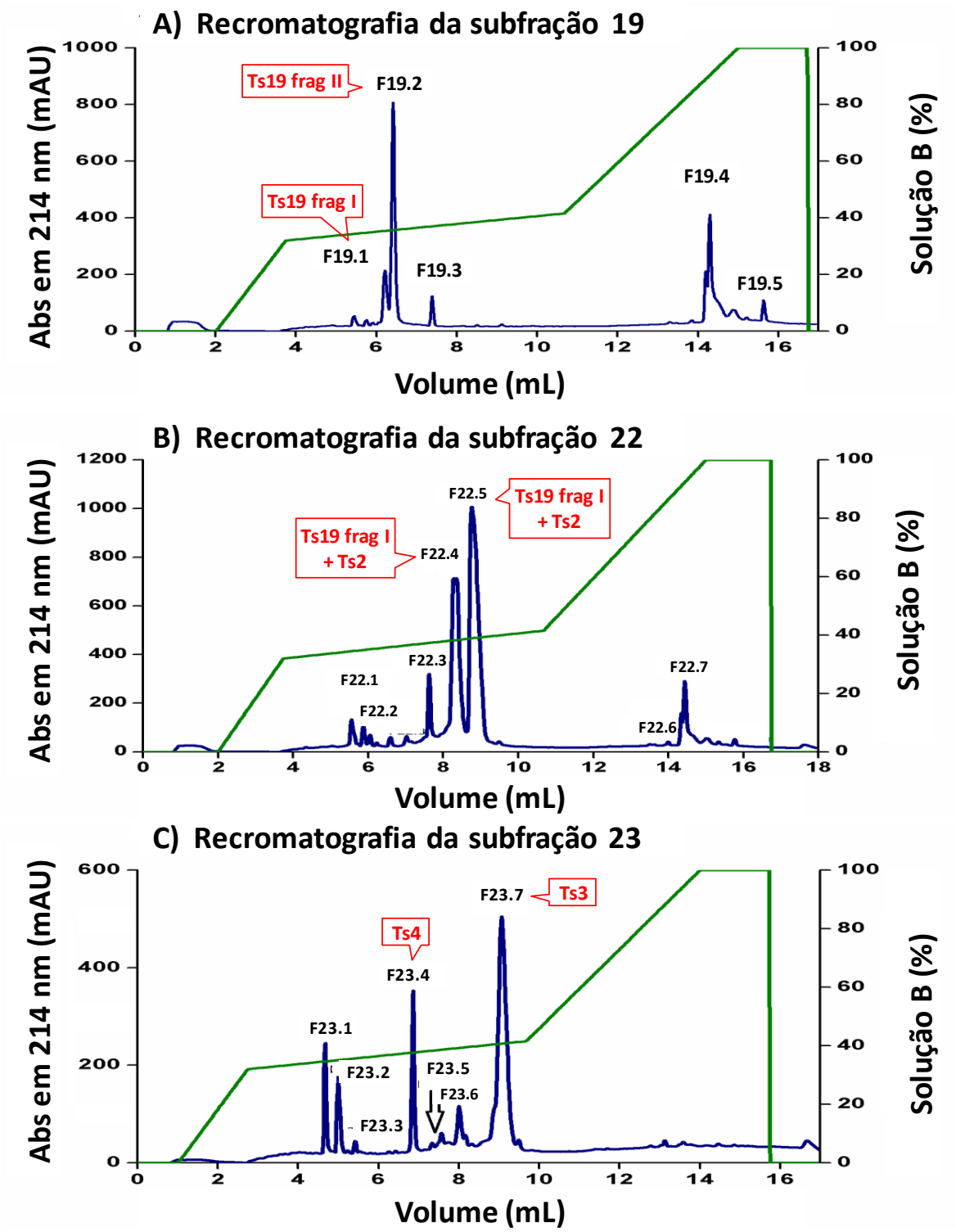

Figura 13 - Fracionamento da subfração 19 (A), subfração 22 (B) e subfração 23 (C). Os fracionamentos foram realizados em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 (0,21 x 25 cm, com partículas de 3,6 µm, Phenomenex), equilibrada com a Solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 0,4 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra foi inicialmente eluída com Solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (Solução B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha verde. Volume coletado por tubo: 0,3 mL

A purificação das subfrações F22.4 e F22.5 não foi concretiza devido ao mesmo carater hidrofóbico das toxinas. Além disso, apresentam massa molecular semelhantes, como podemos ver no item (4.5). Outros métodos cromatográficos fazendo uso de colunas CM-FF (CM-Fast Flow) e com trocador catiônico forte (MonoS) foram empregados, na tentativa de melhorar a resolução destes componentes. Porém, sem sucesso devido à proximidade entre as cargas das toxinas, dificuldade para obtenção de peçonha e ao baixo rendimento das cromatografias.

Através do sequenciamento por degradação de Edman foi possivel constatar que os picos F23.4 e F23.7 correspondem, respectivamente, às toxinas Ts4 e Ts3. As demais subfrações foram congeladas, liofilizadas e serão analisadas posteriormente.

4.5. Espectrometria de massas

As subfrações F22.4, F22.5 e F23.7 foram submetidas a ensaios de espectrometria de massas MALDI-TOF no modo linear positivo utilizando a matriz DHB (Figura 14), método que separa os íons conforme sua relação massa/carga (m/z). Com o modo linear são obtidas as massas moleculares médias (média dos isótopos) das proteínas que estão presentes na amostra. Ou seja, pequenas diferenças entre a massa monoisópica calculada teoricamente e a experimental são plenamente justificadas. Como pode ser observado, a F23.7 revelou apenas um componente majoritário com elevado teor de pureza (Figura 14C).

O método de degradação de Edman para a Ts19 frag I permitiu o sequenciamento de 57 resíduos de aminoácidos, dentre os quais 6 resíduos de cisteína (Tabela 2). A massa molecular teórica (determinada pelo programa *Sequence editor*) para a toxina oxidada (com pontes S-S) com 57 resíduos é de **6.458,127 Da.** No entanto, a massa molecular da subfração 22.5 (Ts19 frag I) determinada por espectrometria de massas (Figura 14A) foi de **6.571,3165 Da.** Este valor sugere que a toxina Ts19 frag I não foi totalmente sequenciada por degradação de Edman. A diferença de **113,1895 Da** entre a massa determinada por espectrometria de massas e a massa teórica calculada, corresponde a 1 resíduo do aminoácido (Leu ou Ile) da região carboxiterminal

que não foi sequenciado. Provavelmente, o aminoácido que não foi identificado pelo sequenciamento da Ts19 frag I é uma leucina. Esta dedução é possível pela comparação com outras toxinas com as quais tem alta identidade, entre elas as toxinas de *Tityus trivittatus, Tityus costatus, T. stigmurus* (Fig. 12) e a Ts19 obtida através do transcriptoma da glândula produtora de peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. Todas elas apresentam a leucina como resíduo C-terminal.

