BRUNO DUZZI

Purificação e caracterização de peptídeos presentes no veneno do escorpião
Tityus serrulatus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutorado em Biotecnologia.

São Paulo
2018

BRUNO DUZZI

Purificação e caracterização de peptídeos presentes no veneno do escorpião
Tityus serrulatus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutorado em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Fernanda C. V. Portaro

Coorientadora: Dra. Vanessa Rioli

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Duzzi, Bruno

Purificação e caracterização de peptídeos presentes
no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* / Bruno
Duzzi; orientadora Fernanda Portaro; coorientadora
Vanessa Rioli. -- São Paulo, 2018.
136 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Tityus serrulatus*. 2. Escorpião amarelo. 3.
Componentes do veneno. 4. Peptídeos. 5. Elastase. I.
Portaro, Fernanda, orientador. II. Rioli, Vanessa,
coorientador. III. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 87131 - 4546351 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Bruno Duzzi no Programa: Biotecnologia, do(a) Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

Aos 18 dias do mês de outubro de 2018, no(a) ICB, Biotecnologia, realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Bruno Duzzi, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulado:

"Purificação e caracterização de peptídeos presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Fernanda Calheta Vieira Portaro	Presidente	I. Butantan	<u>APROVADO</u>
Ivo Lebrun	Titular	IB - Externo	<u>APROVADO</u>
Maria Teresa Machini	Titular	IQ - USP	<u>APROVADO</u>
Cristina Northfleet de Albuquerque	Titular	FCF - USP	<u>APROVADO</u>
Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira	Titular	UNIFESP - Externo	<u>APROVADO</u>

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Libia Ruy Vilanova, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 18 dias do mês de outubro de 2018.

Ivo Lebrun

Maria Teresa Machini

Cristina Northfleet de Albuquerque

Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira

Fernanda Calheta Vieira Portaro
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 05/11/2018 e, portanto, o(a) aluno(a) foi jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Biotecnologia.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

butantan

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Possíveis alterações da sensibilidade dolorosa induzida pelo peptídeo FTR obtido da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*", protocolado sob o CEUA nº 7549010615, sob a responsabilidade de **Vanessa Rioli e equipe; Bruno Duzzi; Gisele Picolo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan do Instituto Butantan (CEUAIB) em reunião de 17/06/2015.

We certify that the proposal "Possible changes in pain sensitivity induced by FTR peptide obtained from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion.", utilizing 132 Heterogenic rats (132 males), protocol number CEUA 7549010615, under the responsibility of **Vanessa Rioli and team; Bruno Duzzi; Gisele Picolo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 06/17/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 08/2018

Laboratório: Leta

Procedência: Biotério Central

Especie: Ratos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 2 a 4 meses N: 132

Linhagem: Wistar

Peso: 170 a 190 g

Resumo: Os venenos animais são formados por uma mistura de toxinas de natureza polipeptídica com uma grande diversidade de ações biológicas. Essas moléculas evoluíram a partir de componentes constitutivos desses animais que passaram por um processo de evolução acelerada e foram selecionadas de acordo com as necessidades de sobrevivência de cada espécie. Alguns trabalhos mostram que essas moléculas encontradas e caracterizadas primeiramente em venenos animais, apresentam fortes similaridades estruturais e funcionais com as moléculas constitutivas das demais espécies animais, incluindo os mamíferos. Estes aspectos tornam os venenos animais interessantes fontes para a busca de novas moléculas com diferentes atividades biológicas. Em nossos estudos realizados no Mestrado sobre peptídeos isolados a partir da fração de baixa massa molecular do veneno do *T. serrulatus*, empregando-se as oligopeptidases EP 24.15 e EP 24.16, que são metaloproteases envolvidas em diversos processos fisiopatológicos como a percepção de dor, a homeostase cardiovascular e renal e degradação e geração de peptídeos intracelulares biologicamente ativos, conseguimos isolar três oligopeptídeos dentre eles o tripeptídeo FTR, que, em ensaios pilotos, apresentou ação antinociceptiva após a sua administração intraplantar em um processo hiperalgésico induzido pela carragenina. O mesmo foi capaz de exercer antinocicepção sem a presença do agente hiperalgésico, despertando nosso interesse de melhor entendimento deste mecanismo de ação.

São Paulo, 12 de agosto de 2015

Prof. Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise do potencial tóxico de proteases e peptídeos presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e do poder neutralizante dos antivenenos comerciais: Aprimorando o conhecimento do veneno e seu mecanismo de ação.", protocolada sob o CEUA nº 5396310517, sob a responsabilidade de **Fernanda Cv Portaro e equipe; Bruno Duzzi; Carla Cristina Squaiella Baptista; Daniela Cajado Carvalho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 21/06/2017.

We certify that the proposal "Toxic potential analysis of proteases and peptides present in scorpion *Tityus serrulatus* venom and the blockage capacity of commercial antivenoms: Enhancing the knowledge of venom and its mechanism of action.", utilizing 78 Isogenics mice (78 males), protocol number CEUA 5396310517, under the responsibility of **Fernanda Cv Portaro and team; Bruno Duzzi; Carla Cristina Squaiella Baptista; Daniela Cajado Carvalho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 06/21/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2016** a **02/2018**

Área: **Imunoquímica**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **78**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **20 a 22 g**

Resumo: Atualmente, os casos de envenenamentos por escorpiões envolvendo humanos são considerados um problema de saúde pública no Brasil, e os números desses acidentes superam os dados notificados com outros animais venenosos, como serpentes e aranhas. Os escorpiões do gênero *Tityus* são os responsáveis por tal situação e, dentre eles, o *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) é o mais importante. Isso porque o seu veneno apresenta alta toxicidade e, em associação ao seu modo reprodutivo (partenogênese) e sua boa adaptação aos centros urbanos, têm causado um número cada vez maior de acidentes com importância médica. Assim como os outros venenos animais, o veneno do *T. serrulatus* é uma mistura complexa de componentes que agem em diferentes alvos na presa/vítima, sendo os peptídeos que atuam sobre canais iônicos seus principais componentes. Apesar de muitas informações sobre essas toxinas, o mesmo não pode ser dito sobre os componentes proteolíticos e outros peptídeos presentes neste veneno. Nosso laboratório já obteve quatro publicações sobre a caracterização desses componentes, e a cada descoberta, novas perguntas surgem. Dois questionamentos são os que mais nos intrigam. O primeiro é sobre a falha de ação bloqueadora dos antivenenos comerciais (soros antiescorpiônico e antiaracnídico) sobre as atividades proteolíticas e, provavelmente, sobre as atividades dos peptídeos presentes no veneno *T. serrulatus*. E o segundo é sobre o papel destes componentes no envenenamento. O presente projeto também pretende expandir nossos estudos analisando os possíveis efeitos citotóxicos e pró- ou anti-inflamatórios dos peptídeos sintéticos e proteases purificadas a partir do veneno do escorpião amarelo. A obtenção de respostas para estas questões é a grande motivação para a elaboração do presente projeto de pesquisa.

Local do experimento: A eutanásia dos animais será realizada em câmara de CO₂ no próprio Biotério do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. Em seguida, os animais serão transportados, em caixa fechada, até o Laboratório de Imunoquímica, onde os experimentos serão realizados em ambiente estéril (fluxo laminar).

São Paulo, 28 de junho de 2017

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise do potencial hipotensor de peptídeos presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*", protocolada sob o CEUA nº 2402051017, sob a responsabilidade de **Fernanda Cv Portaro e equipe; Benedito Carlos Prezoto; Bruno Duzzi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 18/10/2017.

We certify that the proposal "Analysis of the hypotensive potential of peptides present in *Tityus serrulatus* scorpion venom.", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 2402051017, under the responsibility of **Fernanda Cv Portaro and team; Benedito Carlos Prezoto; Bruno Duzzi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 10/18/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **12/2017** a **12/2018**

Área: **Imunoquímica**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 meses**

N: **24**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **300 a 350 g**

Resumo: O escorpionismo vem conquistando cada vez mais seu espaço na mídia brasileira. Notícias informando sobre o aparecimento e, sobretudo, acidentes causados por escorpiões vêm aumentando dia após dia. Infelizmente, algumas destas notícias reportam casos fatais, sendo crianças a maioria das vítimas. Deste modo, a infestação de escorpiões, principalmente em centros urbanos, está se tornando um assunto recorrente e de grande importância para a Saúde Pública Nacional. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, os casos de escorpionismo vêm aumentando ano a ano. Em 2012, o número de casos reportados foi de aproximadamente 65 mil, em 2013 foi aproximadamente 80 mil e em 2014 já beirava 90 mil, onde aproximadamente 12.600 ocorreram no estado de São Paulo. Este alarmante número se reflete pela capacidade dos escorpiões em se adaptarem aos centros urbanos, lugares onde encontram alimento farto (insetos como grilos e baratas) e abrigo, principalmente em esgotos, terrenos baldios e entulhos. Além do mais, o escorpião *Tityus serrulatus* se reproduz por partenogênese, culminando em rápidas infestações geradas, principalmente, pela prole deste animal. O *T. serrulatus*, popularmente conhecido como escorpião amarelo, é considerado um dos escorpiões mais perigosos de importância médica do Brasil. Seu veneno é capaz de exercer uma variedade de efeitos em tecidos excitáveis por causa do seu papel no sistema nervoso periférico onde ele aumenta a liberação de neurotransmissores. As vítimas de escorpionismo apresentam os seguintes sintomas em quadros clínicos mais graves: febre, agitação psicomotora, salivação excessiva, arritmia cardíaca e respiratória, hipertensão arterial seguida de hipotensão, dentre outros, que se não tratados a tempo podem ter prognóstico letal. Os principais componentes da peçonha do *T. serrulatus* são neurotoxinas que interagem com canais iônicos (Na⁺ e K⁺). Porém, em meio às neurotoxinas, existe grande diversidade de peptídeos ainda não caracterizados e que possam ter importância nos casos patológicos envolvendo queda da pressão arterial. Peptídeos hipotensores já foram identificados anteriormente na peçonha, dentre eles a hipotensina I, capaz de potencializar a ação da bradicinina independentemente da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Entretanto, a ação de peptídeos sobre outras vasopectidases pode ter relevância nos casos de hipotensão apresentados. Uma dessas vasopectidases é a neprilisina (NEP), capaz de degradar hormônios natriuréticos envolvidos no controle da pressão arterial. Recentes resultados de nosso grupo demonstram a interação de peptídeos com essa enzima, podendo a inibição da mesma estar envolvida nos quadros de hipotensão apresentados. Assim, a necessidade de estudos envolvendo ação hipotensora de peptídeos da peçonha é de extrema relevância para melhorar o entendimento sobre os mecanismos envolvidos nos sintomas desencadeados pelos acidentados e com isso possivelmente melhorar o tratamento das vítimas. Além disso, merecem destaque os possíveis avanços biotecnológicos para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas que podem ser obtidos pela caracterização destes peptídeos ainda não descritos, visto que os venenos animais são considerados uma rica fonte de moléculas bioativas.

Local do experimento: Os procedimentos serão realizados no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 19 de outubro de 2017

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Aos meus pais, a quem devo tudo o que sou e que sempre me apoiaram em todas as minhas realizações.

Ao amor da minha vida, que sempre me ajudou e me apoiou me dando força e alegria nos momentos mais difíceis.

A todos os Mestres que sempre me ensinaram e muito colaboraram para minha formação.

A minhas avós Izabel e Horalia, por todo o amor dedicado a minha pessoa e que sempre estarão guiando meus passos.

A todos que me ajudaram, muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e seus mentores por sempre me guiarem em todos os passos da minha vida. Por colocarem em meu caminho lições importantes e pessoas preciosas, enfim, tudo aquilo que me fez ser quem sou hoje.

Agradeço a meu pai Walter, por tudo o que me ensinou sobre valores, bondade e amizade, por sempre me ajudar muito e me apoiar em todas as minhas decisões e formação, por todo o carinho. A minha mãe Oneide, por todo o seu exemplo, amor e dedicação, me mostrando o valor do trabalho em todas as minhas realizações, obrigado por tudo o que tem feito por mim. A minha irmã Bárbara, por todo o apoio, amor e carinho. Amo todos vocês! A Emilianne, meu grande amor, saiba que sem toda a sua ajuda nada disso seria possível! Obrigado por existir em minha vida, por me auxiliar em minhas caminhadas, por me amar, por tudo que me faz feliz. Amo-te muito! A minha tia Eliana, minha segunda mãe, que sempre me ajudou nos momentos mais difíceis. A meu padrinho Gerson (“Dunga”), que sempre me auxiliou em minha vida e que é um grande responsável por mais essa realização. Aos meus grandes amigos e irmãos: Eric, Douglas, Daniel e Carlos por todo apoio e ajuda durante todos estes anos de amizade! Incluo aqui meu amigo e aluno Rodrigo, o qual orientei e muito aprendi com essa oportunidade, agradeço pela força. As minhas avós Izabel e Horalia, por todo o amor e dedicação prestados em toda a minha vida. A toda minha família e Irmãos de fé, meu muito obrigado.

Obrigado a todos os meus Mestres, da “tia” Cláudia que me ensinou a ler, a todos aqueles que passaram por minha vida e colaboraram de alguma forma para minha formação. Muito obrigado a minha orientadora, Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro, pela oportunidade dada, ensinamentos e confiança, ajudando-me em todos os momentos difíceis durante toda esta caminhada. Muito obrigado por me ensinar que a Ciência vai além dos experimentos e resultados, possuindo sempre um lado humano envolvido juntamente com a responsabilidade de mudar vidas inteiras. A minha coorientadora, Dra. Vanessa Rioli, pelos ensinamentos e oportunidade de iniciar meus trabalhos no Instituto Butantan. Aos colaboradores, Dr. Leo Kei Iwai do LETA – Instituto Butantan, pela ajuda prestada na espectrometria de massas, a Dra. Gisele Picolo e sua aluna Dra. Louise Faggionato Kimura Vieira do LEDS – Instituto Butantan, por toda a ajuda e realização dos experimentos relacionados à nocicepção, a Dra. Carla Cristina Squaiella Baptista do Laboratório de Imunoquímica – Instituto Butantan, pela ajuda nos experimentos envolvendo a viabilidade celular e dosagem de citocinas em

macrófagos, ao Dr. Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira e Dr. Marcelo Yudi Icimoto do Departamento de Biofísica da UNIFESP, pelos experimentos relacionados a dicroísmo circular, ao Dr. Benedito Carlos Prezoto (“Benê”) por toda a dedicação e ajuda nos experimentos envolvendo a análise da alteração da pressão arterial média em ratos, ao Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone pelo auxílio e paciência durante nossos procedimentos, ambos do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan. A Dra. Ursula Castro de Oliveira e ao Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo do LETA, pela ajuda nas análises nos bancos de dados do transcriptoma das glândulas de veneno do *T. serrulatus*, aos alunos Thiago de Jesus Oliveira e Soraia Maria do Nascimento do LETA, por me ajudarem nos experimentos envolvendo o veneno recém coletado, por toda a dedicação e cuidados com os escorpiões. Ao CENTD – Instituto Butantan, pelo auxílio nas análises por espectrometria de massas.

Agradeço aos membros do “Gli Ferdinandi”, que além de ótimos e competentes companheiros de trabalho são grandes amigos, sempre juntos em muitas aventuras! Muito obrigado a Daniela Cajado, Alexandre Kuniyoshi, Roberto Kodama e Cristiane Castilho. Sem esta grandiosa equipe este trabalho nada seria.

Agradeço a todos do Laboratório de Imunoquímica, LETA e do CeTICS que sempre, de alguma forma, me ajudaram, tornando possível a realização dos experimentos e desta Tese, em especial aos meus amigos Mariana Morone (“Mari”), Ivan Novaski (“Polaco”), Ismael Feitosa (“Chatão”), Diego Dantas (“Cabra”) e Eduardo Kitano (“Japonês”) pelas risadas e assistência nas horas mais difíceis. A todos os alunos que sempre me apoiaram, o meu muito obrigado.

Agradeço as secretárias da Biotec, Fábiana e Eliane, por toda a ajuda e paciência durante todos estes anos.

Agradeço ao CNPq e a FAPESP (projetos: 2014/12976-5 e 2015/15364-3) pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA DE FOMENTO

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e por suporte financeiro do projeto de doutorado intitulado “Purificação e caracterização de peptídeos presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*”, processo nº 2014/12976-5, que possibilitou a realização deste trabalho.

“Sem a união nada faríamos, nada aprenderíamos e nada conseguiríamos, pois a Ciência solitária nunca seria capaz de realizar feitos inimagináveis”.

Bruno Duzzi

RESUMO

DUZZI, B. **Purificação e caracterização de peptídeos presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2018. 139 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A cada dia os relatos sobre acidentes por escorpiões vêm aumentando no Brasil, com frequentes casos fatais. Dentre os escorpiões que compõem a fauna brasileira temos o *Tityus serrulatus*, considerado o mais perigoso por conta de sua facilidade adaptativa em centros urbanos e das manifestações clínicas severas em vítimas acidentadas, como febre, agitação psicomotora, hipertensão arterial seguida de hipotensão e edema pulmonar agudo. Dentre os componentes da peçonha se destacam os peptídeos estruturados por ligações dissulfeto, que são abundantemente relatados na literatura e atuam em canais de Na^+ e K^+ . Ao contrário, os peptídeos lineares são pouco caracterizados. A partir desta premissa, nosso grupo identificou peptídeos lineares do veneno através de um *screening* empregando a enzima elastase. Esta enzima foi escolhida por estar envolvida em processos inflamatórios exacerbados, como em casos de edema pulmonar agudo, que é um dos principais sintomas do escorpionismo. Encontramos mais de 700 sequências peptídicas onde, através de um criterioso processo com o uso de bancos de dados de sequências depositadas e a literatura, selecionamos nove moléculas inéditas (TsP1 a TsP9) e duas já estudadas (hipotensinas I e II) para a síntese. Dentre estas moléculas, identificamos possíveis criptídeos advindos da Ts19 e moléculas com processamento diferenciado envolvendo a combinação de sequências peptídicas diferentes (peptídeos quiméricos), primeiramente relatadas e investigadas na peçonha do *T. serrulatus* neste trabalho. Além da elastase, utilizamos as enzimas de importância médica tripsina, ECA e NEP e os peptídeos sintéticos em nossos estudos, visando aumentar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no escorpionismo e, também, com base no potencial biotecnológico de moléculas capazes de exercerem modulações das atividades destas peptidases. Destacaram-se peptídeos que podem ter ação em processos inflamatórios, uma vez que foram capazes de aumentar a atividade da elastase e tripsina, com destaque para o TsP5, que também apresentou citotoxicidade intermediária. Alguns peptídeos aumentaram a atividade da ECA, sendo o peptídeo TsP2 capaz de potencializar a ação da bradicinina *in vivo*. A hipotensina I foi caracterizada como um inibidor não competitivo da NEP ($K_i = 4,35 \mu\text{M}$), podendo indicar a possível inibição desta metalopeptidase nos casos de hipotensão, onde a hipotensina I pode agir de forma sinérgica com o [des-Arg¹]-Proctolin ($K_i = 0,94 \mu\text{M}$ para a NEP), outro peptídeo linear do veneno caracterizado por nosso grupo. Os peptídeos não foram reconhecidos pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico produzidos pelo Instituto Butantan podendo indicar limitações na imunoterapia utilizada no tratamento das vítimas. Por fim, além dos novos peptídeos identificados, finalizamos a caracterização do FTR, um tripeptídeo que apresentou em nossos trabalhos anteriores propriedades antinociceptivas. No presente trabalho, demonstramos que este peptídeo é capaz de agir na via opioide, atuando em receptores delta de forma direta. Assim, com a identificação e caracterização destas moléculas conseguimos novos dados referentes a possíveis origens e processamento, ações tóxicas no envenenamento e potencial biotecnológico de alguns peptídeos lineares do *T. serrulatus*.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*. Escorpião amarelo. Componentes do veneno. Peptídeos. Elastase.

ABSTRACT

DUZZI, B. **Purification and characterization of peptides present in the *Tityus serrulatus* scorpion venom.** 2018. 139 p. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Reports of scorpion's accidents with humans are increasing in Brazil, with some of the cases resulting in death. Among the scorpions from the Brazilian fauna, *Tityus serrulatus* is considered the most dangerous species, due to its easy adaptation in urban centers, and because it brings severe clinical manifestations in the victims, such as fever, psychomotor agitation, arterial hypertension followed by hypotension and acute pulmonary edema. Among the venom components that stand out are the peptides structured by disulfide bonds, which are richly reported in the literature and act on Na⁺ and K⁺ channels. In contrast, linear peptides are poorly characterized. From this evidence, our group identified linear peptides of the venom using the serine protease elastase screening. This enzyme was chosen because it is involved in inflammatory processes, such as cases of acute pulmonary edema, one of the main symptoms of scorpionism caused by *T. serrulatus*. More than 700 peptide sequences were found and, through a careful process using protein databases and the literature, from these all, we selected nine novel (TsP1 to TsP9) and two already characterized (hypotensins I and II) sequences for synthesis. Among these molecules, we identified possible cryptides derived from Ts19 and others molecules, with different processing involving combination of different peptide sequences (chimeric peptides), which are here firstly reported and investigated in the venom of *T. serrulatus*. In addition to elastase, we tested other enzymes of medical importance - trypsin, ACE and NEP - with the synthetic peptides, aiming to increase the knowledge of molecular mechanisms involved in scorpionism and also based on the biotechnological potential of peptidase-modulator molecules. Peptides that may have an action in inflammatory processes were highlighted, since they were able to increase the activity of elastase and trypsin, especially the TsP5, which also showed intermediate cytotoxicity. Some peptides increased the ACE activity, with the peptide TsP2 capable of potentializing the action of bradykinin *in vivo*. Hypotensin I was characterized as a non-competitive inhibitor of NEP ($K_i = 4.35 \mu\text{M}$) and may indicate the possible inhibition of this metallopeptidase in cases of hypotension, where hypotensin I may act synergistically with [des-Arg¹] - Proctolin ($K_i = 0.94 \mu\text{M}$ for NEP), a linear peptide present in the venom already characterized by our group. The peptides were not recognized by the antiscorpion and antiarachnid sera produced by the Butantan Institute and may indicate limitations in the immunotherapy. Finally, in addition to the new identified peptides, we concluded the *in vivo* characterization of FTR, a tripeptide that presented antinociceptive properties in our previous studies. In the present work, we demonstrate that this peptide is able to act in the opioid pathway, acting directly on delta receptors. Thus, with the identification and characterization of these molecules we obtained new data regarding possible origins and processing, toxic actions in the envenomation and biotechnological potential of some linear peptides of *T. serrulatus* venom.

Keywords: *Tityus serrulatus*. Yellow scorpion. Venom components. Peptides. Elastase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A representatividade do escorpião na história humana	27
Figura 2 - Morfologia do escorpião	29
Figura 3 - Mapa com a distribuição geográfica das três principais espécies de escorpiões responsáveis pelos acidentes mais graves no Brasil: <i>T. serrulatus</i> , <i>T. bahiensis</i> e <i>T. stigmurus</i>	31
Figura 4 - O aumento do escorpionismo por triênio a partir de 2010 e número de acidentes por animais peçonhentos no Brasil em 2016	32
Figura 5 - Quadro contendo a classificação do acidente, manifestações clínicas, tratamento e número de ocorrências no ano de 2016	33
Figura 6 - Quadro com a classificação final dos acidentes por escorpião envolvendo óbito pelo agravo notificado no triênio de 2010 a 2016	34
Figura 7 - Representante da espécie <i>Tityus serrulatus</i> – escorpião amarelo	35
Figura 8 - Representantes da espécie <i>Tityus serrulatus</i> com filhotes	35
Figura 9 - Representação da estrutura terciária da elastase-1	42
Figura 10 - Representação da estrutura terciária da tripsina	43
Figura 11 - Representação da estrutura terciária da neprilisina	45
Figura 12 - Representação da estrutura terciária da enzima conversora de angiotensina I	46
Figura 13 - Perfil cromatográfico da fração de baixa massa molecular do veneno do <i>T. serrulatus</i>	63
Figura 14 - Perfis das recromatografias das frações F2, F3, F7 e F18	65
Figura 15 - Quadro representando a modulação da elastase pelas novas frações obtidas nas recromatografias	66
Figura 16 - Sequências dos inibidores de serino peptidases contendo os peptídeos LLP, LLPK e LLPKV	70
Figura 17 - Sequências da U1-aranetoxin-Av1a e da molécula presente no transcriptoma da glândula de peçonha do <i>T. serrulatus</i>	71
Figura 18 - Possíveis origens dos peptídeos quiméricos identificados no veneno do <i>T. serrulatus</i>	73
Figura 19 - Possíveis modulações e manifestações decorrentes da interação de peptídeos identificados na peçonha do <i>T. serrulatus</i> com enzimas de importância médica	75

Figura 20 - Quadro contendo o resultado dos testes cinéticos envolvendo as modulações das enzimas elastase-1, tripsina, ECA e NEP através da interação com os peptídeos sintéticos ...	76
Figura 21 - Cromatogramas das incubações dos peptídeos TsP5, Hipo1 e Hipo2 com a elastase-1	79
Figura 22 - Viabilidade celular, liberação de TNF e IL-6 utilizando os peptídeos TsP5 e as hipotensinas em cultura de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos naïve.....	81
Figura 23 - <i>Dot blot</i> dos peptídeos sintéticos identificados no VTs juntamente com os soros antiescorpiônico e antiaracnídico	83
Figura 24 - Cromatogramas das incubações dos peptídeos TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2 com a tripsina	85
Figura 25 - Potencialização da bradicinina pelo peptídeo TsP2.....	88
Figura 26 - Determinação do mecanismo de ação da hipotensina I em relação à NEP	90
Figura 27 - Espectros por dicroísmo circular das hipotensinas I e II	90
Figura 28 - Experimento sobre nocicepção envolvendo administração do peptídeo FTR por via oral	92
Figura 29 - Avaliação da participação da via opioide na ação do peptídeo FTR pela administração da naloxona	93
Figura 30 - Avaliação do receptor opioide envolvido na ação do peptídeo FTR pela administração de antagonistas seletivos	94
Figura 31 - Participação da Met-enkefalina no efeito analgésico do peptídeo FTR	95
Figura 32 - Cromatogramas comparativos dos perfis de baixa massa molecular do veneno empregado nos estudos iniciais e dos três diferentes lotes	97
Figura 33 - Espectro do peptídeo TsP2	98
Figura 34 - Diferentes peptídeos derivados do processamento da molécula kunitz-like	99
Figura 35 - Diferentes peptídeos derivados do processamento da molécula hipotensina-like	100
Figura 36 - Identificação de possíveis peptídeos quiméricos teoricamente originados de regiões das hipotensinas e da molécula kunitz-like	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de peptídeos com potencial biotecnológico identificados em venenos de algumas espécies de escorpiões	28
Tabela 2 - Principais neurotoxinas do <i>T. serrulatus</i> que atuam em canais de Na ⁺ e K ⁺	38
Tabela 3 - Principais peptídeos lineares já caracterizados do veneno do <i>T. serrulatus</i>	39
Tabela 4 - Incubações realizadas durante os testes de estabilidade.....	54
Tabela 5 - Diferentes sistemas de incubações realizados	61
Tabela 6 - Modulação da atividade catalítica da elastase pelas frações provenientes da etapa de HPLC	64
Tabela 7 – Possíveis criptídeos originados do processamento da Ts19	68
Tabela 8 - Lista com alguns dos peptídeos contendo as sequências de aminoácidos LLPK ou LLPKV presentes no VTs	72
Tabela 9 - Nomenclatura utilizada para a representação das sequências peptídicas sintéticas	74
Tabela 10 – Possíveis criptídeos da Ts19 e a modulação da ECA	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz – Radical fluorescente: ácido *orto*-aminobenzoico

Acn - Acetonitrila

ALC – “Average local confidence”

ANP - Peptídeo natriurético atrial

BCIP - “5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate”

BK - Bradicinina

BLAST - "Basic Local Alignment Search Tool "

BNP Peptídeo natriurético cerebral

BPP - "Bradykinin-Potentiating Peptides"

BSA - Albumina do soro bovino

CBA – “Cytometric bead array”

cDNA - DNA complementar

CENTD - Center of Excellence in New Target Discovery

CeTICS - Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CM-Celulose - carboximetilcelulose

CNP - Peptídeo natriurético do tipo C

DC - Dicroísmo circular

DL₅₀ - Dose letal média

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ECA - Enzima conversora de angiotensina I

EDDnp – Grupo apagador de fluorescência: M-(2,4 – dinitrofenil)-etilenodiamina

FRET - "Fluorescence resonance energy transfer"

FTMS - “Fourier transform-based mass spectrometers”

FTR – Nomenclatura referente ao tripeptídeo de sequência primária FTR

HCD – “High-energy collision dissociation”

Hipo1 - Hipotensina I - AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA

Hipo2 - Hipotensina II - AEIDFSGIPEDIKEIKETNAKPPA

HPLC - “High Performance Liquid Chromatography”

i.pl. - Intraplantar

i.v. - Intravenoso

IFN- γ - Interferon gama

IgG - Imunoglobulina G

IL-10 - Interleucina 10

IL-12p70 - Interleucina 12p70

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

kDa - Quilodalton

K_i - Constante de inibição de Michaelis-Menten

K_m - Constante de Michaelis-Menten

LC-MS/MS - “Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry”

LETA - Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP-1 - "Monocyte Chemoattractant Protein-1"

MMP2 - Metaloprotease de matriz do tipo 2

MS - Espectrometria de massas

MS/MS - Espectrometria de massa em tandem

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NBT - "Nitro blue tetrazolium"

NEP - Neprilisina

NO - Óxido nítrico

PAM - Pressão arterial média

PBST - Tampão fosfato com 0,05% Tween-20

pH - Potencial hidrogeniônico

RPMI - "Roswell Park Memorial Institute medium"

SAAr - Soro abtiaracnídico

SAEEs - Soro antiescorpiônico

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TFA - Ácido tricloroacético

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Tris - 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

TsP1 - KEILGKIKETNAKPPA

TsP2 - KETNAKPPALLPKV

TsP3 - GKGKEILGKIKE

TsP4 - KEILGKIKE

TsP5 - GKGKEILGKIKEKIEA

TsP6 - FTLLPK

TsP7 - LLPKVQLLAE

TsP8 - LLPKVDS

TsP9 - FLLPK

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

VAMPs - "Vesicle Associated Membrane Protein"

VTs - Peçonha / veneno do *T.serrulatus*

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Escorpiões e a história humana: do mito à ciência	26
1.2 Escorpiões – aspectos gerais	28
1.3 A peçonha dos escorpiões	30
1.4 Escorpionismo no Brasil	31
1.5 Escorpião amarelo – <i>Tityus serrulatus</i>	34
1.6 Componentes da peçonha do escorpião amarelo	36
1.7 Enzimas proteolíticas	40
1.7.1 <i>Serino peptidases</i>	40
1.7.1.1 Elastase	41
1.7.1.2 Tripsina	42
1.7.2 <i>Metalopeptidases</i>	44
1.7.2.1 Neprilisina (NEP)	44
1.7.2.2 Enzima conversora de angiotensina I (ECA)	45
2 OBJETIVOS	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Experimentos relacionados à identificação, seleção e síntese de peptídeos moduladores da elastase-1 presentes na fração de baixa massa molecular da peçonha do escorpião <i>T. serrulatus</i>	50
3.1.1 <i>Processamento do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> para a obtenção da fração de baixa massa molecular</i>	50
3.1.2 <i>Obtenção das frações peptídicas e screening por modulação da atividade enzimática da elastase-1</i>	50
3.1.3 <i>- Nova purificação por HPLC de frações moduladoras da atividade da elastase</i>	51
3.1.4 <i>- Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e identificação das sequências primárias dos peptídeos com ação modulatória sobre a elastase</i>	51
3.1.5 <i>Busca das sequências através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</i>	52
3.1.6 <i>Síntese dos peptídeos</i>	52
3.2 Experimentos relacionados à caracterização dos peptídeos sintéticos	53
3.2.1 <i>Testes cinéticos para a determinação de moduladores da atividade enzimática da elastase-1, tripsina, ECA e NEP</i>	53
3.2.2 <i>Testes cinéticos para a determinação de moduladores da atividade enzimática da elastase-2</i>	53
3.2.3 <i>Testes de estabilidade dos peptídeos</i>	54
3.2.4 <i>Análise dos possíveis efeitos citotóxicos e pró- ou anti-inflamatórios dos peptídeos sintéticos TsP5, Hipo1 e Hipo2</i>	54
3.2.4.1 <i>Obtenção das células do exsudato peritoneal</i>	54

3.2.4.2 Ensaio de viabilidade celular.....	55
3.2.4.3 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura.....	55
3.2.4.4 Análise estatística.....	55
3.3.5 <i>Dot blot</i>	56
3.2.6 <i>Determinação do mecanismo e constante de inibição (K_i) da hipotensina I em relação à NEP.</i>	56
3.2.7 <i>Dicroísmo circular</i>	57
3.2.8 <i>Injeção endovenosa do peptídeo TsP2 para avaliação da pressão arterial média e da possível potencialização da atividade hipotensora da bradiginina em ratos normotensos anestesiados</i>	57
3.2.9 <i>Experimentos com o peptídeo FTR em relação à ação antinociceptiva em ratos</i>	58
3.3 Experimentos relacionados aos peptídeos quiméricos	59
3.3.1 <i>Processamento e fracionamento de três diferentes lotes da peçonha</i>	59
3.3.2 <i>Análise por espectrometria de massas das frações originadas dos três lotes de veneno</i>	59
3.3.3 <i>Análise por HPLC das incubações visando à produção de peptídeos quiméricos</i>	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Identificação e síntese de peptídeos moduladores da elastase provenientes da fração de baixa massa molecular do veneno do escorpião <i>T. serrulatus</i>	62
4.2 Caracterizações dos peptídeos identificados na peçonha	75
4.2.1 <i>Modulação da elastase</i>	76
4.2.2 <i>Modulação da tripsina</i>	84
4.2.3 <i>Modulação da enzima conversora de angiotensina I</i>	86
4.2.4 <i>Modulação da neprilisina</i>	88
4.3 Avaliação da interação do peptídeo FTR com receptores opioides em ratos Wistar	91
4.4 Estudos sobre os peptídeos quiméricos	96
5 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A Lista com as sequências peptídicas obtidas das frações selecionadas e sequenciadas por espectrometria de massas	121
APÊNDICE B Espectros das sequências peptídicas selecionadas para síntese	128
APÊNDICE C Fluxograma com o delineamento experimental envolvendo os peptídeos sintéticos do VTs testados	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Escorpiões e a história humana: do mito à ciência.

Os escorpiões são organismos que há tempos intrigam os seres humanos. Registros históricos são encontrados em tumbas e monumentos de antigos povoados do Oriente e do Mediterrâneo. No Egito Antigo, o respeito e a admiração pela figura do escorpião são bem descritos, onde registros em papiro confirmam mitos, conselhos relacionados à sua peçonha e, ainda, cuidados para o tratamento dos acidentados. Neste mesmo país, o escorpião foi responsável por nomear uma dinastia de reis e de compor uma divindade do panteão egípcio, a deusa Serket, a qual é responsável pela guarda do corpo e das vísceras dos mortos em sua jornada para outra vida (EL-HENNAWY, 2011). Na Grécia antiga, o escorpião foi responsável pela nomeação de uma constelação a qual, segundo a lenda, surgiu a partir do confronto de um monstruoso escorpião com o lendário caçador Orion (BRAZIL; PORTO, 2010). Na cultura oriental está representado na fábula “O Escorpião e a Tartaruga”, onde o escorpião pede para tartaruga ajudá-lo a atravessar um rio, com a promessa de não picar a mesma durante a travessia. A tartaruga, disposta a ajudar, aceita a proposta e durante a travessia é picada pelo escorpião. Ao questionar o escorpião sobre esta ação fatal para ambos, ele responde que “a picada era inevitável”, pois fazia parte de sua natureza, assim como fazia parte da natureza da tartaruga ajudar. Deste modo, é um conto que remete a reflexão sobre a natureza de cada ser, sobretudo os seres humanos (COWAN, 1865). Portanto, a figura do escorpião acompanha a história humana desde seus primórdios (**Figura 1**), representada em cultos, lendas, filosofia e artes, visto que é um dos animais mais antigos do planeta Terra, datando desde o período carbonífero, há mais de 400 milhões de anos (BORTOLUZZI et al., 2007; CARDOSO, 2009).

Figura 1 - A representatividade do escorpião na história humana

(A) Representação da deusa Serket - pintura na parede da tumba da rainha Nefertari, esposa do faraó Ramsés II (adaptado de EL-HENNAWY, 2011). (B) Representação da constelação de escorpião (adaptado do Atlas de Alexander Jamieson, 1822). (C) Imagem representando o conto “O Escorpião e a Tartaruga” (ilustração adaptada de *Anvār-i Suhaylī* ou *Lights of Canopus*, exposto no Museu de Arte Walters, Maryland – EUA).

Apesar do medo que os escorpiões causam nos seres humanos, moléculas interessantes podem ser encontradas em sua peçonha e, por isso, têm despertado o interesse da comunidade científica. Os inúmeros estudos sobre a identificação de componentes das peçonhas de várias espécies de escorpiões mostram a diversidade de constituintes presentes com diversas atividades biológicas. Assim, neurotoxinas com efeito analgésico foram descritas, como por exemplo, a toxina BmK ou AngM1 isolada do veneno de *Buthus martensi* Karch que apresenta efeito antinociceptivo em camundongos (CAO et al., 2004). Outras patologias têm sido alvo de interesse na aplicação terapêutica dessas toxinas. A clorotoxina, inicialmente caracterizada como específica para canais de cloro, já passou por ensaio clínico fase I para controle/diagnóstico de tumor maligno cerebral, o glioma, e está sendo atualmente testada em ensaio clínico fase II (MAMELAK; JACOBY, 2007). Os autores descrevem uma potente inibição da MMP-2 (metaloprotease humana de matriz-2) pela clorotoxina e indicam que os canais de cloro não são o principal alvo desta molécula. Peçonhas de algumas espécies de escorpião são capazes de induzir apoptose em alguns tipos celulares. Estas moléculas peptídicas auxiliam tanto na compreensão do envenenamento quanto no desenvolvimento biotecnológico de possíveis novos fármacos e alguns exemplos são mostrados a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplo de peptídeos com potencial biotecnológico identificados em venenos de algumas espécies de escorpiões

Espécie	Peptídeo	Atividade	Autores
<i>Buthus martensi Karch</i>	BmK ou AngM1	Analgesia em camundongos	CAO et al., 2004
<i>T. serrulatus</i>	Ts10	Potenciação da bradicinina, inibição da ECA	FERREIRA et al., 1993
<i>T. serrulatus</i>	Ts14	Potenciação da bradicinina independentemente da inibição da ECA	VERANO-BRAGA et al., 2008
<i>T. serrulatus</i>	[des-Arg ¹]-Proctolin	Inibição da NEP humana	DUZZI et al., 2016
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	Clorotoxina	Controle/diagnóstico de tumor maligno cerebral	MAMELAK; JACOBY, 2007
<i>Buthus occictanus</i>	K12	Potenciação da bradicinina e inibição da ECA	MEKI et al., 1995
<i>Hadrurus aztecus</i>	Hadurin	Atividade antimicrobiana	TORRES-LARIOS et al., 2000
<i>Opisoph-talmus carinatus</i>	Opistoporim 1	Atividade antifúngica e imunomoduladora.	MOERMAN et al., 2002
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp1090	Atividade antiviral	YAN et al., 2011
<i>Mesobuthus eupeus</i>	Meucin-24 e Meucin-25	Atividade antimalárica	GAO et al., 2010
<i>Androctonus mauritanicus</i>	Mauriporin	Atividade antitumoral	ALMAAYTAH et al., 2013

1.2 Escorpiões – aspectos gerais

A ordem Scorpiones é representada por 2200 espécies conhecidas, podendo este número subir para 5000 ou mais em algumas décadas por conta das novas tecnologias empregadas para a identificação de novas espécies em lugares de difíceis acessos antes não explorados (revisado por LOURENZO, 2018). Estes animais vivem na maioria dos habitats terrestres, desde florestas tropicais até regiões mais áridas (BORTOLUZZI et al., 2007; CARDOSO, 2009).

Estudos taxonômicos demonstram a presença de 20 famílias e 165 gêneros de escorpiões, onde os mais perigosos e capazes de causar acidentes fatais em humanos pertencem à família Buthidae, sendo representada pelos gêneros *Androctonus* e *Leiurus* (África do Norte e Oriente Médio), *Centruroides* (México e Estados Unidos) e *Tityus* (América do Sul e Trinidad) (LOURENÇO et al., 2003).

Na morfologia do escorpião (**Figura 2**), o corpo é dividido em duas partes: cefalotórax ou prossoma e o abdome, o qual se segmenta em doze metâmeros. Os sete primeiros formam o mesossoma e os cinco restantes formam o metassoma ou cauda. Após o último segmento do metassoma vem o telson, onde se alojam duas glândulas de peçonha. O prossoma é recoberto dorsalmente pela placa prossomial que contém dois olhos medianos e geralmente de dois a cinco pares de olhos laterais. No prossoma se encontram quatro pares de pernas e, na parte

anterior, um par de pedipalpos e um par de quelíceras. Ventralmente no prossoma é encontrado um orifício genital e um par de pentes (apêndices exclusivos dos escorpiões). Nos esternitos do mesossoma são encontrados quatro pares de aberturas respiratórias (POLIS, 1990). Os escorpiões possuem um esqueleto externo quitinoso que reveste seu corpo. O exoesqueleto protege os órgãos internos e é a base de sustentação do corpo e de vários receptores sensitivos, espiráculos e outras estruturas de comunicação com o meio externo. Possuem internamente cinco sistemas fisiológicos: nervoso, circulatório, respiratório, reprodutivo e digestivo (POLIS, 1990).

Figura 2 - Morfologia do escorpião

Adaptado de POLIS, 1990. Vista dorsal do escorpião *Hottentotta hottentotta*. As regiões em destaque são: Prossoma (em vermelho), Mesossoma (em amarelo), Metassoma (em azul) e Telson (em verde).

Os escorpiões são animais de hábitos noturnos e carnívoros, que se alimentam de insetos, em sua maioria, grilos e baratas (FUNASA, 1998). As espécies consideradas generalistas, ou seja, que não necessitam de um ambiente específico para sobreviverem, muitas vezes são encontradas em ambientes modificados pelo homem e geralmente são responsáveis pelos acidentes ocorridos. As espécies especialistas, em sua maioria, apresentam uma única prole e não realizam estocagem de esperma, sendo a capacidade de crescimento de sua população fraca, com baixas densidades e capacidade de dispersão. Já as espécies generalistas, como a *Tityus*, possuem períodos embrionários e pós-embrionários curtos, assim como uma vida mais longa, se comportando de maneira contrária as especialistas, principalmente no que se diz respeito à distribuição e dispersão populacional, representando mais um fator de risco relacionado aos acidentes (LOURENÇO et al., 2003).

1.3 A peçonha dos escorpiões

Peçonhas são misturas de substâncias tóxicas, produzidas em um grupo de células especializadas, órgãos secretórios ou glândulas conectadas ao dispositivo de injeção (FREITAS, 1991). São compostas de uma mistura complexa de componentes de origem apócrina, produzida por um par de glândulas exócrinas altamente especializadas (YAMAJI et al., 2004). Dentre os componentes podemos citar enzimas, lipídeos, nucleotídeos, aminas biogênicas, peptídeos e vários outros compostos ainda não identificados (BATISTA et al., 2004).

Diversos trabalhos estudam os efeitos farmacológicos das toxinas derivadas da peçonha de diferentes espécies de escorpiões com ações sobre canais de sódio (Na^+) e potássio (K^+), além de canais de cálcio (Ca^{2+}) e cloro (Cl^-). Os canais iônicos estão presentes em diferentes tipos celulares como neurônios, células musculares e células do sistema imune, sendo essenciais para a manutenção do equilíbrio eletrolítico do organismo. Eles são responsáveis por sinais elétricos para geração e condução do potencial de ação, necessários para condução do impulso nervoso, batimentos cardíacos, secreção hormonal, função renal e na ativação de células do sistema imune, além de participarem das vias de ativação intracelular dependentes de cálcio (CATTERALL et al., 2007). Assim, alguns efeitos causados pela peçonha de escorpião sobre o sistema nervoso central e coração, podem estar relacionados com as toxinas que atuam sobre estes canais.

Apesar do grande foco de estudos serem as neurotoxinas de canais, a importância da caracterização de outros componentes da peçonha dos escorpiões, sobretudo os peptídeos,

para o desenvolvimento de novos fármacos é tema abordado em algumas revisões (HMED et al., 2013; GHOSH et al., 2018). Portanto, o estudo de venenos dos escorpiões da fauna brasileira com esta finalidade possui grande potencial para o desenvolvimento biotecnológico através da bioprospecção de novas moléculas.

1.4 Escorpionismo no Brasil

O escorpionismo é o termo utilizado para os acidentes envolvendo os escorpiões e os seres humanos (LIRA-DA-SILVA et al., 2009). Os escorpiões mais perigosos do Brasil pertencem ao gênero *Tityus*. Embora quase 30 espécies deste gênero ocorram em nosso país, os principais causadores de acidentes graves são: *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus* (FUNASA, 1998). A **Figura 3** mostra a distribuição geográfica dos escorpiões de importância médica do Brasil.

Figura 3 - Mapa com a distribuição geográfica das três principais espécies de escorpiões responsáveis pelos acidentes mais graves no Brasil: *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*

Adaptado de Marcussi et al. (2011). É possível notar que as espécies que mais assolam a Região Sudeste do país são as representadas pelo *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. A espécie *T. stigmurus* é responsável pela maioria dos acidentes graves na Região Nordeste.

Os acidentes vêm se consolidando como um problema de saúde pública no país. Segundo dados do DATASUS (2018)¹, antigo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), os acidentes causados por escorpiões vêm aumentando ano a ano (**Figura 4 A**), sendo reportados como a maioria dos casos de envenenamento por animais, superando os números de acidentes causados por serpentes e aranhas somados (**Figura 4 B**). O escorpionismo representou mais de 90 mil casos dentre aproximadamente 169 mil episódios totais envolvendo animais peçonhentos em 2016, alertando sobre o crescimento das infestações, principalmente em centros urbanos (DATASUS, 2018; MARCUSSI et al., 2011).

Figura 4 - O aumento do escorpionismo por triênio a partir de 2010 e número de acidentes por animais peçonhentos no Brasil em 2016

Dados disponíveis em DATASUS (2018). **(A)** Número de acidentes causados por escorpiões nos anos de 2010, 2013 e 2016. É importante notar o aumento do número de casos, partindo de aproximadamente 50 mil em 2010 e chegando a mais de 90 mil no ano de 2016. **(B)** Acidentes por animais peçonhentos reportados em 2016. Nota-se que o número de acidentes causados por escorpiões é o maior no país, ultrapassando o número de acidentes por aranhas e serpentes somados. Estes dados refletem a importância do tema escorpionismo na saúde pública do Brasil.