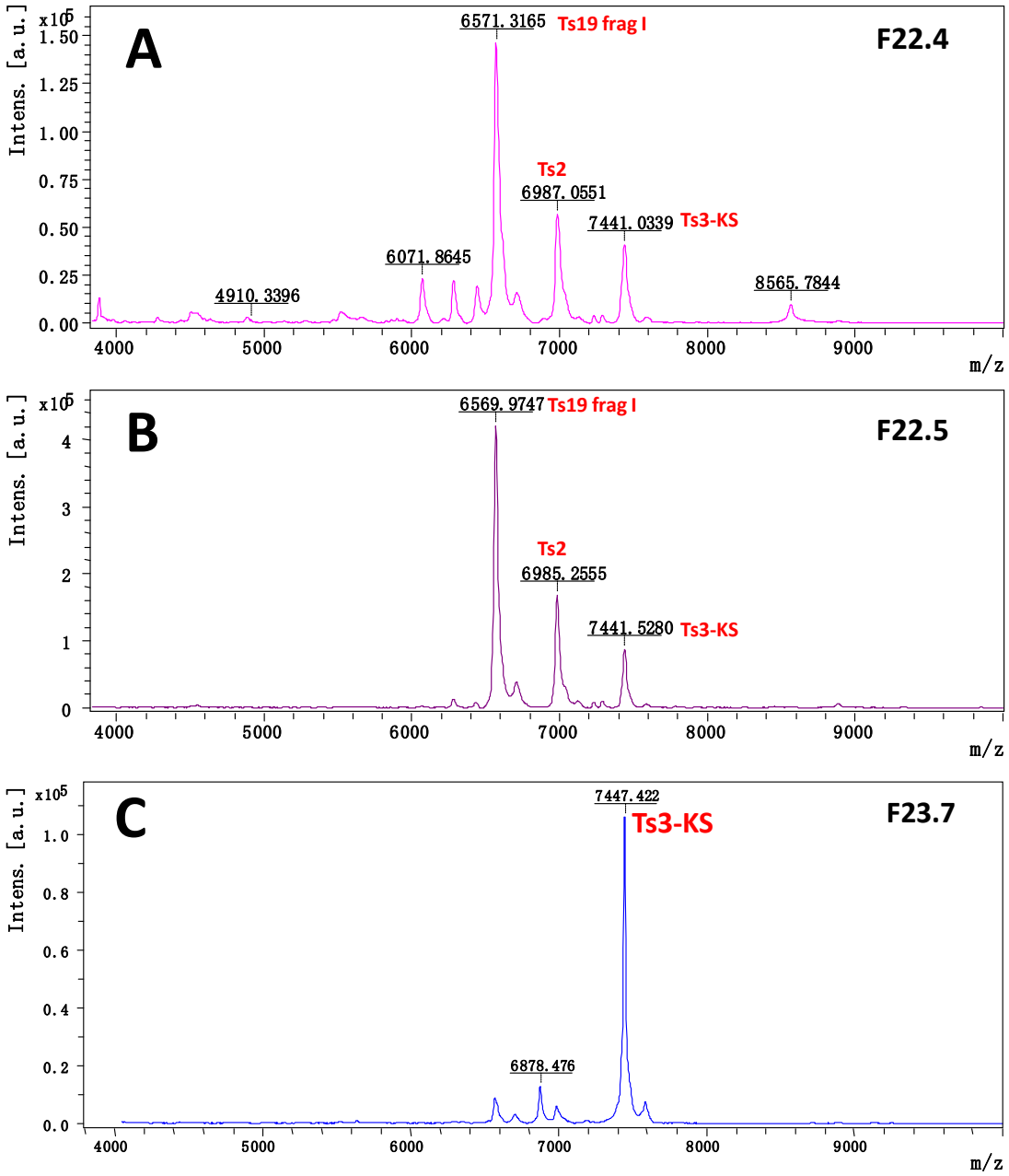

Figura 14- Espectro de massas das subfrações F22.4 (A), F22.5 (B) e F23.7 (C). Os espectros foram obtidos por espectrometria de massas MALDI-TOF no modo linear positivo utilizando a matriz DHB.

Foi possivel observar na análise por espetrometria de massas que mesmo após a recromatrografia (item 4.5) a Ts19 frag I não estava pura. Observam-se três componentes relevantes tanto na F22.4 quanto na F22.5: a Ts19 frag I (majoritária em ambas frações), a Ts2 cuja a massa molecular teórica é 6.985 Da (COLOGNA et al., 2009) e que foi identificada anteriormente como contaminante através do sequenciamento amino-ternimal, e a Ts3 precursor (Ts3-KS) com massa molecular de 7.442 Da (COLOGNA et al., 2009).

Adicionalmente, foi realizado o espectro de massas da F23.7 que mostrou ser majoritariamente a Ts3-KS, com massa molecular média de **7.447,422 Da** (Figura 14C). O espectro de massas mostra também alguns contaminantes em pequenas proporções. No entanto, vale ressaltar que a espectrometria de massas é um procedimento em que a intensidade dos picos não está diretamente relacionada à quantidade da proteína na amostra, sendo mais influenciada pela facilidade de ionização da molécula na presença da matriz do que pela quantidade de proteína presente na amostra.

4.6. Avaliação da Viabilidade Celular

A citotoxicidade das toxinas Ts4, Ts19 frag I e Ts3-KS presentes na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* foram avaliadas na concentração de 50 µg/mL em linhagem celular de macrófagos peritoneais de camundongos J774. 1. A avaliação da viabilidade mitocondrial e, consequentemente a viabilidade celular, é avaliada pela redução do MTT (amarela) a formazan (arroxeado).

Este ensaio preliminar é fundamental para saber se a dose utilizada de toxina não interfere com a viabilidade celular, visto que as células precisam estar viáveis para a realização dos ensaios subsequentes.

Não houve alteração significativa na viabilidade celular na presença das toxinas. De modo geral, a concentração de toxina empregada no ensaio não afetou as células (J774. 1) quando comparada com o controle (meio de cultura, controle negativo).