¹ DATASUS (2018), disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def;access>

Em relação ao quadro clínico dos acidentados, a ação pode ser dividida em local ou sistêmica e a classificação do acidente em leve, moderado ou grave (CUPO et al., 1994).

Em quadros de ação local, os pacientes relatam dor, que pode ser discreta ou insuportável, podendo irradiar-se para todo o membro atingido e persistir por várias horas ou dias. O local da picada pode ser identificado com dificuldade, podendo se observar edema leve, hiperemia, acompanhado ou não de sudorese ou piloereção local. Em quadros de manifestações sistêmicas ocorrem: alterações gastrintestinais, respiratórias, cardiocirculatórias e neurológicas (CUPO et al., 1994, CUPO, 2015). Os procedimentos relacionados ao tratamento são determinados através do quadro e sintomas apresentados pelas vítimas (**Figura 5**).

Figura 5 - Quadro contendo a classificação do acidente, manifestações clínicas, tratamento e número de ocorrências no ano de 2016

Classificação do acidente	Manifestações Clínicas	Tratamento	Ocorrência (casos em 2016)
Leve	Dor e parestesia locais	Alívio da dor por infiltração de lidocaína a 2% sem vasoconstritor no local da picada ou uso de dipirona na dose de 10 mg/kg de peso a cada seis horas.	80.045
Moderado	Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, como náuseas, vômitos, sudorese, agitação, taquipnéia e taquicardia.	SAEEs*/SAAr** – 2 a 3 ampolas endovenosas.	6.472
Grave	Todas as manifestações moderadas mais a presença de ao menos uma das seguintes manifestações: vômitos profusos, sudorese profusa, sialorréia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque.	SAEEs*/SAAr** – 4 a 6 ampolas endovenosas.	940

Adaptado de FUNASA (1998) e DATASUS (2018). A maioria dos casos apresentados é classificada como leve. A determinação da classificação implica no procedimento empregado para o tratamento. Existe a possibilidade de piora nos quadros clínicos, onde casos leves podem progredir para moderados e que podem progredir para graves. O tempo de observação médio em casos leves para as crianças gira em torno de 6 a 12 horas. * SAEES soro antiescorpiônico; ** SAAr soro antiaracnídeo.

Em sua maioria, os casos se classificam como leves, contando com um número considerável de casos graves, que podem ter como prognóstico o óbito, destacando-se as crianças com idades entre 0 a 14 anos (**Figura 6**).

Figura 6 - Quadro com a classificação final dos acidentes por escorpião envolvendo óbito pelo agravo notificado no triênio de 2010 a 2016

Ano	Número de mortes por faixa etária				
	0-14 anos	15-39 anos	40-64 anos	65-80+ anos	Totais
2010	37	19	5	2	63
2013	35	18	9	6	68
2016	49	32	31	9	121

Dados obtidos em DATASUS (2018). O número de óbitos por escorpionismo vem aumentando, sendo as crianças as mais afetadas, onde em 2010 e 2013 representaram mais de 50% dos casos.

1.5 Escorpião amarelo – *Tityus serrulatus*

O escorpião *T. serrulatus*, popularmente conhecido como “escorpião amarelo”, está principalmente distribuído entre os estados da Bahia, Goiás (incluindo o Distrito Federal), Paraná, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (MARCUSSE et al., 2011).

A maioria dos acidentes por escorpiões no Brasil está relacionada ao *T. serrulatus* e são citadas como as ocorrências mais graves por conta de manifestações clínicas severas apresentadas pelas vítimas (BUCARETCHI et al., 1995; FUNASA, 1998).

Até a presente data, segundo o PubMed, mais de 350 trabalhos foram publicados sobre o escorpião amarelo, sendo datado como o mais antigo um artigo de 1953, onde o pesquisador do Instituto Butantan observou os efeitos do envenenamento em camundongos (BUCHERL, 1953). Esta espécie foi inicialmente descrita por Adolpho Lutz e Osvaldo Mello de Campos em 1922 (CAMPOS, 1924). É um aracnídeo de hábitos noturnos, carnívoro, que se alimenta principalmente de insetos, como grilos e baratas, possuindo a denominação *serrulatus* por conta de uma serrilha dorsal localizada em sua falsa cauda (**Figura 7**). Não são agressivos e chegam a medir sete centímetros, vivendo em média quatro anos (WILLIAMS, 1987; FUNASA, 1998; MARCUSSE et al., 2011).

Figura 7 - Representante da espécie *Tityus serrulatus* – escorpião amarelo

Indivíduo adulto da espécie *T. serrulatus*. Em destaque as serrilhas presentes em sua falsa cauda, responsável pela denominação “*serrulatus*” e sua coloração predominantemente amarela, responsável pela sua denominação popular “escorpião amarelo”. Foto: Thiago de Jesus Oliveira, Bruno Duzzi e Daniela Cajado-Carvalho.

O *T. serrulatus* se reproduz por partenogênese (**Figura 8**), podendo cada fêmea gerar cerca de 70 filhotes durante sua vida, e, por isso, apresenta vantagens em relação à adaptação em centros urbanos, sendo comumente encontrados em cemitérios, esgotos, terrenos baldios e casas, geralmente pelo acúmulo de lixo e entulhos, onde encontram abrigo seguro e fartura de alimentos (MATTHIENSEN, 1971; FUNASA, 1998, MARCUSSI et al., 2011). Mesmo assim, relatos de indivíduos machos já foram feitos na literatura, ocorrendo em extrema minoria, nos estados de Minas Gerais e Bahia (DOS SANTOS et al., 2014).

Figura 8 - Representantes da espécie *Tityus serrulatus* com filhotes

Escorpiões da espécie *T. serrulatus*. (**A e B**) Escorpiões transportando sua prole na região do tronco. É possível notar que apenas um escorpião pode dar origem a muitos filhotes. Foto: Thiago de Jesus Oliveira, Bruno Duzzi e Daniela Cajado-Carvalho.

A peçonha do *T. serrulatus* (VTs) é capaz de exercer uma variedade de efeitos em tecidos excitáveis por causa do seu papel no sistema nervoso periférico onde ela aumenta a liberação de neurotransmissores (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989).

Alguns dos sintomas apresentados por vítimas de envenenamento são: febre, agitação psicomotora, salivação excessiva, lacrimação, aumento da motilidade gastrointestinal, arritmias cardíaca e respiratória, hipertensão arterial seguida de hipotensão, insuficiência cardíaca e choque. A capacidade das toxinas presentes na peçonha de agir em canais de sódio e de potássio em terminações nervosas pode explicar, em partes, essas manifestações (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989). Nos casos de envenenamento por *T. serrulatus*, a complicação clínica que mais se destaca é o edema pulmonar agudo, responsável pela maioria dos casos de óbitos, principalmente infantis. A origem desta patologia é muito complexa e atua, principalmente, através de dois mecanismos: os cardiogênicos e os não cardiogênicos (SILVA et al., 2005). Dentre os fatores cardiogênicos, temos a hipertensão arterial, o aumento do retorno venoso e insuficiência do miocárdio (AMARAL et al., 1993). Os mecanismos não cardiogênicos são consequência da liberação de substâncias vasoativas que podem levar ao aumento da permeabilidade vascular (DE MATOS et al., 1997). Estudos realizados em ratos demonstraram que a peçonha de *T. serrulatus* tem como órgão alvo o pulmão, onde grandes concentrações de toxinas foram encontradas após 15 e 30 minutos de inoculação (aproximadamente 160 µg de peçonha por mg de tecido). Esta concentração superou a encontrada em outros órgãos como baço, coração e fígado (REVELO et al., 1996).

1.6 Componentes da peçonha do escorpião amarelo

Estudos pioneiros para o isolamento de componentes da peçonha do escorpião amarelo datam do fim da década de 60 a meados da década de 70, empregando técnicas simples de extração da peçonha, juntamente com filtração em gel e cromatografia em CM-Celulose (GOMES; DINIZ, 1966; TOLEDO; NEVES, 1976; POSSANI et al., 1977). Nos anos 80, mais toxinas foram identificadas empregando procedimentos experimentais semelhantes (POSSANI et al., 1981; POSSANI; MARTIN; SVENDSEN, 1982; SAMPAIO; LAURE; GIGLIO, 1983; POSSANI et al., 1985; ARANTES et al., 1989) e nos últimos anos vários componentes foram descritos através de técnicas de cromatografia em fase reversa por HPLC em coluna C-18, espectrometria de massas e análises transcriptômicas (PIMENTA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2006; RATES et al., 2008; MARCUSSI et al., 2011;

ALVARENGA et al., 2012; VERANO-BRAGA et al., 2013; ROCHA-RESENDE et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018).

De forma geral, a peçonha do *T. serrulatus* é composta por muco, sais inorgânicos, lipídeos, aminas, nucleotídeos, enzimas, inibidores de calicreína, peptídeos natriuréticos, proteínas de alta massa molecular, peptídeos, aminoácidos e neurotoxinas (revisado por PUCCA et al., 2015a). Estudos atuais efetuados por De Oliveira e colaboradores (2018), envolvendo o transcriptoma das glândulas de peçonha, demonstraram que mais de 30% do VTs é composta por enzimas e, aproximadamente 40%, por peptídeos.

Em relação aos componentes enzimáticos, a primeira peptidase isolada da peçonha foi a antarease, uma metaloprotease associada aos possíveis casos de pancreatite decorrentes do escorpionismo, sendo capaz de clivar *in vitro* proteínas conhecidas como VAMPs, que participam da exocitoses de vesículas no pâncreas (FLETCHER et al., 2010). Indo além, especulou-se que a antarease teria papel endógeno nas modificações pós-traducionais de peptídeos da peçonha (VERANO-BRAGA et al., 2013). Após, Carmo e colaboradores (2014) demonstraram a presença de mais enzimas pertencentes à classe das metalopeptidases no transcriptoma das glândulas através de análises por similaridade das sequências. Estas enzimas foram classificadas como *metalloserulases* (enumeradas de 1 a 10), podendo ter funções endógenas na própria glândula, relacionadas às modificações pós traducionais de toxinas, ou ainda ação direta no envenenamento. Destas *metalloserulases* descritas, nosso grupo purificou as *metalloserulases* 3 e 4, que são capazes de clivar neuropeptídeos humanos *in vitro*, como os peptídeos da família do neuropeptídeo Y e dinorfina 1-13 (CAJADO-CARVALHO et al., 2018, no prelo). Ainda sobre a composição enzimática, nosso grupo purificou e caracterizou uma enzima conversora de angiotensina símile (ECA-símile), que pode ter papel nos sintomas de hipertensão apresentados pelas vítimas em acidentes graves (CAJADO-CARVALHO et al., 2016). Por fim, a presença de hialuronidases, enzimas capazes de degradarem o ácido hialurônico encontrado na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos frouxos, também já foi descrita. Estas enzimas facilitam a difusão de toxinas através dos tecidos, potencializando a toxicidade de outros componentes da peçonha (POSSANI et al., 1977; MARCUSSI et al., 2011).

Como visto acima, além das enzimas, os componentes mais abundantes da peçonha são os peptídeos. Os componentes peptídicos podem ser classificados como estruturados, que são estabilizados por ligações dissulfeto, ou lineares (PUCCA et al., 2015a). Os componentes denominados estruturados são os mais estudados, classificados como neurotoxinas que interagem com canais iônicos (Na^+ e K^+) e relacionados aos efeitos mais graves provocados

pela peçonha (COLOGNA et al., 2009; PUCCA et al., 2015a). Na **Tabela 2** estão descritas as principais neurotoxinas da peçonha do *T. serrulatus*.

Tabela 2 - Principais neurotoxinas do *T. serrulatus* que atuam em canais de Na⁺ e K⁺

Toxina	Canal	Descrição	Autores
Ts1	Na ⁺	Liberção de catecolaminas e aumento da pressão arterial. Indução da ativação de macrófagos e produção de mediadores da resposta imune	VASCONCELOS et al., 2005 ZOCCAL et al., 2011
Ts2	Na ⁺	Inflamação por mecanismo dependente de lipídeos e produção de citocinas	ZOCCAL et al., 2013
Ts3	Na ⁺	Liberção de vários mediadores como catecolaminas e acetilcolina	CLEMENTE et al., 2002
Ts4	Na ⁺	Rações alérgicas, lacrimação e espasmos nas patas traseiras de camundongos. Afeta canais Nav1.6	MARANGONI et al., 1990; SAMPAIO et al., 1996 PUCCA et al., 2015c
Ts5	Na ⁺	α -toxina onde os prováveis mediadores responsáveis pela hipertensão são as catecolaminas, conduzidas pelas alterações nos canais para Na ⁺ . Inibe os canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7. Ação pró-inflamatória sobre macrófagos	ARANTES et al., 1994; GONÇALVES et al., 2003 PUCCA et al., 2015b
Ts6	K ⁺	Atividade pró-inflamatória, imunodepressora e bloqueio de canais Kv 1.3	ZOCCAL et al., 2013 PUCCA et al., 2016a
Ts7	K ⁺	Capaz de bloquear, com elevada afinidade, mas sem seletividade, canais para K ⁺ em células de fibroblastos transformadas para Kv1.2. Afinidade por canais Kv1.3	WERKMAN et al., 1993 CERNI et al., 2014
Ts8	K ⁺	Capaz de bloquear seletivamente canais para K ⁺ não inativantes dependentes de voltagem de sinaptossomas de cérebro de ratos. Bloqueio de Kv4.2 e indução de nocicepção	ROGOWSKI et al., 1994 PUCCA et al., 2016b
Ts9	K ⁺	Potente ligante de canais para K ⁺ ativados por cálcio de baixa condutância e sensível a apamina	LEGROS et al., 1996
Ts11	K ⁺	Identificada através de biblioteca de cDNA. Similaridade com toxinas para canal de K ⁺	PIMENTA et al., 2003
Ts12	K ⁺	Identificada através de biblioteca de cDNA. Similaridade com toxinas para canal de K ⁺	PIMENTA et al., 2003
Ts13	K ⁺	Identificada através de biblioteca de cDNA. Similaridade com toxinas para canal de K ⁺	PIMENTA et al., 2003
Ts15	K ⁺	Bloqueia seletivamente os subcanais Kv1.2 e Kv 1.3. Atividade imunodepressora	COLOGNA et al., 2011 PUCCA et al., 2016a
Ts16	K ⁺	Identificada no transcriptoma. Similaridade com toxinas para canal de K ⁺	ALVARENGA et al., 2012
Ts17	Na ⁺	Identificada no transcriptoma. Similaridade com toxinas para canal de Na ⁺	ALVARENGA et al., 2012
Ts18	Na ⁺	Identificada no transcriptoma. Similaridade com toxinas para canal de Na ⁺	ALVARENGA et al., 2012
Ts19	K ⁺	Identificada no transcriptoma. Similaridade com toxinas para canal de K ⁺	ALVARENGA et al., 2012
Ts19 Frag-I	K ⁺	Ação pró-inflamatória, induz liberaçã de IL-6. Similaridade com toxinas para canal de K ⁺	LIMA et al., 2015
Ts19 Frag-II	K ⁺	Bloqueio específico para canal Kv1.2	CERNI et al., 2016

Além das enzimas e neurotoxinas descritas acima, temos os peptídeos lineares como constituintes da peçonha. Estes peptídeos, apesar de encontrados com certa abundância, ainda são pouco caracterizados. A análise peptidômica realizada por Rates et al. (2008) demonstra a

existência de uma grande diversidade de peptídeos ainda não caracterizados no VTs. Muitos não puderam ser encontrados em banco de dados, uma vez que estas informações são raras, necessitando desta forma de um sequenciamento *de novo*. Dentre as moléculas descritas neste peptidoma estão componentes considerados como “não tóxicos”, denominados como fragmentos peptídicos tipo PAPE, por possuírem sequência em “*tandem*” de resíduos de prolina (P), ácido glutâmico (E) e alanina (A). Outros estudos empregando técnicas “ômicas” estão demonstrando a complexidade da peçonha em relação aos peptídeos lineares oriundos do processamento de proteínas maiores, gerando listas com centenas de fragmentos (NASCIMENTO et al., 2006, VERANO-BRAGA et al., 2013; ROCHA-RESENDE et al., 2017). Na **Tabela 3** estão descritos os peptídeos lineares caracterizados da peçonha do *T. serrulatus*.

Tabela 3 - Principais peptídeos lineares já caracterizados do veneno do *T. serrulatus*

Peptídeo	Descrição	Autores
Ts10	Potenciação da bradicinina, inibição da ECA	FERREIRA et al., 1993
Ts14	Potenciação da bradicinina independentemente da inibição da ECA	VERANO-BRAGA et al., 2008
KEILG	Inibidor não competitivo da timet oligopeptidase. Aumento no rolamento de leucócitos na microcirculação de camundongos	CARVALHO et al., 2012 DUZZI, 2014
FTR*	Ação antinociceptiva em ratos	DUZZI, 2014
[des-Arg ¹]-Proctolin*	Inibição da NEP humana	DUZZI et al., 2016
RLRSKGKK	Aumento de IL-6 em macrófagos. Inibição da ECA	PUCCA et al., 2016c
RLRSKG	Aumento de IL-6 em macrófagos. Inibição da ECA	PUCCA et al., 2016c
KIWSR	Aumento de IL-6 em macrófagos. Inibição da ECA	PUCCA et al., 2016c

* Peptídeos estudados no presente trabalho

Estas informações demonstram que muitos estudos deverão ser realizados para a identificação de novos peptídeos lineares, principalmente lineares, que apresentem atividade biológica, uma vez que uma grande quantidade destas moléculas ainda não caracterizadas compõe a peçonha do escorpião amarelo.

Assim, o estudo de componentes da peçonha do *T. serrulatus* vem acumulando dados científicos importantes e, por isso, nosso trabalho teve como ponto de partida o estudo de peptídeos do VTs que pudessem interagir com peptidases de importância médica que, quando moduladas em oposto sentido à homeostase, podem estar relacionadas a sintomas graves apresentados nos quadros de envenenamento. Estas peptidases serão apresentadas no tópico a seguir.

1.7 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas desempenham um papel importante no ciclo de vida dos organismos vivos. Em mamíferos essas enzimas participam do processamento e da organização molecular das cadeias polipeptídicas nascentes, dos processamentos de precursores de hormônios proteicos, receptores e fatores de crescimento, ativação de enzimas envolvidas em processos de cascatas proteolíticas, como na coagulação sanguínea, na fibrinólise, nas reações do sistema complemento e na geração de peptídeos bioativos. Participam também de processos de morte celular programada, migração e adesão celular, invasão de microrganismos, entre outros (NEURATH, 1999). Em virtude da ampla diversidade de enzimas conhecidas, as peptidases foram agrupadas com base no mecanismo catalítico e em suas estruturas primárias e terciárias (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). A seguir, serão apresentados maiores detalhes das serino e das metalopeptidases, sendo estas classes alvos de nossos estudos.

1.7.1 *Serino peptidases*

São enzimas cujo mecanismo catalítico depende de um resíduo de serina agindo como o nucleófilo para hidrolisar a ligação peptídica. São amplamente distribuídas e extremamente numerosas, estando presentes em bactérias, arqueobactérias, eucariotos, bacteriófagos e vírus. Esta diversidade é demonstrada pelo fato de que cerca de um terço de todas as peptidases conhecidas são classificadas como serino peptidases (HEDSTROM, 2002). Esta classe pode ser exemplificada pela tripsina pancreática, elastase e calicreína plasmática, que apresentam uma tríade catalítica composta pelos resíduos Asp102, His57, Ser195 (numeração da quimotripsina).

No âmbito fisiológico, as serino peptidases podem atuar em processos como a coagulação sanguínea, processos inflamatórios, fibrinólise e proliferação celular (POWERS et al., 2002). Assim, estas peptidases apresentam diversificação quanto suas funções e mecanismos de ações. As serino peptidases têm sua especificidade relacionada com o tipo de substrato em que atuam, podendo ser tanto endopeptidases como exopeptidases (HEADSTROM, 2002).

1.7.1.1 Elastase

Desde a primeira publicação sobre a existência de “leucopeptidases”, a constatação de sua importância durante o processo inflamatório promoveu maior interesse da comunidade científica para o estudo da ação desses grânulos secretados por células leucocitárias (JANOFF, 1985; WIEDOW; MEYER-HOFFERT, 2005). Dentre elas, a elastase é destaque, pois, dentre outras atividades, é capaz de causar grande dano tecidual durante processos inflamatórios (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997).

A elastase-2 (EC 3.4.21.37) foi identificada em 1968 nos grânulos de leucócitos. Está presente, em sua maioria, em neutrófilos polimorfonucleares. Possui 218 resíduos de aminoácidos, tendo melhor atividade entre os pHs 8 e 8,5 (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Segundo Janoff (1985), tem como substrato principal a elastina, componentes de matriz (colágeno III e IV e fibronectina) e proteínas plasmáticas (fibrinogênio e proteínas do sistema complemento). Quimicamente é um polipeptídeo de cadeia única de propriedade básica. Sua síntese primária ocorre em pró-leucócitos sendo estocada em Grânulos Azurófilos (BLOW, 1977).

Esta enzima está relacionada às patologias como neutropenia hereditária e doenças inflamatórias, tendo como principais funções biológicas a degradação de proteínas da matriz extracelular, clivagem de mediadores inflamatórios, clivagem de receptores, clivagem de proteínas do líquido surfactante dos pulmões, indução de citocinas e quimiocinas, indução de secreção de glândulas submucosas das vias aéreas e propriedades bactericidas (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

A atividade excessiva da elastase pode estar associada com patologias como, por exemplo, a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), a qual se caracteriza por atividade inflamatória intensa devido à degradação de componentes da matriz extracelular, resultando em uma obstrução do fluxo aéreo. Esta enzima também tem participação no dano pulmonar agudo, síndrome da insuficiência respiratória aguda, fibrose cística, artrite reumatoide e a psoríase (JANOFF, 1985; LAGENTE et al., 2005; KORKMAZ et al., 2010).

A elastase-1 (EC 3.4.21.36) (**Figura 9**), também conhecida como elastase pancreática, possui atividade descrita há mais de um século, sendo esta enzima primeiramente purificada de pâncreas porcino por Shotton em 1970 (SHOTTON, 1970; RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Possui 240 aminoácidos em sua estrutura, sendo estabilizada por quatro ligações dissulfeto. Tem como propriedade degradar a elastina, proteína estrutural presente na pele, ligamentos, artérias e pulmões (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

Figura 9 - Representação da estrutura terciária da elastase-1

Representação obtida pelo *software* PyMOL. Em destaque (vermelho) a tríade catalítica Asp, His e Ser que compõem o sítio ativo (PDB ID: 3UOU).

Nosso *screening* inicial foi focado na enzima elastase, tendo como motivação os quadros fatais de edema pulmonar, uma manifestação clínica muito estudada, mas que ainda requer mais explicações para sua manifestação e consequente melhoria do tratamento (PUCCA et al., 2015a). Além disto, moduladores destas enzimas são considerados moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos (HMED et al., 2013).