Baseado neste dado, o ensaio para averiguar a liberação de citocinas foi realizado aplicando condições análogas. A dose de 50 µg/mL foi escolhida para a realização destes ensaios, pois nesta dose Zoccal e colaboradores (2011)

observaram um aumento significativo da liberação de citocinas na presença de toxinas da peçonha de *T. serrulatus*.

4.7. Avaliação da Liberação de Óxido Nítrico

Venenos e peçonhas podem ocasionar a liberação de óxido nítrico. Visando avaliar esta liberação, as toxinas Ts4, Ts19 frag I e Ts3-KS foram utilizadas na concentração de 50 µg/mL em linhagem celular de macrófagos de camundongos J774. 1.

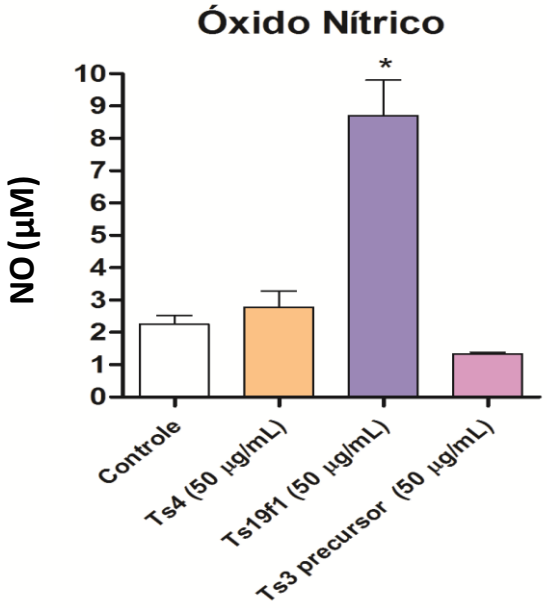

Figura 16- Capacidade das toxinas Ts4, Ts19 frag I e Ts3-KS precursor de induzir a produção de óxido nítrico (NO). As amostras na concentração de 50 µg/mL foram analisadas em linhagem celular de macrófagos de camundongos J774.1. Os resultados apresentados (média ±DP; n=4) foram analisados por ANOVA e pós-teste de Dunnett's. *p < 0,05, diferença sig

Foi possível observar, que a Ts19 frag I na concentração de 50 µg/mL em células de macrófagos de camundongos J774. Promoveu significativa liberação de óxido nítrico, mas nenhuma alteração foi observada com as toxinas Ts4 e Ts3-KS na mesma concentração (Figura 16).

O óxido nítrico (NO) ou monóxido de nitrogênio é uma pequena molécula com o importante papel de sinalizador celular. Normalmente, o óxido nítrico

participa em muitos processos biológicos no organismo, que abrangem regulação da expressão gênica de células imunológicas, neurotransmissão, conservação da integridade e funcionamento da membrana (BREDT; SNYDER, 1994). Alterações na concentração de NO são detectadas em envenenamentos decorrente de acidentes com escorpiões (BARBOUCHE et al., 1996).

Nos casos de maior gravidade, sintomas como: hipertensão, choque séptico e seus inúmeros efeitos sobre o sistema imunológico estão diretamente ligados com alterações dos seus níveis no organismo.

Neurotoxinas presentes na peçonha de escorpiões atuam de forma específica e seletiva em canais iônicos, modulando a atividade de neurotransmissores. Também é conhecido que a peçonha induz uma resposta imunológica devido às neurotoxinas e outros componentes da mesma (ZOCCAL et al., 2011).

A Ts6 na dose de 100 µg/mL também induziu a produção de óxido nítrico, conforme estudo de Zoccal et al. (2011). Ambas as toxinas, Ts6 e Ts19 frag I, são capazes de bloquear canais para os íons potássio. A toxina Ts2 de *Tityus serrulatus*, que atua em canais para os íons sódio, não estimulou a liberação de óxido nítrico. Além disso, quando as células de macrófagos foram pré-estimuladas com LPS (aumenta a liberação de NO), a Ts2 inibiu a liberação de óxido nítrico (ZOCCAL et al., 2011).

Desta forma, é possível observar que a contaminação da Ts19 frag I com Ts2 precursor não afetou o presente ensaio. Acredita-se que este fato ocorreu devido a Ts2 estar em menor proporção que a Ts19 frag I na subfração F22.5, conforme relatado no item 4.5.

Foi possível constatar, que a Ts3-KS na concentração de 50 µg/mL não estimulou a liberação de óxido nítrico. Sendo assim, é provável que esta, como contaminante da Ts19 frag I, não interferiu no presente resultado. Conclui-se com isso que a liberação de óxido nítrico pela fração F22.5 é consequência da ação da Ts19 frag I.

Alterações que promovam um aumento nos níveis de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais podem estar associadas a choques sépticos, casos graves de envenenamento e hipertensão (ZOCCAL et al., 2011).

A Ts19 frag I mostrou induzir de maneira significativa as células de macrófago peritoneais a produzirem NO. Porém, a quantidade de óxido nítrico

liberada não foi suficiente para desencadear a liberação de TNF-α (Figura 17D).

Ensaios direcionados ao sistema cardiovascular e nervoso devem ser realizados para confirmar o potencial promissor desta toxina como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos ou elucidar sua relação com os mecanismos fisiopatológicos do envenenamento.

A Ts4 não alterou os valores de NO produzidos pelas células, que apresentaram níveis bem próximos ao controle positivo. Estes resultado é mais um dado a suportar a hipótese de que a Ts4 não participa de forma significativa no envenenamento de organismos.

4.8. Avaliação da Liberação de Citocinas

A liberação das citocinas IL-6 (Figura 17A), IL-10 (Figura 17B), IL-1β (Figura 17C) e TNF-α (Figura 17D) foi avaliada em células de linhagem peritoneais de murinos J774.1 induzida pelas toxinas Ts4 e Ts19 frag I (em maior proporção, mas não pura, contaminada com Ts2 e Ts3 como descrito nos itens 4.3 e 4.4). A liberação da citocina IL-6 também foi avaliada com a toxina Ts3-KS, por ser um dos contaminantes da Ts19 frag I.

As toxinas foram aplicadas na dose de 50 µg/mL, a dosagem foi escolhida com base nos estudos realizados por Zoccal et al. (2011). Nesta dosagem foi possível observar a liberação de algumas citocinas neste tipo de ensaio.

Estudos envolvendo a liberação de citocinas são de grande importância para o desenvolvimento da terapêutica e compreensão do envenenamento, dado os relatos de estímulo a liberação das mesmas, principalmente nos casos de maior gravidade (MEKI; MONHEY-EL-DEAN,1998).

Durante o envenenamento, as citocinas são liberadas por macrófagos como uma resposta inflamatória (PETRICEVICH, 2004). As citocinas contribuem para o choque e para a disfunção pulmonar e cardíaca (PETRICEVICH, 2004). O edema pulmonar agudo é uma das principais causas de óbito nos casos de acidentes envolvendo escorpiões.

Em 2002, Peták e colaboradores estudaram os impactos das alterações da mecânica respiratória acarretadas por inflamação aguda ou crônica.

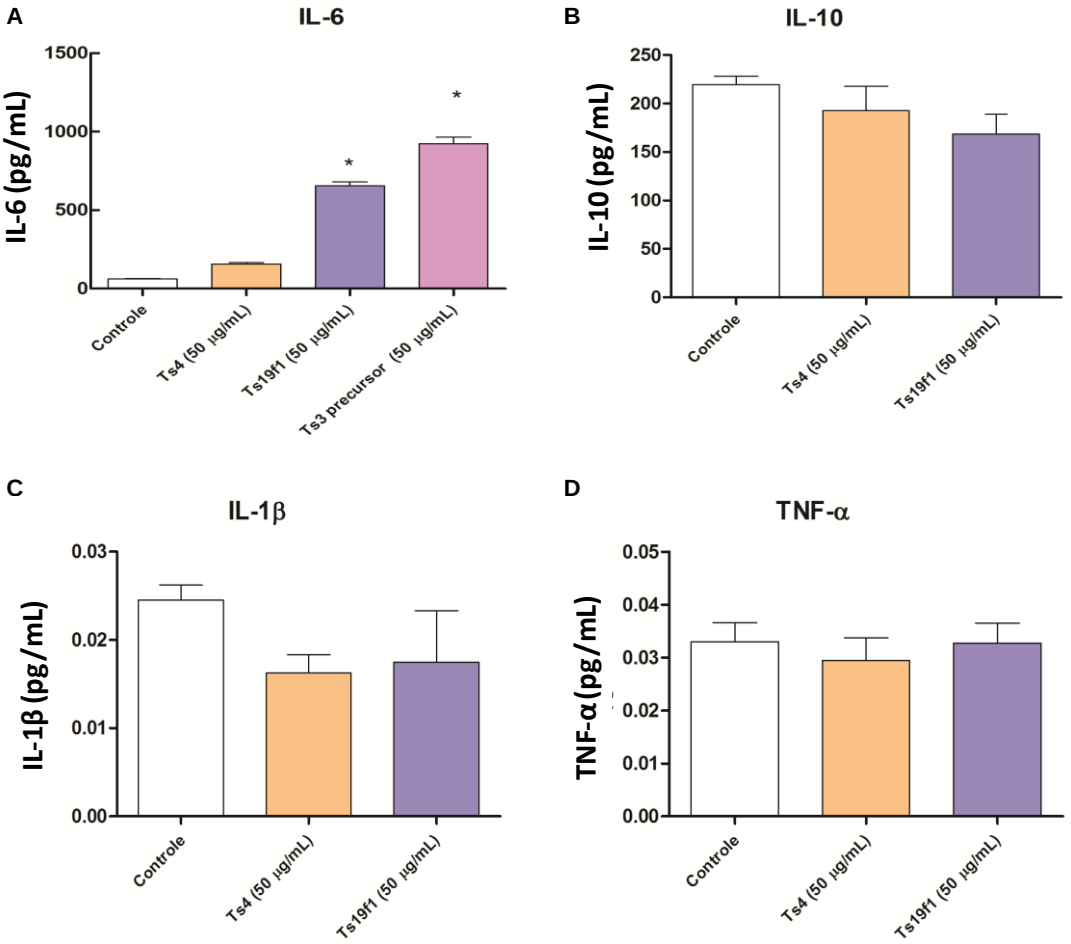

Figura 17- Efeito da Ts4, Ts19 frag I (não pura, contaminada com Ts2 e Ts3 precursor) e Ts3 precursor na produção de citocinas em células J774.1. Células J774.1 aderentes foram estimuladas com Ts4, Ts19 frag I (não pura) e Ts3 precursor ambas na dose de 50 µg/mL por 24 hs, na presença de CO_2 5%, a 37ºC. Posteriormente, as citocinas IL-6 **(A)**, IL-10 **(B)**, IL-1β **(C)** e TNF-α **(D)** foram quantificadas. Os resultados estão expressos como média (±DP; n=8), analisados por ANOVA. O símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,05$**)**.

As toxinas Ts19 frag I (não pura) e a Ts3 precursor (Ts3-KS), todas nas dose de 50 µg/mL, estimularam a liberação de IL-6, a segunda em maior proporção. As interleucinas IL-10,IL-1β e o fator de necrose tumoral não tiveram seus níveis alterados por nenhuma toxina, quando comparados ao controle.

Dados da literatura comprovam que após a inoculação da peçonha de escorpiões do gênero *Leiurus*, *Buthothus* e *Tityus* houve um aumento relevante na liberação de óxido nítrico e interleucinas (IL-1α, IL1-β e IL-6) (SOFER et al., 1996; BARRAVIERA, 1997).

A IL-6 é uma citocina relevante devido a sua multifuncionalidade, e ao fato de exercer uma função essencial na resposta inflamatória e no comando da diferenciação de células T na imunidade adaptativa.

Analisando os fatos abordados no presente trabalho é de suma importância o estudo dos efeitos imunomodulatórios das toxinas escorpionicas, pois seu estudo contribui para a compreensão e elucidação dos mecanismos envolvidos com a ativação de macrófagos após o envenenamento, além de suas possiveis aplicações terapêuticas, como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, que possam ser uma alternativa no combate de doenças.

.

4.9. Avaliação da atividade Hemolítica

Através do ensaio realizado segundo o item 3.15 foi possível verificar a atividade hemolítica em células sanguíneas de rato Wistar. A subfração utilizada no ensaio foi a F22.5, que corresponde principalmente à Ts19 frag I (Figura 18). As amostras foram ressuspendidas em salina, o que justifica seu uso como controle negativo.

A hemólise é um fenômeno que apresenta como principal característica o rompimento da membrana da hemácia, o que provoca a liberação da hemoglobina e de outros componentes internos como enzimas, proteínas estruturais, carboidratos, etc. (BASTOS et al., 2010).