1.7.1.2 Tripsina

A tripsina foi primeiramente descrita em 1876 como uma molécula presente na secreção pancreática. Até hoje é uma das enzimas mais estudadas, sendo empregada em diversas técnicas laboratoriais (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

Classificada como EC 3.4.21.4, é uma peptidase que cliva substratos após resíduos básicos (Arg e Lys), apresentando melhor atividade catalítica em pH 8,0. É estável por um longo período de tempo como pó liofilizado ou em solução com pH 3,0 (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

A estrutura tridimensional da tripsina foi revelada em 1974 (**Figura 10**), sendo considerada semelhante para seres eucariotos e procariotos (STROUD; KAY; DICKERSON, 1974, RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Está presente em muitos animais e em menor nível

em micróbios, como nas bactérias do gênero *Streptomyces* e no fungo *Fusarium oxysporum* (DELBAERE et al., 1975; READ; JAMES, 1988; RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

Figura 10 - Representação da estrutura terciária da tripsina

Representação obtida pelo *software* PyMOL. Em destaque (vermelho) a tríade catalítica Asp, His e Ser que compõem o sítio ativo (PDB ID: 1F0T).

Apresenta-se como uma das diversas enzimas digestivas secretada no intestino dos animais. É sintetizada em grânulos secretores de células acinares em sua forma inativa, denominada tripsinogênio. Uma vez ativada, é responsável pela ativação de zimógenos de outras enzimas digestivas, como a quimotripsina, contribuindo para a digestão de proteínas ingeridas (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

É sugerido o envolvimento da tripsina na patologia de pancreatite hereditária, onde uma mutação nos resíduos Arg117His, que previne autólise, causa aumento da atividade proteolítica e consequente dano ao pâncreas (WHITCOMB et al., 1996). Outra patologia, a pancreatite aguda, pode estar relacionada com a ativação precoce do tripsinogênio no interstício, com consequente ativação de outros zimógenos. Estes mecanismos de ativação são pouco conhecidos, sendo especulada sua ocorrência por conta de isquemia, hipercalcemia e ativação da catepsina B (MAYER et al., 1999).

1.7.2 Metalopeptidases

As metalopeptidases são enzimas que geralmente apresentam a sequência consenso (**H-E-X-X-H**) em sua estrutura primária, onde a letra X indica qualquer resíduo de aminoácido. Nas metalopeptidases um cátion metal divalente, geralmente zinco, mas algumas vezes cobalto ou manganês, ativa uma molécula de água, que faz o ataque à ligação peptídica susceptível à hidrólise. Os resíduos ligantes de metais conhecidos são os aminoácidos His, Glu, Asp ou Lys. As metalopeptidases estão envolvidas nas mais variadas atividades como: no desenvolvimento embrionário, na formação óssea, reprodução, artrite e câncer (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Por conta da importância deste grupo de enzimas em patologias humanas, estudamos em nosso trabalho a interação de alguns peptídeos do escorpião amarelo em relação à neprilisina (NEP) e enzima conversora de angiotensina (ECA), que serão mais bem discutidas a seguir.

1.7.2.1 Neprilisina (NEP)

A EP 24.11, também conhecida como neprilisina ou encefalinase (E.C. 3.4.24.11) (**Figura 11**), é uma proteína integral de membrana (tipo II), presente como uma ectoenzima, visto que seu sítio ativo está voltado para o espaço extracelular (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Esta enzima apresenta aproximadamente 27 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal no citoplasma, seguida de um domínio transmembrânico composto por 23 resíduos e o restante da molécula localizada na região extracelular (LI; HERSH, 1995).

Figura 11 - Representação da estrutura terciária da neprilisina

Representação obtida pelo *software* PyMOL. Em destaque a coordenação do átomo de zinco, representado pela esfera acinzentada (PDB ID:1Y8J) e os resíduos que compõem o sítio ativo, HEITH, em vermelho.

A NEP é abundante no intestino, rim e placenta, e é também encontrada em células reticulares do sistema imune. Ela está presente, em menor concentração, em outros tecidos e tipos celulares, incluindo o cérebro, onde se localiza nas células neuronais (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). A NEP normalmente atua como uma endopeptidase e hidrolisa peptídeos contendo até 40 resíduos de aminoácidos, contudo, a eficiência de hidrólise diminui com o aumento da cadeia peptídica. Os principais substratos *in vivo* da NEP são os hormônios natriuréticos (ANP, BNP e CNP), as endotelinas, a bradicinina, a substância P (RAWLINGS; SALVESEN, 2013), as encefalinas (ROQUES et al., 1993) e a proteína beta amiloide, uma das responsáveis pela doença de Alzheimer (IWATA et al., 2001). Tendo esta importância, a busca por inibidores desta enzima vem sendo aplicada no desenvolvimento de moléculas relacionadas ao tratamento da dor e regulação da pressão arterial (ROQUES et al., 1993; AMBROSY et al., 2018; RAFFA et al., 2018).

1.7.2.2 Enzima conversora de angiotensina I (ECA)

A enzima conversora de angiotensina, ECA (EC 3.4.25.1) (**Figura 12**), foi isolada inicialmente em 1956 (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956). É uma proteína de 180 kDa

com dois domínios homólogos, onde cada um tem um sítio ativo com o motivo **H-E-X-X-H** para a ligação de um íon metálico Zn^{2+} .

Figura 12 - Representação da estrutura terciária da enzima conversora de angiotensina I

Representação obtida através do *software* PyMOL. Em destaque o domínio-C, HEMGH, (vermelho) em complexo com um inibidor do tipo BPP (azul) (PDB ID: 4APJ).

Descrita inicialmente como uma carboxipeptidase, ela apresentou atividade endopeptidásica sobre alguns substratos (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Por hidrolisar dois importantes substratos fisiológicos envolvidos na regulação da pressão arterial, a procura de inibidores para a ECA sempre foi alvo de estudos para o tratamento da hipertensão.

No final da década de 70, potentes inibidores desta enzima foram descritos e até hoje utilizados na terapêutica para a hipertensão como o Captopril (ONDETTI; RUBIN; CUSHMAN, 1977) e o Enalapril (PATCHETT et al., 1980).

A ECA tem um importante papel na homeostase circulatória, pois é responsável pela clivagem da angiotensina I, produzindo um potente peptídeo vasoconstritor, a angiotensina II (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956), e pela inativação do peptídeo vasodilatador bradicinina (BK) (YANG; ERDÖS; LEVIN, 1970). Ela também hidrolisa um peptídeo inativo, a angiotensina (1-9), a um metabólito vasodilatador, a angiotensina (1-7) (PATCHETT et al., 1980).

É uma ectoenzima ancorada à membrana plasmática e encontrada em diferentes formas (somática, germinal e solúvel) (DAS; HARTLEY; SOFFERS, 1977). Em humanos a

ECA se encontra distribuída em inúmeros tecidos como células epiteliais (como exemplo rins, placenta, intestino), células neuroepiteliais e no trato genital masculino em sua forma germinativa (SKIDGEL; ERDÖS, 1987). Por conta de sua ampla distribuição, além de atuar em substratos como a angiotensina I e bradicinina, a ECA também atua sobre encefalinas (SKIDGEL; ERDÖS, 1987), substância P (SKIDGEL et al., 1984), hormônio luteinizante (SKIDGEL; ERDÖS, 1985), angiotensina 1-7 e a neurotensina (SKIDGEL et al., 1984).

Assim, selecionamos estas enzimas para nossos estudos (elastase, tripsina, ECA e NEP) para a busca de peptídeos presentes no VTs que possam interagir com as mesmas, visando aumentar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no escorpionismo e, também, com base no potencial biotecnológico apresentado por moléculas capazes de exercerem suas modulações.

2 OBJETIVOS

- Identificar, sequenciar e sintetizar novos peptídeos moduladores da atividade da elastase na fração de baixa massa molecular da peçonha do *T. serrulatus*;
- Caracterizar os peptídeos sintéticos em relação à modulação de enzimas de importância médica: elastase, tripsina, ECA e NEP;
- Caracterizar *in vivo* as atividades biológicas do FTR, previamente caracterizado *in vitro*.

Específicos:

- Isolar e sequenciar peptídeos da peçonha do *T. serrulatus* utilizando a elastase e seu substrato FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) específico como ferramentas de *screening*;
- Obter por síntese química os peptídeos identificados como possíveis moduladores da elastase;
- Caracterizar os peptídeos sintéticos em relação à modulação das enzimas: elastase, tripsina, enzima conversora de angiotensina e neprilisina;
- Caracterizar a estabilidade dos peptídeos sintéticos moduladores das enzimas elastase, tripsina, enzima conversora de angiotensina e neprilisina;
- Determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação da hipotensina I em relação à neprilisina;
- Realizar estudos de dicroísmo circular entre as hipotensinas I e II;
- Realizar testes de viabilidade celular e de liberação de citocinas com os peptídeos que se destacaram como moduladores da elastase e/ou da tripsina (peptídeos TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2);
- Avaliar a capacidade de reconhecimento dos soros antiescorpiônico e antiaracnídico do Instituto Butantan sobre os peptídeos sintéticos através de *dot blot*;
- Confirmar a presença de peptídeos quiméricos na peçonha do *T. serrulatus* através de espectrometria de massas e estudar a possível formação destes peptídeos pela ação das enzimas da peçonha;
- Realizar testes *in vivo* de avaliação da alteração da pressão arterial e/ou potencialização da bradicinina pelo peptídeo quimérico que apresenta o N-terminal homólogo à hipotensina I (TsP2);

- Realizar a caracterização *in vivo* do peptídeo FTR enquanto molécula opioide, verificar qual tipo de receptor está envolvido na resposta antinociceptiva e caracterizar se ocorre ação direta ou indireta com o mesmo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos relacionados à identificação, seleção e síntese de peptídeos moduladores da elastase-1 presentes na fração de baixa massa molecular da peçonha do escorpião *T. serrulatus*

3.1.1 Processamento do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* para a obtenção da fração de baixa massa molecular

Dez miligramas de veneno total de *T. serrulatus*, oriundos da Seção de Venenos do Instituto Butantan (lote 744), foram solubilizados em 1,0 mL de tampão (10 mM de acetato de amônio, pH 4,0), para inativação de proteases, e em seguida fracionados em membrana de exclusão molecular de 10 kDa (Amicon® Ultra – Millipore) e secos em sistema *SpeedVac*. O material seco, denominado *pool* peptídico, foi ressuscitado em 120 µL de H₂O Milli-Q.

3.1.2 Obtenção das frações peptídicas e screening por modulação da atividade enzimática da elastase-1

O *pool* peptídico da fração de baixa massa molecular, oriundo de 10 mg de veneno (item 3.1.1), foi fracionado em sistema HPLC (Shimadzu, Prominence) utilizando coluna de fase-reversa C-18 (coluna Restek Ultra C-18 5µm, 250 x 4,6 mm). Inicialmente, um perfil cromatográfico de coleta foi realizado com a injeção de 10 µL da amostra. Com a definição dos pontos de coleta, 50 µL da amostra foram injetados e o material coletado manualmente e seco em sistema *SpeedVac*. O procedimento foi repetido com os 50 µL restantes, totalizando duas séries de coletas. O gradiente utilizado foi de 10-60% de solvente B em 40 min. (solvente A: H₂O/TFA 0,01% e solvente B: Acn/solvente A 9:1) sob fluxo de 1,0 mL/min. Assim, a velocidade de troca de B/min foi de 1,2 % B/min. A eluição da amostra foi monitorada em λ 214 nm.

Após a obtenção das 18 frações, coletadas manualmente, as mesmas foram secas em sistema de *SpeedVac*, ressuscitadas em 100 µL de água Milli-Q e submetidas à testes enzimáticos utilizando substrato fluorescente Abz-FRSSRQ-EDDnp e a elastase-1 (pâncreas porcino - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Foram utilizados 1,7 ng de enzima, 5 µM de substrato (valor referente a 1/2 K_m), 10 µL das soluções individuais de cada fração em tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,0) suficientes para 100 µL de volume final. Para determinação dos parâmetros cinéticos foi utilizado um fluorímetro de placa de 96 poços, Victor III (Perkin-Elmer, EUA), comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 nm e 420 nm

respectivamente, com aumento da fluorescência monitorado durante 15 min, com leitura a cada minuto. Os experimentos foram realizados a 37 °C sob agitação constante e as medidas dos seus potenciais de inibição ou ativação foram realizadas em triplicata. Os dados foram analisados pelo *software* Grafit 5.

3.1.3 - Nova purificação por HPLC de frações moduladoras da atividade da elastase

Com base na alta complexibilidade de algumas das 18 frações provenientes do *pool* peptídico e nas modulações satisfatórias da atividade da elastase, quatro delas foram selecionadas, secas e ressuspendidas em 100 µL de água Milli-Q para novas purificações em sistema HPLC de fase reversa C-18 (coluna Restek Ultra C-18 5µm, 250 x 4,6 mm). Inicialmente, foram feitos perfis analíticos com 5 µL de cada pico e, após, foram injetados os 95 µL restantes para coleta manual. Cada fração foi submetida a gradientes diferentes objetivando uma melhor separação de seus componentes. As frações 2 e 3 foram recromatografadas com o gradiente 10-20% B/40 min (Vel. = 0,25% B/min), a fração 7 com o gradiente 20-30% B/40 min (Vel. = 0,25% B/min) e a fração 18 com o gradiente 30-40% B/20 min (Vel. = 0,5% B/min). Os picos provenientes de cada cromatografia foram coletados manualmente, secos em sistema *speedVac* e novamente analisados em fluorímetro (item 3.1.2) para seleção das amostras e posterior análises por espectrometria de massas.

3.1.4 - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e identificação das sequências primárias dos peptídeos com ação modulatória sobre a elastase

Após a seleção das amostras de interesse, as mesmas foram analisadas por espectrometria de massas. Os experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Leo Kei Iwai, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do CeTICS – Instituto Butantan. As amostras das frações peptídicas selecionadas do veneno foram submetidas à análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado a um sistema de nanoLC Easy II (Proxeon, Odense, Dinamarca). Para a cromatografia líquida foram utilizadas: uma pré-coluna C-18 (100 µm x 40 mm x 10 µm - diâmetro interno x comprimento x tamanho de partícula) e uma coluna analítica C-18 (75 µm x 100 mm x 5 µm) preparadas no próprio laboratório. A cromatografia líquida foi realizada utilizando como solvente A uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, e como solvente B acetonitrila em ácido fórmico 0,1%. O gradiente de eluição teve início com

a concentração de 5% de B e em 8 minutos atingiu 15% de B, a seguir atingiu 60% de B em 35 minutos, 85% de B em 5 minutos, permanecendo por mais 5 minutos nesta condição e retornou à condição inicial em 2 minutos, permanecendo nesta condição por 20 minutos. Os espectros de massas foram obtidos por meio do analisador FTMS com a resolução de 30.000 na faixa de m/z de 400 a 2.000. O método de fragmentação escolhido foi HCD (high-energy collision dissociation) e os íons monocarregados foram rejeitados. A energia de colisão usada para a fragmentação foi 40 eV e o tempo de ativação de 0,1 ms. A voltagem da fonte de ionização foi fixada em 2,5 kV. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 90 segundos, com uma lista de 500 íons. Na análise por HCD o espectro de MS1 foi obtido com a resolução de 30.000, enquanto que para as análises de MS/MS utilizamos a resolução de 7.500 para os fragmentos. Os espectros de MS e MS/MS foram submetidos à análise bioinformática utilizando o *software* PEAKS STUDIO 7.0. Nos parâmetros, não foi considerada nenhuma enzima específica, a taxa de tolerância de erro do precursor foi ajustada em ± 10 ppm, a taxa de tolerância de erro do fragmento foi de $\pm 0,5$ Da e foi considerada como modificação variável a metionina oxidada.

3.1.5 Busca das sequências através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

A ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi empregada para a busca e identificação das regiões dos peptídeos com similaridade entre sequências biológicas depositadas em bancos de dados. Para isso foi utilizada a ferramenta *Protein Blast*, selecionando-se o banco de dados *UniprotKB/Swiss-Prot*. A seleção do programa foi o algoritmo *blastp* (*protein-protein BLAST*). Para as buscas, foram utilizados os bancos de dados dos organismos: *Tityus*, *Arachnids*, *Leguminosae* (*Entrez Query: elastase*) e *Araneus ventricosus*. Empregamos também o banco de dados de análises transcriptômicas das glândulas de veneno do *T. serrulatus* (DE OLIVEIRA et al., 2018) em colaboração com a Dra. Ursula Castro de Oliveira e Dr. Inácio Junqueira-de-Azevedo do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan.

3.1.6 Síntese dos peptídeos

A síntese dos peptídeos foi realizada em fase sólida pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil) com grau de pureza igual ou superior a 95%. Foram sintetizados nove peptídeos, denominados TsP1 – TsP9, Hipo1 e Hipo2.

3.2 Experimentos relacionados à caracterização dos peptídeos sintéticos

O fluxograma com o delineamento experimental envolvendo os subitens deste tópico se encontra no APÊNDICE C.

3.2.1 Testes cinéticos para a determinação de moduladores da atividade enzimática da elastase-1, tripsina, ECA e NEP

Para os testes cinéticos, realizamos a incubação dos nove peptídeos sintéticos com as enzimas e os seus respectivos substratos fluorescentes. Utilizamos 10 μ M de cada peptídeo e verificamos o poder de modulação dos mesmos sobre a enzima testada. Para as enzimas elastase-1 e tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados 1,7 ng das mesmas, juntamente com o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp (5 μ M) em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0. Para a ECA (pulmão de coelho - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados 3 ng da enzima com 10 μ M do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (gentilmente cedido pela Professora Adriana Carmona – Departamento de Biofísica da UNIFESP) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM contendo 10 μ M de $ZnCl_2$, pH 7,0 (ARAÚJO et al., 1999). Para a enzima NEP (recombinante humana, gentilmente cedida pela Professora Adriana Carmona - UNIFESP), foram utilizados 1,5 ng da enzima com 3,5 μ M do substrato Abz-RGFK (Dnp)-OH (BARROS et al., 2007) em tampão 50 mM de Tris HCl pH 7,5. O volume final para todas as reações foi 100 μ L. Para a determinação dos parâmetros cinéticos por fluorescência, utilizamos fluorímetro de placa de 96 poços, Victor III (Perkin-Elmer, EUA), comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 nm e 420 nm, respectivamente. Os experimentos foram realizados a 37 °C sob agitação constante e as medidas dos seus potenciais de inibição ou ativação foram realizadas em triplicata durante 15 minutos (item 3.1.2). Os dados foram analisados pelo *software* Grafit 5.

3.2.2 Testes cinéticos para a determinação de moduladores da atividade enzimática da elastase-2

Para a enzima elastase-2 (leucócitos humanos - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados 2,5 U da enzima, juntamente com o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp (5 μ M) em tampão de Tris HCl 50 mM pH 8,0 e 10 μ M dos peptídeos TsP5, Hipo1 e Hipo2. A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada como descrito do item 3.1.2.

3.2.3 Testes de estabilidade dos peptídeos

Após a seleção dos peptídeos sintéticos que apresentaram algum tipo de modulação das atividades enzimáticas, os mesmos foram submetidos a testes de estabilidade visando a possível formação de produtos de hidrólise pela respectiva enzima incubada. Os peptídeos selecionados foram incubados a 37 °C por 4 horas. As amostras foram analisadas por cromatografia em fase reversa (HPLC – Shimadzu, Japão) usando coluna Restek Ultra C-18 5 µm, 250 x 4,6 mm. O gradiente empregado foi de 20% a 60% de solvente B em 20 min (1,25% B/min, fluxo 1 mL/min) e a absorbância monitorada a 214 nm. As incubações realizadas estão descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Incubações realizadas durante os testes de estabilidade

Enzima	Peptídeos incubados (30 µM)	Tampão
Elastase-1 (1,7 ng)	Tsp5, Hipo1 e Hipo2	50 mM de Tris pH = 8,0
Tripsina (1,7 ng)	TsP5, Tsp6, Hipo1 e Hipo2	50 mM de Tris pH = 8,0
ECA (3,0 ng)	Tsp2, TsP3, TsP4, TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2	Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM contendo 10 µM de ZnCl ₂ pH = 7,0
NEP (1,5 ng)	Tsp1, Hipo1 e Hipo2	50 mM de Tris HCl pH 7,5

3.2.4 Análise dos possíveis efeitos citotóxicos e pró- ou anti-inflamatórios dos peptídeos sintéticos TsP5, Hipo1 e Hipo2

Experimentos realizados em colaboração com a Dra. Carla Cristina Squaiella Baptistão do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan (CEUA nº 5396310517).

3.2.4.1 Obtenção das células do exsudato peritoneal

Camundongos BALB/c naïve (n = 6) foram eutanasiados em câmara de CO₂, e as células do exsudato peritoneal foram coletadas por duas lavagens com 5 mL de meio RPMI. As células obtidas foram lavadas duas vezes com meio RMPI, centrifugadas a 400 g, por 10 minutos, a 18 °C, e ressuspensas em meio R10 (RPMI + 10% de soro fetal bovino). Após contagem em câmara de Neubauer, na presença de azul de Trypan, a concentração celular foi ajustada para 2 x 10⁶ células/mL. As células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (2 x 10⁵ células/100 µL/poço) e incubadas por 2 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células não aderentes foram descartadas, e as células aderentes (macrófagos) foram ressuspensas em meio R10 contendo os respectivos estímulos testados, em diferentes concentrações, em triplicatas, em volume final de 200 µL/poço. Células ressuspensas em

meio R10 foram utilizadas como controle negativo, e células estimuladas com LPS (5 µg/mL), como controle positivo. As células foram então incubadas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80°C, para posterior citocinas, e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT.

3.2.4.2 Ensaio de viabilidade celular

Após o período de 24 horas de incubação das células com os diferentes peptídeos (TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2) nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, foram realizados ensaios de MTT, consistindo na adição de 100 µL de R10 contendo 0,5 mg/mL de MTT em todos os poços, seguindo-se uma nova incubação, nas mesmas condições, por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, e 100 µL de DMSO foram adicionados por poço para dissolução dos cristais formados.

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro Biotek ELx800 plate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 540 nm. A partir das absorbâncias das amostras e do controle negativo (células cultivadas somente com R10), foi calculada a viabilidade celular.

3.2.4.3 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura

A concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, MCP-1 e TNF) nas amostras tratadas com os peptídeos sintéticos foi determinada por método de CBA (BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Bioscience, SD, California, EUA), e os dados foram analisados utilizando o software BD FCAP Array versão 3.0. Foram testados os diferentes peptídeos (TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2) nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL.

3.2.4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 5, utilizando-se o teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

3.3.5 Dot blot

Para avaliar a capacidade dos soros antiescorpiônico (lote: 0905104/A) e antiaracnídico (lote: 0706121) produzidos pelo Instituto Butantan em reconhecerem os peptídeos identificados na peçonha, foi adotada a técnica de *Dot Blot*. Os soros foram fornecidos pela Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan. Para a realização dos experimentos foram aplicadas 5 µg de cada amostra, sendo estas os peptídeos do VTs sintetizados neste estudo (TsP1 a TsP9, Hipo1 e Hipo2), peptídeos do VTs anteriormente estudados por nosso grupo (YLPT, FTR e KEILG), proctolina (RYLPT), VTs (controle positivo) e o BSA (Bio Rad, controle negativo) sobre uma membrana de nitrocelulose (Bio Rad Trans-Blot). Após total secagem da membrana, ela foi incubada em solução 10% de albumina sérica bovina (BSA) em tampão PBST (PBS e 0,05% Tween-20), por 2 horas, no agitador orbital, à temperatura ambiente, para bloquear interações não específicas. A seguir, foram adicionados em cada respectiva membrana os soros antiescorpiônico e antiaracnídico, diluídos em tampão PBST (1:7500) e incubados por mais 2 horas sob agitação. Após este período, a membrana foi lavada com a solução PBST, por três vezes, durante 5 minutos cada, no agitador orbital, à temperatura ambiente. Após descartar a solução de PBST, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina anti-IgG de cavalo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído na proporção de 1:5000 em PBST por 1h a temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada com a solução TBST, por três vezes, durante 5 minutos cada, no agitador orbital, à temperatura ambiente. Foi adicionada a solução 0,1 M Tris-HCl, 0,02 M NaCl, 0,005 M MgCl₂, pH 9,5, contendo os reagentes BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) e NBT (nitro blue tetrazolium), mantendo a membrana sob agitação para a revelação.