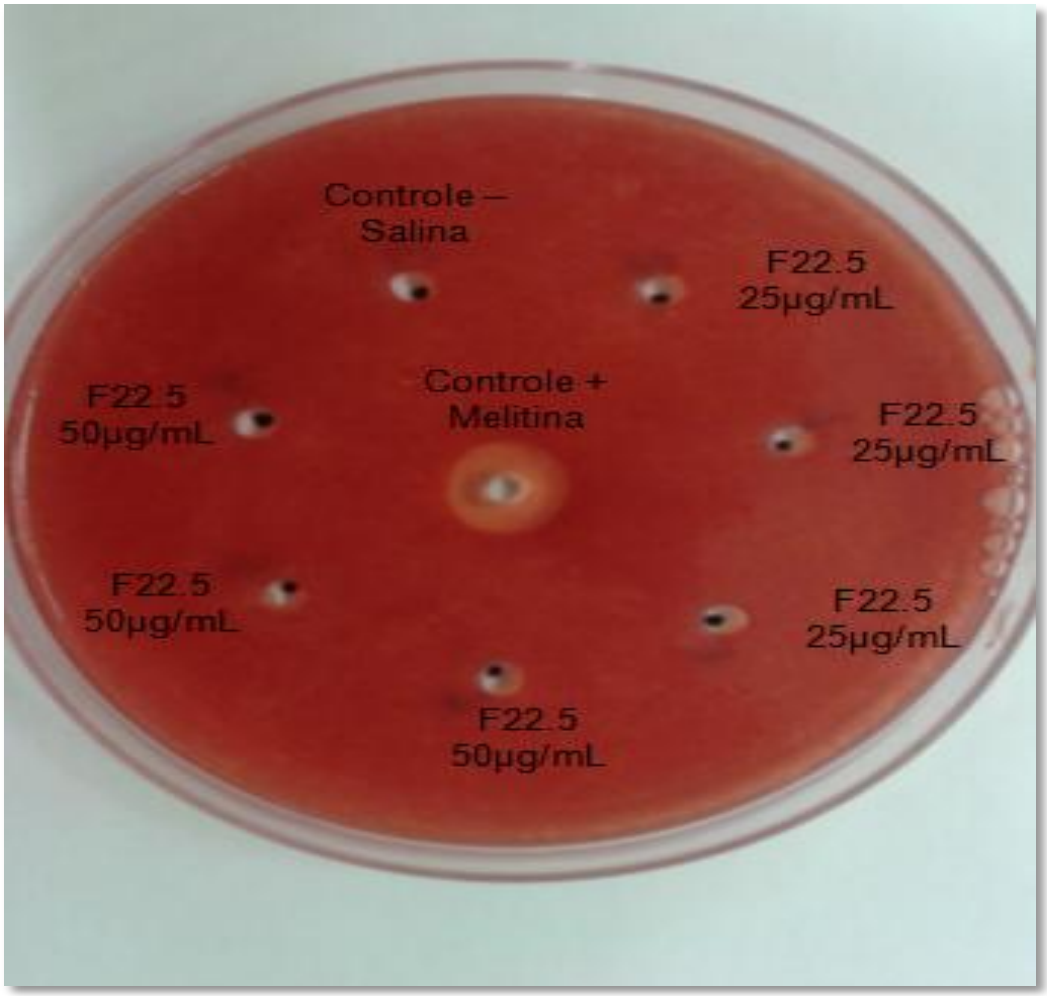

Figura 18- Placa para verificar a atividade hemolítica nas doses de 25 µg/mL e 50 µg/mL realizada em triplicata da subfração F22.5 (Ts19 frag I contaminada com Ts2 e Ts3 precursor). Foi utilizado como controle positivo a melitina e como controle negativo salina.

No centro da placa foi aplicado como controle positivo a melitina, que é conhecida por ser a principal toxina encontrada na peçonha de abelhas, e ter como características alta capacidade alergênica e toxicidade (RESENDE, 2013). Foi possível observar a formação do halo no local da aplicação da melitina (controle positivo), o que demonstra sua atividade hemolítica (fosfolipásica).

A melitina consegue quebrar os fosfolipídios presentes na gema do ovo, utilizado no preparo da placa, e desta forma liberar os ácidos graxos que tornam o pH ao seu redor ácido, provocando a lise dos eritrócitos sanguíneos que estão no gel. O halo esbranquiçado observado na figura 18, torna possível verificar a capacidade hemolítica da melitina e comparar a mesma com as toxinas presentes na subfração F22.5.

Os resultados obtidos mostram que a Ts19 frag I (contaminada com Ts2 e Ts3 precursor) não exerceu atividade hemolítica nas doses de 25 µg/mL e 50 µg/mL. Fato que, acrescentado ao resultado apresentado no item 4.6, mostra que estas toxinas, nestas concentrações, não são citotóxicas.

5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi realizado o isolamento e a caracterização de uma nova toxina (Ts19 frag I) presente nas frações VII e VIII da peçonha de *Tityus serrulatus*. Nestas frações também foram encontradas Ts2, Ts3-KS e Ts4
- A Ts19 frag I foi parcialmente purificada por cromatografia de troca catiônica em coluna carboximetilcelulose-52 (1,6 x 100 cm) seguida de cromatografia de fase reversa em coluna C18 (4,6 x 250 mm) e recromatografia em coluna C18 (2,1 x 250 mm).
- Foi realizado o sequenciamento de 57 resíduos de aminoácidos da Ts19 frag I, que apresentou 6 resíduos de cisteína.
- A sequência de aminoácidos foi analisada por BLAST e mostrou compartilhar um elevado grau de identidade sequencial com outras toxinas que atuam em canais para K^+ depositadas no banco de dados.
- A sequência foi usada para predizer os parâmetros químicos e físicos usando o *ProtParam tool*: Ts19 frag I (57 resíduos sequenciados) apresenta pI teórico de 8,57.
- Massa molar íntegra desta toxina é 6.571,3165 Da e foi determinada por espectrometria de massas MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization). Este valor sugere que a toxina Ts19 frag I possui 58 resíduos de aminoácidos e que Leucina é o resíduo C-terminal da toxina.
- Através do ensaio com MTT foi possível verificar que a Ts19 frag I(contaminada com Ts2 e Ts3-KS), Ts4 e a Ts3-KS não demonstraram ter atividade citolítica em células de murino.
- A Ts19 frag I (contaminada com Ts2 e Ts3-KS) induziu uma grande liberação de óxido nítrico em células de macrófagos, enquanto a Ts4 e a Ts3–KS não induziram a liberação de óxido nítrico significativamente, na concentração de 50 µg/mL.
- A Ts19 frag I (contaminada com Ts2 e Ts3–KS) e a Ts3–KS induziram uma grande liberação da interleucina IL-6 em células de macrófagos; enquanto a Ts4, induziu uma pequena liberação Todas estavam na concentração de 50 µg/mL.