3.2.6 Determinação do mecanismo e constante de inibição (K_i) da hipotensina I em relação à NEP

Para a determinação da constante de inibição (K_i) e do mecanismo de inibição da hipotensina I (Hipo1) em relação à NEP, foram utilizadas quatro concentrações do substrato Abz-RGFK-EDDnp (4 µM, 6 µM, 8 µM e 10 µM) e duas concentrações da hipotensina I (3µM e 4µM), mantendo-se a concentração de enzima constante (1,5 ng em 100 µL de tampão 50 mM de Tris HCl pH 7,5). O controle sem peptídeo também foi realizado. Os parâmetros de leitura foram os mesmos do item 3.1.2. Foi construído o gráfico de Lineweaver-Burk ($1/V \times$

1/[S]) e de acordo com o mecanismo apresentado o K_i foi calculado como descrito por Segel (1975). O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.7 Dicroísmo circular

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo do Professor Dr. Vitor Oliveira, do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Os espectros de dicroísmo circular (DC) dos peptídeos sintéticos hipotensina I e hipotensina II foram obtidos através do equipamento espectropolarímetro Jasco J-710. A leitura do espectro foi feita a 25 °C, com uma cubeta de quartzo com 1,0 mm de espessura. Os dados foram obtidos entre os comprimentos de onda 190 a 260 nm com um intervalo de 1 nm e com um tempo de integração de dois segundos a cada comprimento de onda. Foram efetuadas as médias de quatro leituras com subtração do *background*. As estruturas secundárias das hipotensinas I e II foram calculadas através de deconvolução do espectro pelo software CDNN (BÖHM; MUHR; JAENICKE, 1992).

3.2.8 Injeção endovenosa do peptídeo TsP2 para avaliação da pressão arterial média e da possível potencialização da atividade hipotensora da bradicinina em ratos normotensos anestesiados

Experimentos realizados em colaboração com o Dr. Benedito Carlos Prezoto, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan (CEUA nº 2402051017). A possível potenciação *in vivo* da atividade hipotensora da bradicinina seguiu o delineamento experimental descrito por Meki et al, 1995, com adaptações. Ratos Wistar machos, pesando entre 300 e 350g foram colocados em uma câmara e a anestesia foi induzida com anestésico volátil isoflurano em oxigênio medicinal. A porcentagem de anestésico utilizada foi de 1,5-3%.

Cânulas de polietileno (PE-50, Becton Dickinson, Parsippany, NJ, EUA) foram introduzidas na carótida direita e na veia jugular esquerda, para a avaliação da pressão arterial média (PAM) e administração de fármacos, respectivamente. Os animais receberam heparina i.v. (200–300 IU kg⁻¹), e a PAM foi avaliada através de um transdutor de pressão, acoplado a um sistema de registro (PowerLab/4SP, AD Instruments, EUA). A partir de condições hemodinâmicas estáveis, após espera de ao menos 10 min (valores controles basais), foi injetada dose de 3 µg/kg de bradicinina sintética (diluída em solução salina a 0,9% de NaCl, volume de 200 µL). Esta dose de bradicinina foi escolhida por induzir uma hipotensão de

média intensidade na PAM em ensaios controle. Após retorno ao nível basal das condições hemodinâmicas, foi administrada endovenosamente a dose de 200 µg/kg do peptídeo TsP2. Valores relacionados à queda da PAM (em mm de Hg) induzidos por esta dose de bradicinina antes, 5 e 20 minutos após a administração do peptídeo foram computados como média $\pm$ desvio padrão da média e comparados por meio de *one-way repeated measures* (ANOVA) seguida por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (VERANO-BRAGA et al., 2008). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$ ($n=7$). Após a realização dos experimentos, os animais foram eutanasiados por administração de pentobarbital de sódio (40 mg/kg) intravenosamente. As carcaças foram mantidas a -20 °C, em freezer exclusivo para esse fim, até o agendamento da retirada pela Comissão de Resíduos do Instituto Butantan.

3.2.9 Experimentos com o peptídeo FTR em relação à ação antinociceptiva em ratos

Os experimentos relacionados à antinocicepção (CEUA nº 7549010615) foram realizados em colaboração com o grupo das Dras. Gisele Picolo e Yara Cury (Laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan). Para avaliar a atividade antinociceptiva do FTR, foram realizados os testes de Randall e Selitto de pressão crescente na pata de ratos Wistar (RANDALL; SELITTO, 1957). Para a execução desse teste utilizamos analgesímetro (Ugo-Basile®), que gera aumento linear da força (em gramas) sobre a superfície dorsal da pata do animal até que esse retire a pata. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo. A pressão necessária para que esse animal exiba tal resposta é registrada em gramas. A hiperalgesia foi induzida por administração intraplantar de 0,1 mL de salina estéril contendo carragenina (200 µg/pata). O limiar hipernociceptivo foi medido antes da injeção da carragenina e 3 horas após, com ou sem a co-administração do peptídeo testado.

Para a verificação do efeito por via oral, 200 µg do peptídeo FTR foram administrado por meio de gavagem. Foram utilizados seis animais por grupo experimental com aproximadamente 200 g cada.

Para a avaliação do envolvimento de receptores opioides, 20 µg do peptídeo FTR foram administrados por via intraplantar. O envolvimento de receptores opioides foi avaliado empregando o antagonista inespecífico cloridrato de naloxona (1 µg/pata, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Foram utilizados cinco animais por grupo experimental com aproximadamente 200 g cada.

Para a avaliação específica de receptores opioides, 20 µg do peptídeo FTR foram administrados por via intraplantar. O envolvimento dos receptores opioides foi avaliado empregando antagonistas específicos: CTOP (receptores mu – 20 µg/pata, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Nor-BNI (receptores kappa - 50 µg/pata, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e Naltrindol (50 µg/pata, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Como controle positivo foi empregado a morfina (6 µg/pata). Foram utilizados cinco animais por grupo experimental com aproximadamente 200 g cada.

Para a avaliação de ação indireta do peptídeo através da liberação de Met-enkefalina, 20 µg do peptídeo FTR foram administrados por via intraplantar. O envolvimento da resposta através da Met-enkefalina foi avaliado empregando o anticorpo anti-Met-enkefalina (20 µg/pata, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Foram utilizados cinco animais por grupo experimental com aproximadamente 200 g cada.

3.3 Experimentos relacionados aos peptídeos quiméricos

3.3.1 Processamento e fracionamento de três diferentes lotes da peçonha

Três diferentes lotes oriundos da Seção de Venenos do Instituto Butantan, identificados com as numerações 2358, 2145 e 2200 foram processados e fracionados conforme descrito nos itens 3.1.1 e 3.1.2, respectivamente.

A coleta das frações foi realizada manualmente. Os pontos de coleta foram determinados em comparação com as regiões onde foram encontradas as sequências quiméricas no veneno inicialmente utilizado (faixa entre as frações F9 a F13).

3.3.2 Análise por espectrometria de massas das frações originadas dos três lotes de veneno

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com o laboratório de Espectrometria de Massas do CENTD (Center of Excellence in New Target Discovery) do Instituto Butantan, através do processo 2015/50040-4 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e GlaxoSmithKline. Para análise de MS, as misturas de peptídeos foram dissolvidas em ácido fórmico a 0,1% (solução A). Alíquotas de 1 µL foram injetadas automaticamente por um sistema EASY-nLC 1200 de nano cromatografia (Thermo Scientific) em uma coluna Acclaim PepMap C-18 de 15 cm x 50 µm (Thermo Scientific) acoplada a um espectrômetro de massas Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 4-40% da solução B (80% de acetonitrila

e 0,1% de ácido fórmico) a 300 nL / min durante 25 min. A voltagem da fonte de ionização foi ajustada em 2,5 kV e o espectrômetro de massas foi operado em modo dependente de dados, no qual uma varredura completa de MS foi adquirida na faixa de 300-1.500 m / z seguida de aquisição de espectros de MS / MS gerados por HCD dos cinco íons mais intensos da varredura MS com energia de colisão normalizada escalonada (NCE) de 26, 28 e 30. Os espectros MS e MS/MS foram adquiridos no analisador Orbitrap em resolução 70.000 e 17.500 (a 200 m/z), respectivamente. O tempo máximo de injeção e o alvo de AGC foram definidos para 25 ms e 3E6 para MS e 40 ms e 1E5 para MS/MS. O limite mínimo de sinal para disparar o evento de fragmentação e a janela de isolamento dos íons foram definidos como, respectivamente, 2,5E4 cps e 1,4 m/z. A exclusão dinâmica de picos foi desativada e a exclusão de carga foi definida para fragmentar somente os precursores com o estado de carga designado > 1+. As sequências primárias foram determinadas através do emprego do software Peaks 8.5. Nos parâmetros, não foi considerada nenhuma enzima específica, a taxa de tolerância de erro do precursor foi ajustada em ± 10 ppm, a taxa de tolerância de erro do fragmento foi de $\pm 0,02$ Da e foi considerada como modificação variável a metionina oxidada.

3.3.3 Análise por HPLC das incubações visando à produção de peptídeos quiméricos

Foram realizados diversos sistemas de incubações do VTs, liofilizado, recém-coletado e fração de alta massa molecular, em vários pHs com os peptídeos sintéticos (TsP3 a TsP9, Hipo I e Hipo II) que continham diferentes fragmentos observados nos dois peptídeos quiméricos (TsP1 e TsP2) visando a formação dos mesmos. A possível obtenção dos peptídeos quiméricos após as diferentes incubações foi analisada por cromatografia em fase reversa conforme descrito no item 3.2.3. Os sistemas empregados nas incubações estão na **Tabela 5**. Além disso, utilizamos veneno recém-coletado (veneno “fresco”) em algumas incubações. Este veneno foi gentilmente cedido pelos alunos Thiago de Jesus Oliveira e Soraia Maria do Nascimento do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan. Foram utilizados 20 escorpiões, onde o veneno foi extraído e mantido em gelo. Após o término da extração, o VTs foi diluído em 200 μ L de água Milli-Q gelada, quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e imediatamente empregado nas incubações. O pH do veneno foi analisado após extração direta da glândula de um indivíduo empregando fita indicadora (P-4536, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Tabela 5 - Diferentes sistemas de incubações realizados

SISTEMA	TAMPÃO	pH	TEMPO
TsP3 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,5	4 horas
TsP4 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,5	4 horas
TsP5 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,5	4 horas
TsP6 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,5	4 horas
TsP7 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,5	4 horas
TsP8 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,5	4 horas
TsP3 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	7,5	16 horas
Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	7,5	16 horas
Hipo2 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	8,0	16 horas
Hipo1 [20 µM] + Fração alta massa molecular do veneno (0,83 µg)	Bórax	9,0	16 horas
TsP3 [20 µM] + VTs (0,96 µg)	Bórax	8,5	16 horas
Hipo1 [20 µM] + VTs (0,96 µg)	Bórax	8,5	16 horas
Hipo2 [20 µM] + VTs (0,96 µg)	Bórax	8,5	16 horas
TsP3 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + VTs (0,96 µg)	Bórax	8,5	16 horas
TsP3 [20 µM] + VTsF (1,0 µg)	Bórax	8,5	16 horas
Hipo1 [20 µM] + VTsF (1,0 µg)	Bórax	8,5	16 horas
Hipo2 [20 µM] + VTsF (1,0 µg)	Bórax	8,5	16 horas
TsP5 [20 µM] + Hipo1 [20 µM] + VTsF (1,0 µg)	Bórax	8,5	16 horas
Hipo1 [20 µM] + VTsF (1,0 µg)	Tris	6,5	16 horas
Hipo1 [20 µM] + VTsF (1,0 µg) – temperatura ambiente	Tris	6,5	16 horas
TsP5 [20 µM] + VTsF (1,0 µg)	Tris	6,5	16 horas
TsP5 [20 µM] + VTsF (1,0 µg) – temperatura ambiente	Tris	6,5	16 horas
TsP3: GKGKEILGKIKE;			
TsP4: KEILGKIKE;			
TsP5: GKGKEILGKIKEKIIIEA;			
TsP6: FTLLPK;			
TsP7: LLPKVQLLAE;			
TsP8: LLPKVDS;			
Hipo1: hipotensina I – AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA;			
Hipo2: hipotensina II – AEIDFSGIPEDIKEIKETNAKPPA;			
Fração de alta massa molecular do veneno: Fração contendo moléculas $\geq$ a 10 kDa;			
VTs: Veneno total do <i>Tityus serrulatus</i> ;			
VTsF: Veneno total do <i>Tityus serrulatus</i> “fresco”;			
Bórax: Ácido bórico [50 mM].			

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e síntese de peptídeos moduladores da elastase provenientes da fração de baixa massa molecular do veneno do escorpião *T. serrulatus*

Acidentes por escorpiões são considerados um grande problema relacionado à saúde pública no Brasil, onde o número de acidentes e, conseqüentemente, o número de óbitos vem aumentando ano a ano (DATASUS, 2018). O escorpião comumente envolvido nas notificações de escorpionismo é o *Tityus serrulatus*, sendo um dos mais perigosos por conta dos problemas acarretados pela ação de suas toxinas (FUNASA, 1998; MARCUSSI et al., 2011). Experimentos relacionados à dose letal média (DL₅₀) em ratos demonstraram a susceptibilidade de indivíduos jovens às manifestações do veneno, apresentando valores de DL₅₀ de 2,9 ±0,3 mg/kg contra 10,8 ±0,6 mg/kg em adultos (NUNAN; CARDOSO; MORAES-SANTOS, 2001). Igualmente, em casos de escorpionismo por *T. serrulatus* esta susceptibilidade à letalidade do veneno é refletida, sendo relacionada à menor massa corporal e maior acesso das toxinas ao sistema nervoso central, por conta da maior vulnerabilidade da barreira hematoencefálica em crianças (GUERRA et al., 2008 GUIDINE et al., 2014). Como *T. serrulatus* se alimenta principalmente de insetos, estudos demonstraram que o veneno atua um milhão de vezes de maneira mais letal nestes indivíduos comparativamente a mamíferos, onde a DL₅₀ para grilos foi de 19,91 ng/kg (MANZOLI-PALMA; GOBBI; PALMA, 2003).

Dentre os componentes presentes no veneno do escorpião amarelo, os peptídeos são abundantes, porém muitos destes ainda não foram identificados ou caracterizados. Estima-se a existência de mais de 100 mil diferentes peptídeos presente nas peçonhas dos escorpiões e que apenas 0,4% deste total já foram descritos (ZHIJIAN et al., 2006).

Em vista deste cenário, o emprego de técnicas para a identificação, seleção e caracterização de peptídeos da peçonha vem sendo desenvolvidas por nosso grupo. As técnicas se baseiam em *screening* por modulação enzimática de peptidases humanas de importância médica com o emprego de substratos FRET como ferramentas. Neste trabalho, iniciamos nossos estudos em relação à classe das serino peptidases, em particular a elastase, uma enzima abundante no pulmão, envolvida em graves processos inflamatórios (JANOFF, 1985; LAGENTE et al., 2005). Como já descrito, esta enzima foi escolhida com base nos quadros de edema pulmonar agudo, que causam as fatalidades envolvendo o escorpião *T. serrulatus* (CUPO et al., 1994, BUCARETCHI et al., 2014; CUPO, 2015). A gênese da patologia relacionada ao edema pulmonar é complexa e envolve mecanismos cardiogênicos e os não cardiogênicos, além de outros ainda não descritos ou caracterizados (AMARAL et al.,

1993; DE MATOS et al., 1997; SILVA et al., 2005; PUCCA et al., 2015a). Portanto, como os mecanismos patológicos não foram totalmente elucidados, hipotetizamos a possível participação de peptídeos responsáveis pela modulação da elastase nos processos inflamatórios relacionados ao edema pulmonar agudo, característico do escorpionismo por *T. serrulatus*.

Para a busca de possíveis inibidores ou de moléculas capazes de aumentarem a atividade enzimática da elastase, partimos da fração de baixa massa molecular (<10 kDa) provenientes de 10 mg do veneno liofilizado, solubilizado em tampão de acetato de amônio a 10 mM, pH 4,0 gelado. Este tampão foi utilizado para a conservação da fração natural peptídica, evitando a ação de proteases do veneno. A porção de baixa massa teve seu perfil analisado em sistema de HPLC e a seleção dos pontos de coleta foi baseada no grupamento dos picos apresentados no perfil obtido (**Figura 13**).

Figura 13 - Perfil cromatográfico da fração de baixa massa molecular do veneno do *T. serrulatus*

HPLC fase reversa C-18 (Shimadzu, Prominence). O gradiente inicial utilizado (linha azul) foi de 10-60% de solvente B em 40 minutos (solvente A: H₂O/TFA 0,01% e solvente B: Acn/solvente A 9:1) sob fluxo de 1,0 mL/min. As frações foram selecionadas para a coleta por conta do agrupamento dos picos. Coluna Restek Ultra C-18 5µm, 250 x 4,6 mm.

O procedimento resultou em 18 frações, como representado na **Figura 13**, que foram secas e, posteriormente, ressuspensas em 100 µL de água Milli-Q. Todas estas frações foram testadas em relação à modulação da atividade da elastase. Para esta etapa, empregamos o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp e o fluorímetro, como descrito no item 3.1.2. Dentre as 18 frações, algumas delas não apresentaram nenhum tipo de interação com a elastase (F4, F6,

F10, F13, F15 e F17) e os resultados com as frações que foram capazes de modular a atividade catalítica da enzima estão mostrados abaixo (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Modulação da atividade catalítica da elastase pelas frações provenientes da etapa de HPLC

Fração	Aumento na atividade	Inibição	% de inibição ou de aumento de atividade absoluta
F1	++	-	27%
F2	-	+++++	100%
F3	++	-	23%
F5	+	-	13%
F7	++	-	29%
F8	++	-	29%
F9	++++	-	72%
F11	+	-	7%
F12	-	+	13%
F14	+++	-	33%
F16	+++	-	35%
F18	+++	-	31%
+ <25%			
++ >25%			
+++ >30%			
++++ > 40%			
+++++ 100%			

De acordo com os resultados apresentados (**Tabela 6**), a maioria das frações apresentou características que aumentaram a atividade da elastase. Foram selecionadas para análise por espectrometria de massas as frações: F9, F14 e F16, por resultarem em aumento da atividade acima de 30%. A amostra F12 foi selecionada por ter sido a única capaz de inibir a atividade da elastase. Uma vez que o perfil apresentado na **Figura 13** indicou que as frações F2, F3, F7 e F18 poderiam conter muitos peptídeos, as mesmas foram recromatografadas com o emprego de diferentes gradientes, objetivando uma melhor separação dos componentes. Foram injetados 5 µL de cada fração para a obtenção do perfil cromatográfico e demarcação das frações coletadas (**Figura 14**).

Figura 14 - Perfis das recromatografias das frações F2, F3, F7 e F18

Cromatografia em fase reversa utilizando diferentes gradientes (linhas azuis): (A) e (B) 10-20% B/40 min (Vel. = 0,25% B/min), (C) 20-30% B/40 min (Vel. = 0,25 B/min) e (D) 30-40% B/20 min (Vel. = 0,5 B/min). As amostras foram separadamente coletadas e secas em sistema *SpeedVac*. Coluna Restek Ultra C-18 5 μ m, 250 x 4,6 mm.

As amostras coletadas e secas foram mais uma vez ressuspensas em água Milli-Q para a realização do *screening* envolvendo a elastase e seu substrato FRET (**Figura 15**).

Figura 15 - Quadro representando a modulação da elastase pelas novas frações obtidas nas recromatografias

	Aumento da atividade	Inibição	% absoluta de inibição ou aumento da atividade
F2A	+	-	3,90%
F2B	+	-	9,70%
F2C	+	-	3,80%
F2D	+	-	16,40%
F2E	+	-	16%
F2F	-	+	19,60%
F2G	-	+	7,20%
F2H	-	+	16,50%
F3A	-	+	11%
F3B	-	+	3,70%
F3C	+	-	35,20%
F7A	+	-	6,70%
F7B	+	-	5,80%
F7C	-	+	10,70%
F7D	-	+	6,10%
F7E	-	+	1,70%
F7F	-	+	13,90%
F7G	-	+	8,10%
F7H	-	+	32,80%
F18A	-	+	13%
F18B	+	-	39,30%
F18C	+	-	27,10%

Representação do resultado do *screening* envolvendo a elastase e as novas frações provenientes das amostras F2, F3, F7 e F18. As amostras destacadas em cinza foram selecionadas para análise por espectrometria de massas.

Com o refinamento das amostras, percebemos mudanças em algumas das características modulatórias apresentadas originalmente. A fração 2 (F2), inicialmente se apresentou com um grande potencial inibitório (**Tabela 6**), porém, com a revelação de novos picos durante o refinamento da amostra (**Figura 14**) e a realização de um novo *screening*, o comportamento das novas frações foi diferente. Ao contrário do observado com a F2, algumas das suas subfrações foram capazes de aumentar a atividade catalítica da elastase. Além disso, a forte inibição da elastase não foi observada nas subfrações da F2. O mesmo comportamento foi apresentado pelas amostras F3, F7 e F18. Portanto, quando tratamos de frações mais complexas alguns peptídeos podem ser “mascarados” por outros de maneira competitiva ou sinérgica, demonstrando a importância de um refinamento no processo de purificação, quando

necessário, para melhorar as buscas por moléculas de interesse. As amostras que se destacaram no *screening* por apresentarem atividades inibitórias ou ativadoras da elastase foram selecionadas para análise por espectrometria de massas (**Figura 15**).

Após seleção das frações de interesse, onze amostras foram sequenciadas empregando técnicas *de novo*. A sequência primária dos peptídeos foi obtida através do *software* Peaks Studio 7.0, onde mais de 700 sequências foram identificadas (**Apêndice A**). Como o nosso objetivo não se relacionava com o estudo do peptidoma do veneno, e sim com a identificação de peptídeos capazes de interagir com algumas enzimas humanas de importância médica, decidimos realizar uma busca estratégica com a ferramenta Protein BLAST² e a literatura, visando critérios para a seleção de alguns peptídeos para a posterior síntese de seus homólogos. Esta parte do nosso estudo se apresentou de forma demorada e trabalhosa, pois manualmente as mais de 700 sequências foram analisadas após o confronto direcionado em relação aos bancos de dados. Para as buscas empregamos o banco de dados *Uniprot/Swissprot* direcionado para o organismo *Tityus*, visando à identificação de toxinas com funções previamente descritas que poderiam servir como um ponto de partida para nossa seleção de sequências de interesse. Na tentativa de expansão dos *hits* apresentados, empregamos como organismo de busca os aracnídeos, visando resultados envolvendo moléculas já descritas que interagissem com serino proteases. Também empregamos banco de dados de moléculas provenientes de leguminosas, com o direcionamento da busca para o termo “elastase”, pois alguns inibidores de serino proteases do tipo kunitz estão presentes nestes organismos. E por fim, o direcionamento das buscas em relação à aranha *Araneus ventricosus*, a qual possui inibidores do tipo kunitz identificados em seu veneno capazes de interagir com a elastase (WAN et al., 2013a, 2013b).