- As toxinas Ts19 frag I (contaminada com Ts2 e Ts3–KS) e Ts4 nas concentrações de 50 µg/mL não estimularam a liberação de IL-10, IL-1β e fator de necrose tumoral TFF-α em células de macrófagos peritoneais.
- As toxinas Ts19 frag I (contaminada com Ts2 e Ts3–KS) e Ts4 não apresentam atividade hemolítica, indicando baixa citotoxicidade.

6. Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, E. R. et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. OJGen, USA, n. 2, p.210-220, 2012.

ARANTES, E. C. et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom - isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. *Toxicon,* Oxford, v. 27, n. 8, p. 907–916, 1989.

ARANTES, E. C. et al. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na^+ channels. *Biochimica Et Biophysica Acta,* Amsterdam, v. 1199, n. 3, p. 69-75, 1994.

ATREYA, R., et al."Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*,v. 6, n**.** 5, p. 583-588, 2000.

BARBOSA, F. M. et al. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. *Fems Microbiology Letters***,** Amsterdam, v. 274, n. 2, p. 279–286, 2007.

BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 411, 1994.

BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: Applications in medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, London, v. 12, n. 8, p.553-571, 2009.

BARBOUCHE, et al. Inflamatory cytokines and scorpion envenomation: analysis of serological levels in 46 Tunisian patients. *Toxicon,* v. 34, p. 156-157, 1996.

BASTOS, M. S.;Berner A. A.; Paula E. R. Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. *V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica* 26 a 29 de outubro de 2010

BAUERFEIND, R. et al. Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Woodbury, v. 60, p.397-404, 1995.

BAWASKAR, H. S.; BAWASKAR, P. H. Scorpion sting: a review of 121 cases. *Journal of Wilderness Medicine,* London, v. 2, n. 3, p.164-174, 1991.

BLAUSTEIN, M. P. et al. Polypeptide toxins from the venoms of old-world and new-world scorpions preferentially block different potassium channels. *Molecular Pharmacology,* Bethesda, v. 40, n. 6, p. 932-942, 1991.

BORDON, K.C.F.; COLOGNA, C.T.; TYTGAT, J.; ARANTES, E.C. Purification and characterization of Ts16, new specific Kv1.2 blocker, from *Tityus serrulatus* scorpion venom. 17th Congress of the European Section of the International Society of Toxinology (Calvete, J. J., chairman), Valencia, September 11-15, 2011, Program & Abstracts Book, Valencia-Spain, p. 240, Poster 128; 2011.

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon,* Oxford, v. 49, n. 2, p. 142-158, 2007.

BREDT, D. S.; S. H. SNYDER. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron,* v. 13, n. 2, p. 301-313, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Boletim Eletrônico Epidemiológico, n. 2, abr. 2010, p. 1-24, 2010. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_ eletronico_02_ano10.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Acidentes escorpiônicos. Situação epidemiológica: casos de acidentes por escorpiões - 2000 a 2011. [2012]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/5818/783/acidentes-por-escorpioes. html>. Acesso em: 8 ago. 2012.

CALIXTO, João B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciência e Cultura*,* São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CATTERALL, W. A. The molecular basis of neuronal excitability. *Science,* New York, v. 223, n. 4637, p. 653-61, 1984.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron***,** Cambridge, v. 26, n. 1,p. 13-25, 2000.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon,* Oxford, v. 49, n. 2, p. 124-141, 2007.

CERNI, F. A. *Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião Tityus serrulatus e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7*. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CESTÈLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie,* Paris, v. 82, n. 9-10, p.883-892, 2000.

CHÁVEZ-ORTEGUI, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha-and-beta-

toxins from the venom of Tityus serrulatus scorpion. Mol. Immunol., v. 38, p. 867-876, 2002.

CHI, V. et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon,* Oxford, v. 59, n. 4, p. 529-546, 2012.

CHIPPAUX, J. P. and M. Goyffon. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop, v.* 107, n. 2, p. 71-79, 2008.

CHIPPAUX, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design Development and Therapy,* Auckland, v. 6, p.165-173, 2012.

Cloudsley-Thompson, J. L. Thermal and water relations of desert beetles.*Naturwissenschaften, v.* 88, n. 11, p.447-460, 2001.

COLOGNA, C. T. et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein and Peptide Letters,* Hilversum, v. 16, n. 8, p. 920-932, 2009.

COLOGNA, C. T. et al. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new alpha-KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon,* Oxford, v. 58, n. 1, p. 54-61, 2011.

COLOGNA, C. T. et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. *Febs Journal,* Oxford, v. 279, n. 8, p. 1495-1504, 2012.

CORPET, F. Multiple sequence aligment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

DAUPLAIS, M. et al. On the convergent evolution of animal toxins - Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry,* Germany, v. 272, n. 7,p.4302-4309, 1997.

DEVLIN, T. M. et al. Manual de bioquímica com correlações clínicas. Editora Edigard Blucher LTDA., São Paulo, n. 4, p.1-1007, 1998.

DE LA VEGA, R. C. R.; POSSANI, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K^+-channels. *Toxicon,* Oxford, v. 43, n. 8, p. 865-875, 2004.

DE LA VEGA, R. C.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon,* Oxford, v. 56, n. 7, p. 1155-1161, 2010.

DIEGO-GARCIA, E. et al. Cytolytic and K^+ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cellular and Molecular Life Sciences,* Basel, v. 65, n. 1, p. 187-200, 2008.

DIEGO-GARCÍA ; BATISTA CV, .The Brazilian scorpion *Tityus costatus Karsch*: genes, peptides and function. *Toxicon*, v. 45, n.3, p. 273-83, 2005.

DINIZ, C. R.; GONCALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. *Biochimica Et Biophysica Acta,* Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 470-477, 1960.

DOEPNER R. F. et al. Insights into GABA receptor signalling in TM3 Leydig cells. *Neuroendocrinology,* v. 81, n. 6, p 381-90, 2005.

DOYLE, D. A. et al. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science***,** New York, v. 280, n. 5360, p. 69-77 1998.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

ElGAR, D., et al. Ion selectivity of scorpion toxin-induced pores in cardiac myocytes. *Peptides*, v. 27, n. 1, p. 55-61, 2006.