Após as análises das sequências, observamos a presença de um grande grupo de moléculas provenientes do processamento de uma neurotoxina que atua em canais de K⁺ da família β -KTx 2. Denominada Ts19, foi inicialmente descrita em 2012 em um trabalho sobre o transcriptoma das glândulas de veneno do *T. serrulatus* realizado por Alvarenga e colaboradores (ALVARENGA et al., 2012; CERNI et al., 2016; LIMA et al., 2015; MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016). Os peptídeos KTxs representam 8% do total dos transcritos das glândulas de veneno do *T. serrulatus*, onde o peptídeo Ts19 apresenta grandes níveis de expressão (ALVARENGA et al., 2012). O processamento desse peptídeo já vem sendo observado por outros grupos, como nos trabalhos de Rates e colaboradores (2008) e

² Protein BLAST, disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

Verano-Braga e colegas (2013), que fizeram os primeiros estudos peptidômicos parciais do veneno, observando o intenso processamento da Ts19 pela provável ação de amino e carboxiproteases presentes na peçonha. Nosso grupo já havia encontrado o menor fragmento até hoje descrito proveniente do processamento desta molécula com atividade biológica. O pentapeptídeo denominado KEILG foi capaz de atuar como inibidor incompetitivo da timet oligopeptidase (EP 24.15), uma enzima envolvida no processamento de oligopeptídeos em mamíferos, além de provocar aumento do rolamento de leucócitos na microcirculação de camundongos (CARVALHO et al., 2012; DUZZI, 2014). Além disso, em 2016, Cerni e colaboradores isolaram e sequenciaram um novo fragmento de 49 aminoácidos, denominado Ts19 *Fragment II*, capaz de exercer o bloqueio de canais de K^+ . Neste mesmo trabalho foi sintetizada uma sequência de nove aminoácidos (KIKEKIIIEA) pertencente à porção N-terminal da Ts19, e não presente no Ts19 *Fragment II*, capaz de exercer ação citolítica em eritrócitos de camundongos com ausência de atividade sobre canais de K^+ . Assim, é interessante observar que a hidrólise de uma neurotoxina atuante em canais de potássio pode gerar toxinas com atividades diferentes daquelas observadas na molécula de origem. Estes fragmentos podem ser definidos como “criptídeos”, que são peptídeos ativos “escondidos” em uma molécula de maior tamanho e que podem ser formados a partir da hidrólise da proteína precursora (SAMIR; LINK, 2011). Cada vez mais a presença de criptídeos na peçonha do escorpião amarelo vem sendo abordada. Recentemente foi investigada a possível origem do peptídeo Ts10, de treze aminoácidos e com atividade hipotensora, a partir da hidrólise do peptídeo Ts3, de 62 aminoácidos, uma α -neurotoxina que atua em canais de Na^+ (ROCHA-RESENDE et al., 2017).

Portanto, sendo a Ts19 precursora de criptídeos, e muitos destes observados em nossas análises, selecionamos, através deste critério, alguns pré-candidatos a síntese (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Possíveis criptídeos originados do processamento da Ts19

Sequência	Fração
EAGKGKEILGKIKE	F9
GKGKEILGKIKEKIIIEA	F14
GKGKEILGKIKE	F9
GKGKEILGKI	F12
KEILGKIKE	F9
KEILGKIKEKIIIEA	F12

Em vermelho: as sequências selecionadas para síntese.

Dos fragmentos originados do processamento da Ts19, três sequências foram selecionadas para a síntese: **GKGKEILGKIKEIEA** (F14), por ser o maior fragmento encontrado, **GKGKEILGKIKE** (F9), por ser um fragmento de tamanho intermediário e **KEILGKIKE** (F9) por ser o menor fragmento e pela ausência da glicina N-terminal. Estas sequências se apresentaram em frações que aumentaram a atividade enzimática da elastase.

Como segundo critério para a seleção de peptídeos, levamos em consideração as sequências contendo os aminoácidos **LLP**, **LLPK** e **LLPKV**. Estas sequências se destacaram durante nosso processo de seleção, onde em buscas empregando banco de dados e leitura de artigos científicos, observamos que estes fragmentos estão presentes em sequências primárias de algumas moléculas inibidoras do tipo kunitz e serpinas presentes em alguns seres vivos. Estes inibidores foram descritos em camundongos (BENARAFÁ et al., 2002) e nos venenos da anêmona *Anthopleura aff. xanthogrammica* (MINAGAWA et al., 1997), do escorpião *Hadrurus gertschi* (DING et al., 2015) e da aranha *Araneus ventricosus* (WAN et al., 2013a, 2013b). As sequências estão representadas na **Figura 16**.

Figura 16 - Sequências dos inibidores de serino peptidases contendo os peptídeos LLP, LLPK e LLPKV

APVNEDC LLPK KVGPCRAAVPRFYNSDSGKCEGFTYGGCHANANNFKTKDECKNACH
<p>Nome da Proteína: PI – Actitoxin – Av1a.</p> <p>Organismo: Anêmona marinha - <i>Anthopleura aff. Xanthogrammica</i>.</p> <p>Função: Inibidor de serino peptidases. Atua na tripsina, quimotripsina e elastase.</p> <p>UniProtKB: P81547.</p>
MEQLSSANTLFALELFQTLNESSPTGNIFFSPFSISSALAMVILGAKGSTAAQLSKTFHF DSVEDIHSRFQSLNAEVSKRGASHTIKLANRLYGEKTYNFLPEYLASTQKMYGADLAPVD FLHASEDARKEINQWVGQTEGKIPELLSVGVVDSMTKLVLVNAIYFKGMWEEKFMTEDT TDAPFRLSKKDTKTKVMMYQKKKFPFGYISDLKCKVLEMPYQGGELSMV LLPK DIEDES TGLKKIEKQITLLEWTKRENLEFIDVHVKLPRFKIEESYTLNSNLGRLGVQDLFSSS KADLSGMSGSRDLFISKIVHKSFVEVNEEGTEAAAAATGGIATFCMLLPREEFTVDHPFIF FIRHNPTSNVFLGRVCSP
<p>Nome da Proteína: Serpinb1a.</p> <p>Organismo: Camundongo - <i>Mus musculus</i>.</p> <p>Função: Regula a ação de proteases de neutrófilos, como a elastase.</p> <p>UniProtKB: Q9D154.</p>
MIIFYGLFSILVLT SINIAEAGHHNRVNC LLPK TGPKGSGFARYYFDIETGSKAFIY GGCEGNSNNFSEKHHCEKRCRGFRKFGGK
<p>Nome da Proteína: Kunitz-type serine protease inhibitor Hg1.</p> <p>Organismo: Escorpião - <i>Hadrurus gertschi</i>.</p> <p>Função: Inibidor da tripsina e de canais hKCa2.3/KCNN3.</p> <p>UniProtKB: P0C8W3.</p>
MPFHYFPKLNPIITWIPGWI PGLGKDRC LLPKV TGPCKASLTRYYYDKDTKACVEFIYGG CRGNRN NFKRKDECEKACTDH
<p>Nome da Proteína: Kunitz-type U1-aranetoxin-Av1a.</p> <p>Organismo: Aranha - <i>Araneus ventricosus</i>.</p> <p>Função: Inibidor do tipo kunitz.</p> <p>UniProtKB: Q8T357.</p>

Representação das sequências de inibidores de serino peptidases encontrados em nossas buscas (quadro cinza). As informações foram adaptadas do UniProt³. Detalhes de cada proteína se encontram no quadro amarelo. Em destaque (vermelho) estão as sequências de aminoácidos encontradas em diferentes moléculas do VTs e que auxiliaram na seleção dos peptídeos para síntese.

O primeiro inibidor do tipo kunitz foi isolado e caracterizado a partir da soja em 1945 (MOSOLOV; VALUEVA, 2005). Os inibidores do tipo kunitz são bem estudados e vários trabalhos científicos sobre esta família de inibidores de serino proteases estão disponíveis na literatura. Apesar de serem primeiramente descritos como moléculas componentes de leguminosas, os inibidores do tipo kunitz estão presentes de forma ubíqua em microrganismos, animais e plantas (WAN et al., 2013b). Além disso, já foram relatadas a presença destas moléculas em venenos de serpentes, aranhas e escorpiões (RANASINGHE, MCMANUS, 2013; WAN et al., 2013b). São moléculas compostas, geralmente, por até 60

³ UniProt, disponível em: <https://www.uniprot.org/>

aminoácidos estabilizados por três ligações dissulfeto, sendo alguns destes inibidores capazes de exercer ação sobre a tripsina, quimotripsina e elastase. Por exemplo, o inibidor kunitz denominado BbCI, purificado a partir de sementes de *Bauhinia bauhinoides* (OLIVA; SAMPAIO, 2009) foi capaz de reduzir a inflamação pulmonar em camundongos induzida pela elastase, mostrando um possível potencial terapêutico para a DPOC (ALMEIDA-REIS et al., 2017). Desta maneira, estruturas moleculares de inibidores do tipo kunitz poderiam nos auxiliar na seleção das sequências peptídicas para nossos estudos.

Apesar de serem moléculas constituintes de vários venenos animais, inibidores do tipo kunitz ainda não foram descritas no veneno do escorpião *T. serrulatus*. Porém, com base na identificação das sequências peptídicas **LLPK** e **LLPKV** em moléculas presentes em algumas frações da peçonha, tivemos acesso às informações relativas aos transcriptomas das glândulas de veneno do escorpião amarelo, recentemente publicado por De Oliveira e colaboradores (2018) onde, pela primeira vez, encontramos em um dos transcritos informações sobre uma possível molécula similar ao peptídeo U1-aranetoxin-Av1a, um inibidor do tipo kunitz já descrito na aranha *Araneus ventricosus* (**Figura 17**).

Figura 17 - Sequências da U1-aranetoxin-Av1a e da molécula presente no transcriptoma da glândula de peçonha do *T. serrulatus*

A	<div> <div>U1-aranetoxin-Av1a</div> <div> MPFHYFPKLNPIWIPGWIPGLGKDRLLPKVTGPCKASLTRYYYDKDTKACVEFI YGGCRGNRRNNFKRK DECEKACTDH </div> </div>
B	<div> <div>Transcrito <i>T. serrulatus</i></div> <div> MSSGFGCCPDGKTPAGGPDFRGCPCHTAPFGCCPDGATVARGSNFEGCSQAPSFP VTKGAGEVCSLPKERGSCCHNYTVKWFFDMNYGGCSRFWYGGCDGNGNRFHTQE ECGRVCVSPEGTDALLPKVVGCEGSYSSYFDQSSGECRSFVYGGCLGNNNRFE TEELCRQCVQGETSVSSDICTLPKAEGPCRAAIPRWYYDSASGKCEQFYFG </div> </div>

Em (A) representação da sequência do inibidor U1-aranetoxin-Av1a da aranha *Araneus ventricosus* (Q8T3S71). Em (B) representação da sequência obtida de um transcrito de glândulas do veneno do *T. serrulatus*. Essas duas sequências possuem similaridade em relação a inibidores de serino proteases do tipo kunitz. Em azul temos as sequências que se alinharam, em vermelho a sequência em comum contendo os aminoácidos **LLPKV** e em laranja as três ligações dissulfeto que se alinharam. Em (B) vale apenas destacar em negrito a provável região da metionina inicial da molécula.

Na tentativa de encontrarmos moléculas menores capazes de modular a atividade da elastase, selecionamos os seguintes peptídeos para síntese: FT**LLPK** (F14), **LLPKV**QLLAE (F14), **LLPKVDS** (F9) e **FLLPK** (F12) dentre outros pré-candidatos encontrados em nossas análises (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Lista com alguns dos peptídeos contendo as sequências de aminoácidos LLPK ou LLPKV presentes no VTs

Sequência	Fração
FLLLPKV	F18C
LGSKLLPKV	F12
KIKELLPKV	F12
LGSKLLPKV	F12
FLLPKV	F12
LLPKVVGLK	F12
KETNAKPPALLPKV	F12
KIKETNAKPPALLPKV	F12
LLPKVQLLAE	F14
VVHLLPKV	F14
VVHLLPKVR	F14
LVKLLPKV	F14
LVKLLPKV	F14
KILLPKVR	F14
KEKLLPKVV	F14
LLPKVFLAK	F14
LLPKVVGKRE	F9
FLLPK	F12
LALLPK	F12
LVGGLLPK	F12
KIIEALLPK	F14
FTLLPK	F14
KIIEALLPK	F14
LLPKVDS	F9

Em vermelho: as sequências selecionadas para síntese. Em negrito: LLPK / LLPKV.

E por fim, dentre as sequências obtidas, notamos a presença de possíveis peptídeos quiméricos na peçonha do *T. serrulatus*. Estes peptídeos receberam esta denominação, pois são formados a partir de dois fragmentos de proteínas de toxinas com funções distintas. O primeiro deles, de sequência **KEILGKIKETNAKPPA** (F9), possui sua porção N-terminal proveniente do peptídeo Ts19 e a porção C-terminal das hipotensinas. O segundo peptídeo quimérico identificado foi o de sequência **KETNAKPPALLPKV** (F12), cuja porção N-terminal pode ter se originado novamente de uma hipotensina, tendo na porção C-terminal a sequência **LLPKV** já discutida acima. A **Figura 18** demonstra a possível origem dos peptídeos quiméricos selecionados para a síntese.

Figura 18 - Possíveis origens dos peptídeos quiméricos identificados no veneno do *T. serrulatus*

Representação dos possíveis peptídeos quiméricos encontrados. (A) peptídeo formado com as combinações de fragmentos do Ts19 (P868222), destacados com a linha vermelha e das hipotensinas I (P84189) e II (P84190), destacado com a linha azul. A demarcação em roxo designa sequências comuns aos dois peptídeos. (B) Em destaque na linha azul, mais uma vez, fragmentos das hipotensinas e em laranja a sequência LLPKV.

O que se descreve sobre a possível origem de proteínas desse tipo é a presença de genes quiméricos, que dão origem a novos genes através da mistura de genes distintos podendo gerar novas proteínas funcionais (ROGERS; BEDFORD; HARTL, 2009). Um caso que naturalmente ocorre é em relação ao gene Jingwei da *Drosophila*, que é capaz de criar uma nova enzima álcool desidrogenase mais eficaz, que atua sobre álcoois de cadeias longas e dióis presentes no metabolismo de hormônios de crescimento e feromônios (ZHANG et al., 2004). Para a verificação dessa possível abordagem seria necessário o conhecimento do genoma do *T. serrulatus*, que permitiria a identificação das posições e prováveis mutações que poderiam ocorrer nos genes responsáveis pelas origens das moléculas quiméricas. Outra hipótese é a ação de enzimas que atuariam formando peptídeos quiméricos após os processos de modificações pós-traducionais. As acil-enzimas podem trabalhar na formação de peptídeos antigênicos oriundos de *splicing* realizado no proteossomo, porém esse processo não ocorre de maneira intermolecular (VIGNERON et al., 2004; WARREN et al., 2006). No trabalho de Verano-Braga (2013) são descritos os fragmentos **KEILGKIKE** e **TNAKPPA**, que poderiam originar uma das sequências quiméricas aqui reportadas (**KEILGKIKETNAKPPA**) pela ação de alguma enzima ligase ainda não descrita.

Parte das sequências quiméricas identificadas pertence às hipotensinas, que foram inicialmente descritas em 2008 por Verano-Braga e colaboradores, sendo identificadas a partir

de análises proteômicas com o VTs. São peptídeos de 25 aminoácidos que contêm duas prolinas consecutivas em sua porção C-terminal. Em relação à diferenciação entre as hipotensinas, a denominada I apresenta o resíduo de glutamina na posição 15 e a II apresenta um ácido glutâmico nesta mesma posição. Testes envolvendo a hipotensina I demonstraram que esse peptídeo foi capaz de exercer atividade hipotensora em ratos Wistar normotensos através da potencialização da bradicinina. A hipótese sobre o efeito vasodilatador apresentado é em relação à liberação de NO por um mecanismo independente da inibição da ECA (VERANO-BRAGA et al., 2008).

Como pôde ser observada, a dificuldade para se escolher cerca de uma dezena de sequências dentre as mais de 700 apresentadas demandou uma profunda busca nos bancos de dados e literatura. O espectro de cada sequência identificada se encontra no **Apêndice B**. Todos os espectros foram manualmente validados com o auxílio do *software* Xcalibur. Os peptídeos escolhidos para a síntese foram nove sequências ainda não estudadas: três provenientes do Ts19 (TsP3 - TsP5), quatro com a sequência LLPKV ou LLPK (TsP6 – TsP9), e os dois peptídeos quiméricos (TsP1 e TsP2); e duas já hipotensinas conhecidas (Hipo1 e Hipo2).

A **Tabela 9** descreve a sequência dos peptídeos sintéticos e o código de identificação adotado para cada uma.

Tabela 9 - Nomenclatura utilizada para a representação das sequências peptídicas sintéticas

Sequência	Código
KEILGKIKETNAKPPA	TsP1
KETNAKPPALLPKV	TsP2
GKGKEILGKIKE	TsP3
KEILGKIKE	TsP4
GKGKEILGKIKEKIIEA	TsP5
FTLLPK	TsP6
LLPKVQLLAE	TsP7
LLPKVDS	TsP8
FLLPK	TsP9
AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA	Hipo1
AEIDFSGIPEDIKEIKETNAKPPA	Hipo2

4.2 Caracterizações dos peptídeos identificados na peçonha

Para a caracterização dos peptídeos sintéticos, iniciamos os estudos referentes às possíveis modulações exercidas sobre as enzimas elastase, tripsina, ECA e NEP. Estas enzimas foram escolhidas para nossos estudos por serem consideradas de importância médica, onde modulações das mesmas ocasionadas por peptídeos da peçonha podem ter relação com alguns sintomas apresentados em acidentes graves, como edema pulmonar, pancreatite e hipotensão (**Figura 19**).

Figura 19 - Possíveis modulações e manifestações decorrentes da interação de peptídeos identificados na peçonha do *T. serrulatus* com enzimas de importância médica

Esta representação demonstra a possível interação de peptídeos da peçonha com enzimas que regulam importantes funções biológicas. As enzimas empregadas nos estudos foram duas serino peptidases, elastase, que pode ter envolvimento em casos de edema pulmonar, e a tripsina, que pode ter envolvimento em casos de pancreatite. Também foram estudadas as metalopeptidases ECA e NEP, envolvidas no controle da pressão arterial (PA). Imagem adaptada de Macrovector/Freepik⁴.

Os resultados referentes às modulações das quatro peptidases estudadas ocasionadas pelos peptídeos sintéticos estão apresentados a seguir (**Figura 20**).

⁴ Macrovector/Freepik, disponível em: <http://www.freepik.com>

Figura 20 - Quadro contendo o resultado dos testes cinéticos envolvendo as modulações das enzimas elastase-1, tripsina, ECA e NEP através da interação com os peptídeos sintéticos

	Serino peptidases				Metalopeptidases			
	Elastase-1		Tripsina		ECA		NEP	
	Aumento da atividade	Inibição	Aumento da atividade	Inibição	Aumento da atividade	Inibição	Aumento da atividade	Inibição
TsP1	4%	-	-	6%	28%	-	-	53%
TsP2	15%	-	6%	-	54%	-	-	32%
TsP3	13%	-	5%	-	87%	-	-	41%
TsP4	-	5%	-	5%	52%	-	-	27%
TsP5	63%	-	117%	-	104%	-	-	7%
TsP6	4%	-	33%	-	42%	-	-	40%
TsP7	9%	-	-	3%	21%	-	-	9%
TsP8	13%	-	-	13%	-	2%	-	25%
TsP9	1%	-	-	18%	-	13%	-	13%
Hipo1	43%	-	27%	-	64%	-	-	75%
Hipo2	38%	-	34%	-	44%	-	-	11%

Os resultados foram obtidos através da incubação das respectivas enzimas com seus respectivos substratos FRET na presença de 10 μ M dos peptídeos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados mais relevantes estão destacados em vermelho, sendo considerados $\geq 30\%$. Os principais destaques ficam por conta do TsP5, capaz de aumentar a atividade da maioria das enzimas testadas e das hipotensinas, onde a I foi capaz de inibir a NEP e a II não apresentou inibição satisfatória.

Os resultados acima, sobre inibição ou aumento da atividade das peptidases, serviram como base para o direcionamento dos experimentos com os peptídeos. A discussão destes resultados, juntamente com os estudos dedicados a cada peptidase será exibida a seguir.

4.2.1 Modulação da elastase

No escorpionismo, o edema pulmonar se caracteriza pela dificuldade respiratória, identificação de espuma ou manchas de sangue na boca ou narinas ou observadas durante a intubação. Em um levantamento sobre casos de acidentes por escorpiões das espécies *T. bahiensis* e *T. serrulatus* na região de Campinas, São Paulo, foram reportados 17 casos de edema pulmonar, com um óbito registrado referente a uma criança de seis anos (BUCARETCHI et al., 2014).

Pelo risco de desenvolvimento de edema pulmonar em casos graves, a tendência das toxinas dos escorpiões do gênero *Tityus* acometerem os pulmões vem sendo notificada na literatura. Em um trabalho realizado em carneiros envolvendo a injeção subcutânea do veneno do escorpião *T. discrepans*, demonstrou-se que o órgão mais afetado foi o pulmão, que apresentou colapso das paredes, injúria difusa da barreira capilar alveolar, necrose e uma forte

infiltração de neutrófilos (D'SUZE et al., 2004). Essas mesmas características foram notadas em experimentos com o veneno do *T. serrulatus* em camundongos (PANEQUE PERES et al., 2009). Estudos recentes demonstraram que o veneno do *T. serrulatus* é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) em células epiteliais brônquicas humanas *in vitro* (RIGONI et al., 2016). Confirmando este fato, estudos *in vivo* com a injeção de veneno total de *T. serrulatus* por via endovenosa em ratos, demonstraram envenenamento severo nos animais com a presença de edema nas vias aéreas com participação das citocinas IL-1 β e IL-6 no processo inflamatório (MIYAMOTO et al., 2018).

Alguns fatores são relacionados com o quadro de edema pulmonar, sendo apontados como principais as disfunções hemodinâmicas e a liberação de substâncias capazes de aumentar a permeabilidade vascular nos pulmões, mas o mecanismo por trás desta patologia ainda é considerado obscuro (PUCCA et al., 2015a). Assim, a elastase neutrofílica, uma vez desregulada em relação aos seus mecanismos naturais, pode causar distúrbios à barreira de permeabilidade pulmonar pela degradação da elastina e induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias levando a lesões pulmonares agudas (LEE; DOWNEY, 2001; KAWABATA; HAGIO; MATSUOKA, 2002). Assim, acreditamos que peptídeos envolvidos na desregulação desta enzima podem ter importância nos casos de acidentes.

Observa-se que a maioria dos peptídeos estudados aumentou a atividade enzimática da elastase. Como exceção, o TsP4 apresentou fraca inibição desta protease (5%). Os resultados com as moléculas TsP6, TsP7, TsP8 e TsP9, que foram baseados na presença dos aminoácidos **LLP**, **LLPK** e **LLPKV** em suas sequências primárias, foram considerados insatisfatórios. Nossa expectativa era ao menos algum tipo de interação com a elastase-1, por conta do direcionamento feito por nossos critérios de seleção. Certamente este grupo de moléculas, muito encontrado em nossos espectros (a sequência LLP está presente em mais de 70 peptídeos da nossa lista - **Apêndice A**), não participa da modulação da elastase-1.