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

FU, Y. J. et al. Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neuroscience Letters,* Limerick, v. 412, n. 1, p.62-67, 2007.

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

GARCÍA et al. Citotoxicidad del veneno del escorpión cubano Rhopalurus junceus y sus fracciones sobre líneas celulares tumorales humanas. *Labiofam,* Cuba, n°.1, p 1-103, 2010.

GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, Oxford, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews,* Bethesda, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, 10. ed., p.1008, 2002.

HARVEY, A.L. et al. OVERVIEW: Animal Toxins: State of the Art; Perspectives in Health and Biotechnology. *Editora UFMG*, Belo Horizonte, p. 19-22, 2009.

HENDERSON, D. F. Permacultura: as técnicas, o espaço, a natureza e o homem. 2012. 87 f., Monografia (Bacharelado em Ciências Sociais) Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology-London*, Londron, v. 117, n. 4,p. 500-544, 1952.

Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Atualizado em: indisponível. Disponível em: http://icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupoa/s3/canais.htm. Acesso em: 20 de maio de 2012.

JANG, S. H. et al. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmacology,* Amsterdam, v. 651, n. 1-3, p. 26-32, 2011.

KOCA, I.; KOCA, A. F. Poisoning by mad honey: A brief review. *Food and Chemical Toxicology,* Oxford, v. 45, n. 8, p. 1315-1318, 2007.

KOMINSKY-ATIAS, A.; SOMECH, E.; ZILBERBERG, N. Isolation of the first toxin from the scorpion *Buthus occitanus israelis* showing preference for Shaker potassium channels. *Febs Letters,* Amsterdam, v. 581, n. 13, p. 2478-2484, 2007.

KOMPOSCH, C. Scorpions and scorpion-venoms from the biological and human medical point of view (Arachnida, Scorpiones). *Denisia,* Linz, v. 30,n. 20, p. 279-317, 2010.

KORN, T., E. et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, n.27: ,p. 485-517, 2009.

LEIPOLD, E. et al. Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels. *Febs Letters,* Amsterdam, v. 579, n. 18, p.3881-3884, 2005.

LEGROS, C. et al. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K+ channels. *Febs Letters*, Amsterdam, v. 431, n. 3, p. 375–380, 1998.

LEWINSOHN, T. M.; FREITAS, A. V. L.; PRADO, P. I. Conservation of terrestrial invertebrates and their habitats in Brazil. *Conservation Biology,* Boston, v. 19, n. 3, p. 640-645, 2005.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery,* London, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.
LIMA, R. R., *et al*. Inflamation in neurodegenerative disease. *Rev. Para. Med.*, Pará, vol.21, no.2, p.29-34, 2007.

LOURENÇO, W. R.; CUELLAR, O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. *Journal of Venomous Animals and Toxins,* Botucatu, v. 1, n. 2, p. 51-62, 1995.

LUTZ, A.; MELLO, O. Cinco novos escorpiões dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. A Folha Medica*,* Rio de Janeiro*,* v. 3, n. 4, 1922.

MA, Y. et al. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: Implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *Journal of Proteomics,* Amsterdam,v. 75, n. 5, p.1563-1576, 2012.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 33, n. 7, 2010.

MANSUELLE, P. et al. The beta -type toxin Ts II from the scorpion *Tityus serrulatus*: amino acid sequence determination and assessment of biological and antigenic properties. *Natural Toxins,* New York,v. 1, n. 2, p. 119-125, 1992.

MARCUSSI, S. et al. *Escorpiões: Biologia, envenenamentoe mecanismos de ação de suas toxinas*. FUNPEC, São Paulo, v.1, n.1, p. 3-119, 2011.

MARTIN-EUCLAIRE, M. F. et al. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of TsIV and alpha toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett*., v. 342, p.181-184, 1994.

MEKI, A. R.; MONHEY EL-DEAN, Z. M. Serum interleukin-1 beta, interleukin-6, nitric oxide and alphal-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*, v. 36, p. 1851-1859, 1998.

MELO, K. M; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias mecanismo de ação e função nas doenças humanas. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatologia*, v.32, n. 5, p. 184-188, 2009.

MILLER, C. et al. The charybdotoxin family of k+ channel-blocking peptides. *Neuron***,** Cambridge, v. 15, n. 1, p. 5-10,Jul 1995.

MIRANDA, F. et al. Purification of animal neurotoxins - isolation and characterization of 11 neurotoxins from venoms of scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *European Journal of Biochemistry,* Oxford, v. 16, n. 3, p. 514-523 1970.

MITTERMEIER, R. A. et al. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. *Conservation Biology,* Boston, v. 19, n. 3, p. 601-607, 2005.

MOHAMMED, A. H. Notes on the toxins of Egyptian scorpions. *Biochemical Journal,* London, v. 38, p. 284-285, 1944.

MOUHAT, S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Current Pharmaceutical Design,* Schiphol, v. 14, n. 24, p. 2503-2518, 2008.

NOVELLO, J. C. et al. TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca^{2+}-activated K^{+} channels. *Toxicon,* Oxford, v. 37, n. 4, p. 651-660, 1999.

OGA, S., CAMARGO, M. M. A., & BATISTUZZO, J. A. Fundamentos de Toxicologia. *In Atheneu,* São Paulo, 3 ed., p. 1-643, 2008.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Epidemiologia do Paraná. Centro de Informações Toxicológicas de Curitiba. Prevenção de Acidentes com Animais Peçonhentos. Cartilha. Curitiba, 1997.

PENN, R. D.; PAICE, J. A. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain,* Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p.291-296, 2000.

PESSINI, A.C. et al. Time course of acute-phase response induced by Tityus serrulatus venom and TsTX-I in mice. *Toxicon,* Oxford ,v.3, p.765-774, 2003.

PESSINI, A.C. et al. Ahyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon,* Oxford, v.48, p.556-566, 2006.

PETÁK, F. et al. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. J Appl Physiol, v. 92, n. 1,p.169-78, 2002.

PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. *Mediators of Inflammation*, Oxford, n. 1, p.39-49, 2005.

POSSANI, L. D. et al. Purification and chemical characterization of the major toxins from the Braziliam scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun.,* v.46, p. 195-205, 1981.

POSSANI, L. D. et al. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie,* Paris, v. 82, n. 9-10, p. 861-868, 2000.

POSSANI, L. D. Scorpion toxins that cause human intoxication. *Toxicon,* Oxford, v. 60, n. 2, p. 185-186, 2012.