Deste modo, o destaque ficou por conta de moléculas capazes de aumentar a atividade da elastase-1. Este resultado era esperado, pois as frações onde foram encontrados os peptídeos tiveram a característica de potencializar a atividade da enzima (F9, F12 e F14 – **Tabela 7**). O TsP5 aumentou a atividade de hidrólise do substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp pela elastase em 63%, a hipotensina I aumentou em 43% e a hipotensina II aumentou em 38%. Atualmente o que se sabe sobre moléculas capazes de aumentar a atividade de enzimas (revisado por ZORN, WELLS; 2010) é que o mecanismo de Michaelis-Menten não é facilmente aplicável. Geralmente, a maioria destas moléculas atua em sítios alostéricos e os mecanismos de aumento de atividade envolvidos são principalmente divididos em quatro

classes. A primeira envolve a constante presença do substrato e a ativação de um sítio alostérico. A segunda envolve uma modificação pós-traducional irreversível, geralmente por proteólise, provocada pela ativação de um sítio de ligação da molécula que potencializa a atividade. A terceira ocorre pela alteração conformacional por uma subunidade reguladora onde a molécula se liga por uma ligação covalente ou por um complexo ligado ao sítio catalítico. A quarta classe necessita de uma oligomerização do domínio catalítico para gerar o aumento na atividade.

Como os peptídeos TsP5, Hipo1 e Hipo2 foram capazes de aumentar a atividade da elastase-1, resolvemos testar os mesmos em relação a elastase leucocitária humana (elastase-2). Os resultados apontaram características similares de aumento da atividade da enzima, onde a TsP5 aumentou em 74%, Hipo 1 em 22% e a Hipo 2 em 25%. Este resultado era esperado por conta das semelhanças catalíticas apresentadas pelas duas enzimas (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Por ser a elastase-2 humana uma enzima com custo elevado, ela só foi empregada neste experimento mais refinado.

Como os resultados sobre porcentagem de ativação da elastase fora obtidos em fluorímetro, o próximo passo foi estudar estes peptídeos em sistema de HPLC para observar se os mesmos poderiam ser substratos desta serino protease. A incubação foi feita em tampão Tris (50 mM), pH= 8,0 por duas horas a 37° C (**Figura 21**).

Figura 21 - Cromatogramas das incubações dos peptídeos TsP5, Hipo1 e Hipo2 com a elastase-1

As incubações foram realizadas em tampão Tris 50 mM, pH 8,0 por duas horas a 37° C. Acima estão representados à esquerda e à direita, respectivamente, as amostras dos controles negativos e experimentais. (A) Tsp5, (B) Hipo 1 e (C) Hipo 2. As setas azuis indicam o peptídeo não consumido. Os produtos de hidrólise foram considerados $\leq$ a 50%. O gradiente empregado (linha azul) foi de 20% a 60% de solvente B em 20 min (1,25% B/min, fluxo 1mL/min, absorvância a 214 nm). Coluna Restek Ultra C-18 5 μ m, 250 x 4,6 mm.

Como pôde ser observado na **Figura 21**, os três peptídeos se comportaram como substratos da elastase, o que nos leva a duas possíveis teorias sobre o aumento da atividade da mesma. A primeira envolve a participação de algum dos produtos formados pela hidrólise como molécula responsável pelo aumento da atividade da enzima. Mesmo sendo plausível, este sistema envolveria competição constante entre o substrato FRET empregado e os peptídeos sintéticos. A segunda envolve a interação direta do peptídeo com a elastase, deixando-a mais ativa com consequente degradação do próprio peptídeo ativador.

Muitos substratos proteicos e peptídicos são reportados para a elastase, que apresenta especificidade primária para a hidrólise de sequências com resíduos de aminoácidos de cadeias laterais não volumosas nas posições P1. Assim, a elastase apresenta preferência para clivagem após os resíduos Ala, Ser, Gly e Val (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Os resíduos Ala, Ser e Val são encontrados nos três peptídeos em questão e podem representar sítios de hidrólise putativos da elastase. Apesar de mais experimentos serem necessários para entendermos este fenômeno, é importante ressaltar que a atividade excessiva da elastase causada pelos três peptídeos *in vitro* pode ter alguma correlação com o edema pulmonar agudo nos casos de escorpionismo.

Assim, o próximo passo foi o estudo dos peptídeos TsP5, Hipo1 e Hipo2 em cultura de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos naïve para avaliação da viabilidade celular por MTT e a liberação dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , MCP-1 e TNF. Os peptídeos causaram diminuição da viabilidade celular, possuindo ação citotóxica intermediária entre 60% [10 $\mu\text{g/mL}$] e 80% [50 $\mu\text{g/mL}$], mas de forma não dose dependente. As hipotensinas aumentaram os níveis de TNF em doses de 100 $\mu\text{g/mL}$ e a Hipo2 aumentou a expressão de IL-6 nesta mesma dose (**Figura 22**). Os níveis dos outros mediadores não foram alterados (dados não mostrados).

Figura 22 - Viabilidade celular, liberação de TNF e IL-6 utilizando os peptídeos TsP5 e as hipotensinas em cultura de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos naïve.

Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c naïve foram cultivados por 24 horas na presença dos peptídeos. Células cultivadas somente com meio ou na presença de 5 µg/mL de LPS foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. As concentrações de TNF e IL-6 foram determinadas pelo método de CBA, de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. * $p < 0,05$.

Recentemente, Pucca et al. (2016c) demonstraram o efeito pró-inflamatório de três peptídeos derivados do veneno de *Tityus serrulatus* sobre uma linhagem de macrófagos murinos, com aumento da produção de IL-6. Como no nosso caso, os efeitos foram sutis quando comparados aos do LPS, apesar de significativos em relação ao controle negativo. Em nosso estudo, observamos aumento da produção de TNF na presença das hipotensinas e aumento da produção de IL-6 na presença da hipotensina II. Em um trabalho sobre a liberação de citocinas envolvidas no edema pulmonar induzido em camundongos por peçonha de *T. bahiensis* e *T. serrulatus*, foi demonstrada a importância de agentes pró-inflamatórios para o desenvolvimento do quadro de edema pulmonar, onde a IL-6 foi encontrada apenas em pulmões afetados pelas toxinas do *T. serrulatus* (MIYAMOTO et al., 2018). Os níveis de neutrófilos também estão aumentados após quatro horas da injeção da peçonha de *T. serrulatus* e é sabido que a IL-6 acelera a liberação de neutrófilos da medula para o sangue, tornando estas células sujeitas a ficarem retidas na microcirculação dos pulmões (MIYAMOTO et al., 2018). Assim, moléculas capazes de induzirem a liberação de neutrófilos e direcioná-los para os pulmões, juntamente com potencial de aumentarem a atividade catalítica da elastase, podem ter importante ação nos casos de edema pulmonar.

A literatura demonstra que a soroterapia é de extrema importância para o tratamento de vítimas de escorpionismo, porém os cuidados médicos são fundamentais para a melhora dos quadros clínicos mais graves, como o edema pulmonar (BUCARETCHI et al., 2014; CUPO 2015). Porém, em alguns casos os benefícios da soroterapia são controversos, não revertendo mudanças hemodinâmicas e o edema pulmonar (BUCARETCHI et al., 2014). Assim, o que poderia explicar os adventos decorridos do envenenamento mesmo após a administração de soroterapia seria a presença de toxinas que não são reconhecidas e consequentemente não neutralizadas pelo soro. A partir destes fatos, resolvemos avaliar a capacidade dos dois antivenenos comerciais empregados no tratamento das vítimas (soros antiescorpiônico e antiaracnídico produzidos pelo instituto Butantan) em reconhecer os peptídeos sintéticos. Com esta finalidade, realizamos um *dot blot* (**Figura 23**). Além dos peptídeos sintetizados no presente trabalho, também estudamos o reconhecimento dos peptídeos YLPT ([des-Arg¹]-Proctolin), RYLPT (proctolin), FTR e KEILG, que foram identificados e caracterizados em estudos anteriores (DUZZI, 2014).

Figura 23 - *Dot blot* dos peptídeos sintéticos identificados no VTs juntamente com os soros antiescorpionico e antiaracnido

Membrana de nitrocelulose com a incubação dos peptídeos do escorpião *T. serrulatus* com os soros antiescorpionico (09051041A) (A) e antiaracnido (0706121) (B) produzidos pelo Instituto Butantan. Os soros foram diluídos na proporção 1:7500. Foram aplicados 5 µg de cada respectiva amostra. Nenhum peptídeo foi reconhecido pelo soro. VTs = Veneno Total do *T. serrulatus* (controle positivo); BSA = Albumina do Soro Bovino (controle negativo).

Assim demonstramos que estes pequenos peptídeos não são imunogênicos, podendo contribuir para a possível explicação de sintomas que persistem nos casos de acidentes, mesmo após a administração dos antivenenos comerciais.

Para confirmação de nossa teoria sobre a ação dos peptídeos TsP5, Hipo 1 e Hipo 2 em quadros de edema pulmonar, necessitaremos realizar experimentos futuros *in vivo*. Estes dados poderão nos auxiliar na criação de soros mais eficazes, contribuindo no tratamento das vítimas.

4.2.2 Modulação da tripsina

A tripsina é uma serino peptidase produzida no pâncreas em sua forma inativa, denominada tripsinogênio, que é ativada no duodeno em condições fisiológicas normais pela ação da enzima enteroquinase (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). É responsável por auxiliar na digestão e ativar outras enzimas produzidas pelo pâncreas em forma de zimogênio (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Assim, a ativação prematura do tripsinogênio no interstício pancreático pode levar a ativação local de outros zimogênios que, por sua vez, pode levar a autodigestão da glândula evoluindo para um quadro de pancreatite aguda.

A ocorrência de pancreatite é descrita em casos de acidentes por escorpiões do gênero *Tityus* (FLETCHER et al., 2010; FLETCHER et al., 1994) e, por conta disso, resolvemos investigar a modulação da tripsina pelos peptídeos sintéticos.

A respeito dos resultados, a única molécula que apresentou uma moderada inibição da tripsina (18%) foi o peptídeo TsP9 (**FLLPK**). Porém, mais uma vez, os resultados que nos chamaram à atenção foram peptídeos presentes no VTs capazes de aumentar a atividade da tripsina: TsP5 (117%), TsP6 (33%), hipotensina I (27%) e hipotensina II (34%). O peptídeo TsP6 (**FTLLPK**), cuja sequência é similar a do peptídeo TsP9 (**FLLPK**), que se comportou como um inibidor, demonstra a mudança radical no comportamento da molécula perante a tripsina. A diferença entre estes dois peptídeos é apenas a inclusão de uma treonina na posição 2, indicando que pequenas diferenças nas sequências primárias das moléculas podem mudar completamente sua atividade. Este tipo de comportamento já ficou evidenciado por nosso grupo em estudos com o VTs, onde apresentamos os pentapeptídeos de sequências KELLG, um inibidor competitivo da timet oligopeptidase (K_i 84 μ M) e KEILG, um inibidor não competitivo da mesma enzima (K_i 16 μ M) (CARVALHO et al., 2012). O TsP6 exerceu atividade citotóxica intermediária, diminuindo a viabilidade celular para cerca de 60% a 85% nas concentrações de 10 μ g/mL e 50 μ g/mL, respectivamente (dados não mostrados).

Da mesma maneira como foi feito com a elastase, os peptídeos que aumentaram a atividade da tripsina foram incubados com a enzima para verificação da susceptibilidade dos mesmos à hidrólise (**Figura 24**).

Figura 24 - Cromatogramas das incubações dos peptídeos TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2 com a tripsina

As incubações foram realizadas em tampão Tris 50 mM, pH 8,0 por duas horas a 37 °C. Acima estão representados à esquerda e à direita, respectivamente, as amostras dos controles negativos e experimental (**A**) Tsp5, (**B**) Tsp6, (**C**) Hipo 1 e (**D**) Hipo 2. As setas azuis indicam o peptídeo não consumido. Os produtos de hidrólise foram considerados $\leq 50\%$. O gradiente empregado (linha azul) foi de 20% a 60% de solvente B em 20 min (1,25% B/min, fluxo 1mL/min, absorbância a 214 nm). Coluna Restek Ultra C-18 5 μ m, 250 x 4,6 mm.

Diferentemente da elastase os peptídeos capazes de aumentarem a atividade da tripsina, com exceção do TsP5, não se comportaram como substratos da enzima. Esta não degradação era esperada para o TsP6, uma vez que o mesmo não possui resíduos preferidos pela tripsina para a hidrólise (clivagens após Lys e Arg). Por outro lado, a hidrólise das hipotensinas era esperada, uma vez que estas apresentam três resíduos de lisina em suas sequências. Dois pontos de hidrólises das hipotensinas foram preditas quando da utilização da ferramenta ExPASy PeptideCutter⁵; pós K14 e pós K17. Porém, a ausência de clivagem pode ser explicada por conta da presença de uma Ile na posição P2 das duas regiões susceptíveis, responsável por diminuir a atividade proteolítica da tripsina de 2 a 16 vezes (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

Estudos de aspecto morfológico de células pancreáticas acinares incubadas com o veneno do *T. serrulatus* demonstraram a presença de largos vacúolos intercelulares e um desarranjo da maioria dos grânulos de zimogênios, com aparecimento de material secretório no lúmen acinar (FLETCHER; POSSANI; FLETCHER, 1994). Portanto, peptídeos capazes de aumentarem a atividade enzimática da tripsina, como foi o caso do TsP5, podem acarretar desestabilização homeostática e acelerar a formação de enzimas ativas no pâncreas capazes de gerar um quadro inflamatório referente a pancreatite aguda. Lembrando que este peptídeo não foi reconhecido pelos soros comerciais produzidos pelo Instituto Butantan.

4.2.3 Modulação da enzima conversora de angiotensina I.

Sendo a hipotensão e a hipertensão sintomas recorrentes em acidentes por *Tityus* (BUCARETCHI et al., 2014), estudos relacionados à modulação da atividade enzimática da ECA pelos peptídeos sintéticos foram efetuados.

Não foram constatados inibidores representativos da ECA, porém como moléculas capazes de aumentar a atividade desta enzima tivemos os peptídeos TsP2 (54%), TsP3 (87%), TsP4 (52%), TsP5 (104%), hipotensinas I (64%) e hipotensina II (44%). Nenhum destes peptídeos foi clivado pela ECA em nossos testes de estabilidade (dados não mostrados).

A presença de moléculas capazes de aumentarem a atividade da ECA pode ter relação com os casos de hipertensão apresentados. Além disso, a ECA pode estar envolvida diretamente com alguns sintomas do envenenamento, onde em um trabalho recente do nosso grupo purificou e caracterizou uma ECA-símile da peçonha (CAJADO-CARVALHO et al., 2016), que poderia ter sua eficiência catalítica aumentada por conta da ação destes peptídeos.

⁵ ExPASy PeptideCutter, disponível em: https://web.expasy.org/peptide_cutter/

Sobre a estrutura primária dos peptídeos envolvidos no aumento da atividade, observamos que os fragmentos provenientes da Ts19 tiveram diminuição da eficácia ativadora conforme a diminuição do número de resíduos de suas sequências primárias (TsP5 > TsP3 > TsP4), como visto na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Possíveis criptídeos da Ts19 e a modulação da ECA

Peptídeo	Sequência	Aumento da atividade da ECA
TsP3	GKGKEILGKIKE	87%
TsP4	KEILGKIKE	52%
TsP5	GKGKEILGKIKEKIIEA	104%

Assim, sugerimos um sítio de interação estendido da ECA com esta família de peptídeos, onde o peptídeo de maior sequência apresentou o melhor potencial ativador. Estas observações estão de acordo com resultados obtidos anteriormente a este trabalho, onde o menor fragmento do Ts19 por nós já identificado no VTs (KEILG) foi incapaz de modular a ação da ECA (DUZZI, 2014).

As hipotensinas também foram capazes de aumentar a atividade da ECA em nosso modelo. No trabalho de Verano-Braga (2008), a hipotensina I foi considerada uma molécula que não tinha interação com a ECA no modelo por eles testado, porém resulta em hipotensão *in vivo* por ação direta no receptor B2.

Mais uma vez, a peculiar diferença de um resíduo de aminoácido entre as hipotensinas I e II foi suficiente para alterar significativamente seus comportamentos de interações com a ECA, com uma diferença de aproximadamente 20% de eficácia entre elas.

Como o TsP2 possui semelhanças com as hipotensinas, decidimos realizar experimentos com a injeção endovenosa do peptídeo [600 µg/kg] em ratos normotensos anestesiados, com monitoramento da pressão arterial média. Não foram observadas alterações da pressão arterial por ação do peptídeo (dados não mostrados). Assim, empregando o mesmo modelo, realizamos experimentos para avaliar a capacidade do TsP2 em potencializar a ação da bradicinina, característica esta atribuída às hipotensinas. A bradicinina foi administrada na dose de 3 µg/kg anteriormente a injeção do peptídeo e posteriormente, após 5 e 20 minutos para avaliar a potencialização do seu efeito (**Figura 25**).

Figura 25 - Potencialização da bradicinina pelo peptídeo TsP2

Efeito hipotensor da bradicinina (BK) potencializado pelo peptídeo TsP2. Após 10 minutos, aguardados para estabilização hemodinâmica (valores basais), foi injetada (i.v.) a bradicinina [3μg/kg]. Passando-se 10 minutos, foi injetado o peptídeo TsP2 [200μg/kg]. Novas doses de BK foram injetadas após 5 e 20 minutos, onde houve potencialização do efeito da BK nos dois tempos testados através das variações da pressão arterial média (ΔPA) (n=7). *p< 0,05.

Embora o TsP2 tenha provocado aumento da atividade da ECA nos estudos *in vitro*, ao contrário do esperado, o mesmo foi capaz de potencializar o efeito da bradicinina, demonstrando que pode ser mais uma molécula envolvida nos quadros de hipotensão apresentados no escorpionismo. É interessante observar que as hipotensinas I e II são capazes de provocar hipotensão *in vivo* independente da inibição da ECA (VERANO-BRAGA et al., 2008; VERANO-BRAGA et al., 2010), mas ambas as moléculas se comportaram como ativadores desta peptidase nos ensaios *in vitro* realizados neste trabalho (**Figura 20**). Estudos anteriores demonstraram a importância da dupla prolina C-terminal para exercer ação potencializadora da bradicinina pelas hipotensinas (VERANO-BRAGA et al., 2008; VERANO-BRAGA et al., 2010). A nossa hipótese é que o TsP2 (KETNAKPPALLPKV) pode ser convertida no peptídeo KETNAKPPA na circulação, um fragmento da hipotensina já descrito como potencializador da bradicinina (VERANO-BRAGA et al., 2008). Porém, outro mecanismo de ação do TsP2 *in vivo* pode ser responsável pelo efeito hipotensor observado.

4.2.4 Modulação da neprilisina

Com foco novamente nos quadros clínicos relacionados à hipotensão arterial observados em acidentes por *T. serrulatus*, decidimos por estudar a possível interação dos peptídeos sintéticos com a enzima neprilisina. A NEP possui papel no controle da pressão

arterial através da excreção de Na^+ e água, pois é capaz de degradar peptídeos natriuréticos (ANP, BNP, CNP) (ROQUES et al., 1993; RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Outro fato que nos levou a estudar a interação dos peptídeos com esta enzima baseou-se em observações anteriores do nosso grupo sobre a presença de um peptídeo capaz de inibir a NEP humana e uma NEP-like presente em baratas, o [des-Arg¹]-Proctolin (DUZZI et al., 2016), sugerindo que alguns alvos de toxinas podem ser similares entre insetos e humanos. O [des-Arg¹]-Proctolin foi uma molécula sequenciada anteriormente por nosso grupo (DUZZI, 2014), porém toda sua caracterização, inclusive o desenvolvimento de um modelo de estudos da NEP-like proveniente da cabeça de baratas foi, efetuada durante o doutorado (DUZZI et al., 2016). O [des-Arg¹]-Proctolin foi caracterizado como inibidor competitivo da NEP, apresentando uma constante de inibição de 0,94 μM . Uma vez que o artigo completo encontra-se publicado, decidimos pela não apresentação dos resultados.

Ao contrário do observado com as três peptidases estudadas no presente trabalho, o resultado envolvendo os peptídeos testados com a NEP revelou a presença de inibidores e ausência de moléculas capazes de aumentar a atividade da enzima. Destacaram-se os peptídeos TsP1 (53% de inibição) e hipotensina I (75% de inibição). Realizamos a incubação dos peptídeos TsP1 e hipotensina I com a enzima a 37 °C por 4 horas, para a análise em relação ao surgimento de pontos de clivagem. Não foram detectados pontos de hidrólise (dados não mostrados), demonstrando que o TsP1 e a Hipo 1 são inibidores da neprilisina.

Como já destacado, o mecanismo de ação sugerido sobre a hipotensão causada pela hipotensina I *in vivo* é a liberação de NO juntamente com a presença de bradicinina, mediado pelo efeito agonista nos receptores de bradicinina B₂ (VERANO-BRAGA et al., 2010). Em conjunto, nossos resultados com a hipotensina I parecem indicar um segundo mecanismo hipotensor envolvendo a NEP. Interessantemente, a hipotensina I, que apresentou fraca inibição da atividade catalítica da NEP, teve comportamento muito distinto daquele observado nos estudos com a hipotensina II. Este fato é, provavelmente, resultado de uma única diferença entre as estruturas primárias entre as hipotensinas, ou seja, a presença de glutamina na posição 15 na hipotensina I, ao invés de um ácido glutâmico presente na hipotensina II.

O mecanismo de ação inibitória da hipotensina I sobre a atividade catalítica da NEP foi determinado. A molécula de comportou como um inibidor não competitivo da NEP, apresentando a constante de inibição (K_i) de 4,35 μM (**Figura 26**). A determinação do mecanismo e K_i da hipotensina II sobre a atividade da neprilisina não foram realizadas uma vez que este peptídeo apresentou fraca interação com a peptidase.

Figura 26 - Determinação do mecanismo de ação da hipotensina I em relação à NEP

Lineweaver-Burk *plot* da inibição da NEP pela hipotensina I. A constante de inibição (K_i) foi determinada com o emprego de quatro concentrações de substrato Abz-RGFK-EDDnp (4 μ M, 6 μ M, 8 μ M e 10 μ M) com variação da concentração da hipotensina I (3 μ M e 4 μ M), mantendo fixa a quantidade de enzima (1,5 ng). Experimento realizado em triplicata.

Por conta dos diferentes níveis de inibição da NEP apresentados pelas hipotensinas I e II, resolvemos investigar se havia alguma diferença estrutural que pudesse explicar tal fenômeno. Para isso, realizamos ensaios de dicroísmo circular (**Figura 27**). O ensaio não demonstrou diferenças consideráveis entre as estruturas secundárias das duas hipotensinas que pudessem explicar comportamentos diferentes em relação à NEP.

Figura 27 - Espectros por dicroísmo circular das hipotensinas I e II

A leitura do espectro foi feita a 25 °C, com uma cubeta de quartzo com 1,0 mm de espessura. Os dados foram obtidos entre os comprimentos de onda 190 a 260 nm com um intervalo de 1 nm com um tempo de integração de dois segundos a cada comprimento de onda. Foram efetuadas as médias de quatro leituras com subtração do *background*. As estruturas foram calculadas através de deconvolução do espectro pelo software CDNN. O resultado sugere a presença de formação desordenada com um pouco de α -hélice (22,9% para Hipo1 e 18,3% para Hipo2) na estrutura secundária dos peptídeos.

Assim, as diferentes interações das hipotensinas com a NEP é, provavelmente, resultado de uma única diferença entre as estruturas primárias entre as hipotensinas, ou seja, a presença de glutamina na posição 15 na hipotensina I, ao invés de um ácido glutâmico presente na hipotensina II.