PRENDINI, L.. New records and observations on the natural history of Lisposoma elegans and L-josehermana (Scorpiones : Bothriuridae). *American Museum Novitates*, v. 3487, p. 1-11, 2005.

PRINS, J. R. et al. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *J Reprod Immunol, v.* 95, n**.** 1-2, p. 1-14, 2012.

PUCCA, M.B. *Serrumab: um fragmento de anticorpo monoclonal humano (scFv) que apresenta capacidade de neutralização para diferentes toxinas escorpiônicas*. 2012. 130 f.Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

RAFAEL NIETO, F. et al. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain. *Marine Drugs,* Basel, v. 10, n. 2, p. 281-305, 2012.

RATES, B. et al. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity. *Toxicon,* Oxford, v. 52, n. 5, p. 611-618, 2008.

RESENDE, Virginia Maria Ferreira. *Análise proteônica de venenos de Apis mellifera baseada em espectrometria de massas*: abordagem quantitativa label-free e identificação de fosforilação. 2013. Tese (Doutorado em Alergia e Imunopatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-12062013-115302/>. Acesso em: 2013-12-12.

RIBEIRO, E. L. et al. Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon,* Oxford, v. 55, n. 6, p. 1125-1131, 2010.

RIDGEWAY, B.; WALLACE, M.; GERAYLI, A. Ziconotide for the treatment of severe spasticity after spinal cord injury. *Pain,* Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p.287-279, 2000.

ROBERT, V., E. et al. "Calcium signalling in T-lymphocytes. *Biochimie*, Paris, v.l 12, p. 2087-2094, 2011.

SAMPAIO, S. V. et al. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and TsIV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon,* Oxford, v. 29, n. 6, p. 663-672, 1991.

SANTONI, M. F. et al. "Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma." *Cancer Immunol Immunother* v.62,n. 12, p. 1757-1768, 2013.

SCHWARTZ, D. M. et al. Tetrodotoxin: anesthetic activity in the de-epithelialized cornea. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology,* Berlin, v. 236, n. 10, p.790-794, 1998.

SHIEH, C. C. et al. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews,* Bethesda,v. 52, n. 4, p. 557-593, 2000.

SILVA, J. J. G. Cromatografia de proteínas guia teórico e prático. Editora Interciência, Rio de Janeiro, v.1, p. 1-110, 2004.

SISSOM, W. D. Systematic, biogeography, paleontology. In: Polis, G.A. (Ed.) The biology of the scorpions, California, Stanford University Press, p. 587, 1990.

SNYDER, S. H. Neurotransmitters, receptors, and second messengers galore in 40 years. *Journal of Neuroscience***,** Washington, v. 29, n. 41,p. 12717-12721, 2009.

SOFER, S.; GUERON, M.; WHITE, R. M.; LIFSHITZ, M.; APTE, RN. nterleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, Oxford, v. 34, p. 389-392, 1996.

SOLEGLAD, M. E. and V. Fet. Further observations on scorpion genera Hadrurus and Hoffmannihadrurus (Scorpiones, Caraboctonidae). *Zookeys,* v.59: p. 1-14, 2010.

STEVENS, M., PEIGNEUR, S., TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in pharmacology* v. 2, n. 71, 2011.

ULUG, M. et al. Scorpion envenomation in children: an analysis of 99 cases. *The Turkish Journal of Pediatrics,* Ankara, v. 54, n. 2, p. 119-127, 2012.

VASCONCELOS, F. et al. Effects of voltage-gated Na+ channel toxins from Tityus serrulatus venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,* Oxford, v. 141, n. 1, p. 85-92, 2005.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, Amsterdam, v. 257, n. 1, p. 11-19, 1972.

VIANNA, P. *Imunorregulação da gestação: Rumo ao sucesso* 165 f. Dissertação (Mestrado) –Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WIKIPEDIA.Cromatografia[2013]a.Disponívelem:<http://en.wikipedia.org/wiki/Fast_protein_liquid_chromatography >. Acesso em 04 set. 2013.

WIKIPEDIA.Escorpiões[2013]b.Disponívelem:<http://wikipedia.org/wiki/Seth>. Acesso em 1 abr. 2013.

ZHU, S. et al. Molecular cloning and sequencing of two short chain and two long chain K^+ channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii karsh*. *Febs Journal,* Oxford, v. 61, n. 14, p. 457-509, 1999.

ZHU, S.; TYTGAT, J. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences,* Basel,v. 61, n. 14, p. 1751-1763, 2004.

ZHU, S. et al. MeuTXK beta 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics,* v. 1804, n. 4, p.872-883, 2010.

ZOCCAL, K. F. et al. Tityus serrulatus venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and prodution of immune mediators. *Toxicon*, Oxford, v. 57, n.1, p. 1101-1108, 2011.

ZOCCAL, K. F. et al. Ts6 and Ts2 from Tityus serrulatus venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokines production. *Toxicon*, Oxford, v. 61, n.2 , p.1-10, 2012.

ANEXO A – Certificado de Regularidade do IBAMA para utilização de diferentes venenos animais.

Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

CADASTRO TÉCNICO FEDERAL
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR

IBAMA
M M A

Registro n.º: 1506748 Data da consulta: 05/01/2014 CR emitido em: 03/01/2014 CR válido até: 03/04/2014

Dados básicos

CNPJ: 63.025.530/0026-62
Razão social: FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
Nome fantasia: FMRP - Criadouro científico da USP
Data de abertura: 21/05/1952

Endereço

Logradouro: AV. BANDEIRANTES 3900 Complemento:
N.º: Municipio: RIBEIRAO PRETO
Bairro: CAMPUS DA USP UF: SP
CEP: 14049-900

Atividades potencialmente poluidoras

Categoria	Detalhe
20 - Uso de Recursos Naturais	45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa

Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade do Cadastro Técnico Federal emitido, em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama.

A certificação de regularidade emitida pelo CTF não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.

Fechar

ANEXO B – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1432.53.5), intitulado "Isolamento de componentes ativos em canais iônicos presentes na fração VII e VIII na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*", de autoria de **Priscila Alves da Silva Carmanhan e 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 05.08.2013.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1432.53.5), entitled: "Isolamento de componentes ativos em canais iônicos presentes na fração VII e VIII na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*", by **Priscila Alves da Silva Carmanhan 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, August, 05 2013.

Ribeirão Preto, 27 de agosto de 2013.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Vanessa Bombonato Garcia

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526