É importante ressaltar que pode existir uma ação sinérgica entre estes dois peptídeos presentes no VTs, a hipotensina I e o [des-Arg¹]-Proctolin, para a inibição da NEP e que este fato pode estar associado aos quadros de hipotensão associados com o escorpionismo.

4.3 Avaliação da interação do peptídeo FTR com receptores opioides em ratos Wistar

A busca por moléculas bioativas na peçonha de escorpiões está cada vez mais evidente e tem apontado por peptídeos, principalmente, como promissores protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (HMED et al., 2013; GHOSH et al., 2018). Em trabalhos anteriores, buscamos por moléculas presentes no VTs que pudessem interagir com a EP 24.15 (EC 3.4.24.15) e identificamos um tripeptídeo com a sequência FTR (DUZZI, 2014). Uma vez que a 24.15 é capaz de ativar ou degradar neuropeptídeos *in vitro* (RAWLINGS; SALVESEN, 2013), decidimos analisar o possível efeito antinociceptivo do FTR em ratos. Este tripeptídeo foi capaz de reverter o efeito do agente hiperalgésico carragenina e ainda promover maior resistência à dor *per se* (DUZZI, 2014).

Continuando sua caracterização, durante o doutorado decidimos estudar os mecanismos envolvidos em relação ao efeito antinociceptivo apresentado e investigar a ação do peptídeo através da sua administração por via oral. Primeiramente, foram realizados experimentos para a avaliação de efeito por administração oral (**Figura 28**), onde o peptídeo FTR foi administrado por gavagem em uma dose dez vezes maior (200 µg) que a utilizada em nossos experimentos envolvendo a injeção intraplantar em ratos Wistar.

Figura 28 - Experimento sobre nocicepção envolvendo administração do peptídeo FTR por via oral

Representação do experimento para avaliar o efeito antinociceptivo do peptídeo FTR administrado por via oral em ratos estimulados pela carragenina, um agente hiperalgésico. O peptídeo FTR não foi capaz de causar efeito antinociceptivo por essa via na dose administrada de 200 µg. O número de animais foi igual a 6.

Não foram observados efeitos antinociceptivos com a administração por via oral na dose utilizada. Provavelmente por se tratar de um peptídeo pequeno, e que apresentas as extremidades C- e N-terminais livres, o mesmo pode ter sido degradado por enzimas digestórias (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

Buscando o entendimento dos mecanismos envolvidos na antinocicepção apresentada, decidimos testar o FTR sobre uma possível ação nos receptores opioides. Analgésicos opioides são definidos como substâncias capazes de causarem efeitos semelhantes ao da morfina, possuindo a naloxona como antagonista (RANG et al., 2014). Os efeitos analgésicos são atribuídos a receptores opioides específicos que alteram a resposta neuronal de estímulos nociceptivos (YAKSH, 1999; DUARTE, 2005). Os principais receptores envolvidos nos efeitos dos opioides são o mu (μ), o kappa (κ) e o delta (δ) (DUARTE, 2005).

Para avaliar a ação do FTR em receptores opioides, confrontamos o peptídeo com a naloxona, um antagonista inespecífico destes receptores. A naloxona foi capaz de reverter os efeitos do FTR (**Figura 29**), demonstrando que há participação de ao menos um dos receptores opioides na antinocicepção apresentada, sendo a primeira vez que uma molécula com tal atividade é descrita no veneno do *T. serrulatus*.

Figura 29 - Avaliação da participação da via opioide na ação do peptídeo FTR pela administração da naloxona

Nesta representação temos os grupos: S (salina), P (peptídeo FTR), P+N (peptídeo FTR + naloxona) e N (naloxona). Observa-se efeito antinociceptivo em P, que é revertido em P+N, demonstrando a participação de receptores opioides na ação antinociceptiva apresentada.

Após determinação da via opioide como responsável pelo efeito antinociceptivo apresentado pelo peptídeo, direcionamos nossos estudos para a determinação do receptor envolvido. Para isso, experimentos empregando os antagonistas seletivos para os receptores opioides do tipo mu (CTOP), kappa (nor-BNI) ou delta (Naltrindol) foram realizados (**Figura 30**).

Figura 30 - Avaliação do receptor opioide envolvido na ação do peptídeo FTR pela administração de antagonistas seletivos

Ratos Wistar machos tiveram seu limiar basal mensurado (inicial) através do teste de pressão de patas e posteriormente receberam injeção i.pl. de carragenina na pata posterior direita (200 µg dissolvida em salina estéril). Após 2 h e 15 min desta injeção, os antagonistas seletivos para os receptores opioides do tipo mu (CTOP, 20 µg/pata – (A), kappa (nor-BNI, 50 µg/pata – (B) ou delta (Naltrindol, 50 µg/pata – (C) foram injetados no mesmo local. Como controle negativo, foi utilizada água estéril (veículo, 50 µL) e como controle farmacológico analgésico positivo, foi utilizado agonista opioide (morfina, 6 µg/pata – A, B e C). Após 15 min da injeção dos antagonistas, o peptídeo (P) FTR (20 µg/pata) foi injetado também no mesmo local (coxim plantar) e 30 min após esta última injeção (3 h após a injeção de carragenina), o limiar nociceptivo dos animais foi novamente mensurado. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$ em 3 h em relação ao grupo Água + Água.

Os resultados apontaram para a participação de receptores opioide do tipo delta, pois o Naltrindol conseguiu reverter os efeitos antinociceptivos do peptídeo FTR. Os receptores delta opioides são responsáveis pela analgesia, por modular funções cognitivas e de dependência física (MARTINS et al., 2012), onde o FTR poderia estar agindo de forma direta, ou indireta, através da liberação de Met-enkefalina, um agente opioide endógeno que se liga em receptores delta (SINGH et al., 1999). Para verificarmos qual mecanismo de ação, realizamos experimentos em ratos empregando um anticorpo anti-Met encefalina (**Figura 31**).

Figura 31 - Participação da Met-enkefalina no efeito analgésico do peptídeo FTR

Ratos Wistar machos tiveram seu limiar basal mensurado (inicial) através do teste de pressão de patas e posteriormente receberam injeção i.pl. de carragenina na pata posterior direita (200 µg). Após 2 h e 25 min desta injeção, o anticorpo anti-met encefalina (20 µg/pata) foi injetado no mesmo local e, após 5 minutos dessa injeção, o peptídeo (P) FTR (20 µg/pata) foi também injetado. Como controle negativo, foi utilizada água estéril (veículo, 50 µL). Após 30 min da injeção do peptídeo FTR (3 h após a injeção de carragenina), o limiar nociceptivo dos animais foi novamente mensurado. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação à medida inicial; # $p < 0,01$ em relação ao grupo Água + P.

Mesmo após o bloqueio da Met-enkefalina pelo anticorpo, foi observada a ação antinociceptiva do peptídeo FTR, sugerindo, desta maneira, uma ação direta do mesmo em receptores delta opioides.

Assim, o FTR pode ter fundamental papel no desenvolvimento biotecnológico em relação a analgésicos. Sua estrutura primária, contendo apenas três aminoácidos, pode servir como base para o desenvolvimento de novos fármacos. É interessante observar o que outras moléculas com ação antinociceptiva já foram purificadas a partir do veneno do escorpião

Buthus martensii Karsch, como AngM1, BmK IT-AP e BmK – YA, porém, são peptídeos de cadeias longas (CAO et al., 2004; DE LIMA et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

4.4 Estudos sobre os peptídeos quiméricos

Como demonstrado, encontramos inicialmente dois peptídeos quiméricos que continham em suas sequências primárias regiões de dois peptídeos distintos da peçonha. Estes peptídeos foram denominados TsP1 (fusão de regiões da Ts19 e hipotensinas) e TsP2 (fusão de regiões das hipotensinas com a sequência LLPKV, provavelmente oriunda do peptídeo *kunitz-like* por nós identificado no transcriptoma).

Para a confirmação da existência dos peptídeos quiméricos, decidimos realizar a busca dos mesmos em três diferentes lotes do veneno. As amostras foram igualmente processadas e fracionadas como descrito em nossos experimentos anteriores (item 3.1.1 em Material e Métodos). A coleta foi realizada de forma manual, entre as faixas das frações F9 a F13 pertencentes ao veneno inicialmente utilizado (regiões onde foram encontradas as sequências quiméricas) em comparação com os novos lotes (**Figura 32**).

Figura 32 - Cromatogramas comparativos dos perfis de baixa massa molecular do veneno empregado nos estudos iniciais e dos três diferentes lotes

Gradiente utilizado de 10-60% de solvente B em 40 minutos (solvente A: H_2O/TFA 0,01% e solvente B: $Acn/solvente$ A 9:1) sob fluxo de 1,0 mL/min. As frações foram selecionadas para a coleta através das regiões pertencentes as frações F9 a F13 do veneno inicialmente utilizado (regiões coletadas representadas pelos retângulos). Estas frações se referem às regiões onde foram encontrados os peptídeos quiméricos. Os cromatogramas indicam as comparações dos perfis e regiões de coleta entre a fração de baixa massa molecular da peçonha inicial do estudo (linha vermelha) e das novas frações dos lotes (linha preta), sendo (A) Lote1 – 2358, (B) Lote2 - 2145 e (C) Lote3 – 2200. Emprego de coluna Restek Ultra C-18 5 μm , 250 x 4,6 mm.

Ao compararmos os perfis cromatográficos dos diferentes lotes com o empregado inicialmente em nossos estudos, encontramos sutis diferenças entre eles. Isso pode ocorrer devido a adaptações e variações nas quantidades de alguns componentes da peçonha dos escorpiões. Um estudo realizado com a peçonha do *T. serrulatus* concluiu que estas variações podem acontecer por conta da idade, do tipo da dieta e tempo decorrido da última refeição do escorpião (PUCCA et al., 2014).

As nove frações coletadas foram secas e posteriormente analisadas por espectrometria de massas através de sequenciamento *de novo*. Nestas novas análises, obtivemos mais de 49 mil sequências primárias, que é cerca de setenta vezes superior à quantidade de sequências obtidas em nossas primeiras análises (mais de 700). Uma vez que as primeiras e as novas análises foram realizadas em espectrômetros de massas diferentes, LTQ Orbitrap Velos (ThermoScientific) e do Q Exactive Plus (Thermo Scientific), respectivamente, acreditamos que a maior quantidade de sequências obtidas esteja relacionada à sensibilidade do equipamento utilizado.

Mais uma vez, a análise ocorreu de maneira trabalhosa, onde as sequências foram comparadas, objetivando encontrar os peptídeos quiméricos ou evidências de formação dos mesmos.

Após as análises, empregando o *software* Peaks 8.5, levando em conta espectros com elevados valores de ALC, encontramos a sequência do peptídeo TsP2 (KETNAKPPALLPKV), confirmando sua existência como peptídeo do VTs (**Figura 33**).

Figura 33 - Espectro do peptídeo TsP2

Representação do espectro do peptídeo quimérico TsP2 presente no lote 2200, fração F02. O tempo de retenção desta fração correspondeu ao mesmo tempo da F12 do perfil de baixa massa molecular do veneno empregado originalmente.

Uma vez que o peptídeo TsP2 parece ser formado por regiões oriundas das hipotensinas e da molécula kunitz-like presentes no VTs, conforme descrito na **Figura 18**, focamos nossas buscas em fragmentos pertencentes à estas duas classes de toxinas. Assim, observamos novos fragmentos e outros possíveis peptídeos quiméricos originados destes grupos (hipotensinas e molécula kunitz-like). Tomando como referência a sequência do kunitz-like, identificamos vários fragmentos contendo a sequência LLPKV (**Figura 34**).

Figura 34 - Diferentes peptídeos derivados do processamento da molécula kunitz-like

Representação das transformações ocorridas em uma região da possível molécula kunitz-like identificada durante o transcriptoma. Estas sequências peptídicas foram encontradas em nossas análises por MS/MS. Em destaque (retângulo vermelho) a região contendo a sequência de aminoácidos LLPKVVG, possivelmente envolvida na formação de peptídeos quiméricos. Notam-se as diferentes transformações na região C-terminal do fragmento e de novas possíveis moléculas quiméricas, indicadas pelo asterisco (*).

Através do exposto, a região contendo a sequência LLPKV parece sofrer muitas variações, podendo apresentar extensões nas extremidades C- e N-terminais. Além disso, podemos observar a presença de possíveis novas moléculas quiméricas de origens ainda não identificadas. Estes resultados sugerem que os peptídeos TsP6, TsP7, TsP8 e TsP9 (FTLLPK, LLPKVQLLAE, LLPKVDS e FLLPK, respectivamente (**Tabela 9**), também podem ser classificados como quiméricos.

Quando tomamos como referência a sequência primária das hipotensinas, resultados semelhantes envolvendo processamentos destas toxinas foram obtidos. As evidências de nossas análises demonstraram que a possível origem da fração quimérica oriunda das

hipotensinas I e II para formação do TsP2 também pode ser oriunda de uma nova hipotensina, denominada hipotensina-*like* (P86824), uma vez que esta molécula também apresenta o fragmento KETNAKPPA na sua extremidade C-terminal (**Figura 35**)(RATES et al., 2008; ALVARENGA et al., 2012). Chamou-nos a atenção a grande quantidade de fragmentos provenientes desta hipotensina-*like*, incluindo novas possíveis sequências quiméricas (**Figura 35**). Esta hipotensina-*like* já foi evidenciada nos trabalhos envolvendo transcriptoma das glândulas de veneno do *T. serrulatus* publicados por Alvarenga et al. (2012) e Oliveira et al. (2018), onde tivemos acesso aos bancos de dados neste último. As transformações da hipotensina-*like* podem ser observadas na **Figura 35**.

Figura 35 - Diferentes peptídeos derivados do processamento da molécula hipotensina-*like*

Representação das transformações ocorridas em uma região da hipotensina-*like*. Estas sequências peptídicas foram encontradas em nossas análises por MS/MS. É possível observar as diferentes modificações ocorridas nos fragmentos intramoleculares. As diferentes cores indicam as possíveis regiões processadas.

Assim, além de conseguirmos identificar o peptídeo TsP2 em outro lote de VTs, encontramos mais alguns peptídeos quiméricos provavelmente originados das duas classes de moléculas evidenciadas acima (hipotensinas e kunitz-*like*), que apresentaram diversas modificações. Corroborando com a identificação do peptídeo TsP2 (KETNAKPPALLPKV), encontramos em nossas novas análises peptídeos idêntico, mas com a ausência de resíduos tanto nas porções N e C-terminais, além da adição de novos resíduos de origens ainda não identificadas a estas mesmas porções. Essas diversificações podem ser observadas na **Figura 36**.

Figura 36 - Identificação de possíveis peptídeos quiméricos teoricamente originados de regiões das hipotensinas e da molécula kunitz-like

Sequência da hipotensina-like encontrada no transcriptoma das glândulas do veneno

MKMMIAVFVSILLIMFSLSSSTAMGMETEQQNMEERADVDFGTGIADSI IKKI **KETNAKPPARFDPATFGENED**

Hipotensina I: AEIDFSGIPEDI IKQI **KETNAKPPA**

Hipotensina II: AEIDFSGIPEDI IKEI **KETNAKPPA**

TsP2: KETNAKPPALLPKV

KETNAKPPALLPK-

KETNAKPPALL---

KETNAKPPALLK

KETNAKPPALFT

KETNAKPPALV

KETNAKPPALVN

KETANAKPPAKLSWR

***KIKEKETNAKPPALLPKV**

***KIKEKETNAKPPALVK**

KIKETNAKPPALLPKV

KIKETNAKPPALLPK-

KIKETNAKPPAL---

KIKETNAKPPA----

LLSAKIKETNAKPPA----

FLSKIKETNAKPPA----

KIKETNAKPP-----

---ETNAKPPALV

KIKETNAKPPALK

KIKETNALLP

--KETNALLP

KIKETNALLPKV

KIKELLPKV

Representação de peptídeos quiméricos identificados. Estas sequências peptídicas foram encontradas em nossas análises por MS/MS. É possível observar as diferentes modificações ocorridas nos fragmentos originados das moléculas hipotensina-like, com destaque para a sequência KETNAKPPA (em lilás) e kunitz-like (em azul) que originam o TsP2. Alguns aminoácidos em vermelho não tiveram sua possível origem identificada. O asterisco indica possível origem no fragmento da Ts19.

Através destes resultados, sugerimos que a composição da peçonha se apresenta mais complexa do que se esperava, com modificações incomuns nas estruturas primárias de peptídeos, resultando em algumas sequências quiméricas. Moléculas já descritas em trabalhos envolvendo o peptidoma parcial da peçonha do *T. serrulatus*, como exemplo as sequências LLPKV, LLPKVL, FLSLLPKV, LPSLLPKV dentre outras (VERANO-BRAGA et al., 2013), apresentam como característica uma possível formação de origem quimérica, reforçando a complexidade do “quebra-cabeças” da constituição peptídica da peçonha. Ao que tudo indica mais peptídeos quiméricos, ainda não percebidos durante as análises, podem constituir a peçonha.

Uma de nossas hipóteses para a formação destas moléculas foi baseada na ação de enzimas do veneno atuando em modificações pós-traducionais ocasionadas por acil-enzimas ainda não descritas, semelhante ao processo de *splicing* ocorrido no proteassomo (VIGNERON et al., 2004; WARREN et al., 2006). Estas enzimas poderiam estar contidas em 3,4% dos componentes da peçonha classificados no transcriptoma das glândulas de veneno

como “outras proteases” (DE OLIVEIRA et al., 2018). Outra possibilidade é a formação através de uma enzima ligase, também ainda não descrita. Deste modo, efetuamos incubações em variadas condições (vide **Tabela 5**, tópico 3.3.3 em Materiais e Métodos) com os peptídeos TsP2-TsP9 e as hipotensinas I e II e o VTs visando à ação de enzimas da peçonha para a possível hidrólise de alguns peptídeos sintéticos e posterior formação dos peptídeos quiméricos. Porém, não conseguimos reproduzir a formação das moléculas quiméricas. Uma das explicações é o envolvimento de condições muito especiais de temperatura e pH para a formação destes peptídeos, podendo ser formados até mesmo nas etapas de extração. Muito embora não existam trabalhos similares com a peçonha do *T. serrulatus*, um estudo sobre peptidoma realizado com os venenos de três diferentes serpentes do gênero *Bothrops*, demonstrou a influência dos métodos de coleta e processamento das amostras em relação aos resultados das modificações pós-traducionais decorrentes do processamento de enzimas (TASHIMA et al., 2012). Neste trabalho, os autores indicam uma maior quantidade de peptídeos presentes nas amostras de venenos liofilizados quando comparado com os resultados obtidos com o veneno “fresco”. Por conta desta informação, também decidimos por estudar o veneno recém-coletado nas nossas incubações com os peptídeos sintéticos, mas, novamente, não tivemos sucesso na observação de formação dos peptídeos quiméricos. Entretanto, verificamos, pela primeira vez, que o pH da peçonha recém extraída da glândula é próximo a 6,5 (fator utilizado em alguns sistemas de incubação) e que, ao contrário do que acontece quando partimos da amostra liofilizada, a “fresca” foi de fácil solubilização, sem a formação de uma fase viscosa.

Após todos os nossos testes experimentais com resultados negativos e leitura de artigos científicos, acreditamos que a hipótese mais plausível para explicarmos a formação das moléculas quiméricas são os mecanismos de *trans-splicing* de genes de toxinas (ZHIJIAN et al., 2006). O processo definido como *trans-splicing* ocorre quando exons de diferentes moléculas de RNA precursor são unidos quando o RNAm é formado (IWASAKI et al., 2009). No trabalho de Zeng e colaboradores (2012), foi descrito um peptídeo linear oriundo do veneno do escorpião chinês *Mesobuthus martensii* Karsch, denominado BmKbpp. Este peptídeo de 42 aminoácidos apresentou atividade antimicrobiana, imunorreguladora e potencializadora de bradicinina. Análises demonstraram que a região C-terminal desta molécula possuía 72% de homologia com o peptídeo K-12, caracterizado como um BPP (do inglês *Bradykinin-Potentiating Peptides*) presente na peçonha do mesmo escorpião e a região N-terminal possui similaridade com outras sequências peptídicas. Neste mesmo estudo é apontado que o BmKbpp não possuía uma região continua no genoma, sugerindo sua

formação pelo processo de *trans-splicing*. Curiosamente, nossos resultados apontaram moléculas quiméricas originadas também de BPPs-like presentes na peçonha do *T. serrulatus*, inclusive demonstramos a capacidade do TsP2 exercer a potencialização da bradicinina *in vivo*. Por fim, na análise dos três diferentes lotes não encontramos a sequência do peptídeo quimérico TsP1. Isso pode ter ocorrido por conta de baixas concentrações deste peptídeo nestas amostras, ou dificuldades relacionadas à ionização ou capacidade de “vôo” do mesmo durante as análises por MS/MS (KINTER; SHERMAN, 2005). Estes dados apresentados corroboram com evidências sobre a diversidade da composição da peçonha do escorpião amarelo, onde peptídeos naturalmente recombinados foram apresentados pela primeira vez como constituintes da peçonha. Mais estudos serão necessários para o entendimento das funções e mecanismos envolvidos na formação dos mesmos.

5 CONCLUSÕES

Muitos trabalhos vêm demonstrando os desafios relacionados à identificação de peptídeos do VTs devido a sua complexidade, assim como o presente estudo. Frente a esta problemática, identificamos mais de 700 possíveis sequências primárias de peptídeos onde, utilizando a elastase-1 e seu substrato FRET como ferramentas, identificamos e selecionamos para a síntese nove peptídeos com sequências inéditas (TsP1 a TsP9) e duas já conhecidas (hipotensinas I e II). Sobre a caracterização destas moléculas realizadas neste estudo pudemos observar que:

1) Em nossas análises evidenciamos a abundante presença de possíveis criptídeos oriundos de modificações pós-tradicionais por proteólise de moléculas já descritas no VTs. Através deste fato, exploramos três peptídeos advindos do processamento da Ts19, uma neurotoxina que afeta canais de K^+ . O grande número de *hits* com a sequência LLPK, talvez proveniente de uma possível molécula kunitz-like ainda não descrita, mas que encontramos em análises transcriptômicas das glândulas de veneno, levou-nos a sintetizar quatro peptídeos análogos, contendo diferentes extensões nas extremidades C- e N-terminais. Também identificamos, pela primeira vez, moléculas com processamentos diferenciados, as quais foram denominadas de peptídeos quiméricos, que possuem as frações N ou C-terminais originadas de dois peptídeos diferentes. Sugerimos que este processamento pode ocorrer através da ação de enzimas ou então por processos gênicos, como é o caso do *trans-splicing*. Assim, foram sintetizados dois peptídeos quiméricos derivados principalmente de três moléculas do VTs: Ts19, hipotensinas e kunitz-like.

2) Com base nos sintomas apresentados por vítimas do escorpionismo, efetivamos testes de modulação enzimática com quatro enzimas de importância médica: elastase, tripsina, ECA e NEP, também visando explorar o possível potencial biotecnológico dos peptídeos sintéticos. Através dos resultados, encontramos peptídeos capazes de modular a ação das mesmas, da seguinte forma:

- Elastase 1 e 2: Os peptídeos TsP5, Hipo1 e Hipo2 foram capazes de aumentar a atividade enzimática das elastases, onde sugerimos o papel destes peptídeos em processos inflamatórios, como é o caso do edema pulmonar agudo. Além do mais, estes peptídeos apresentaram citotoxicidade, e as hipotensinas foram capazes de aumentar o nível da citocina TNF e somente a hipotensina II da IL6 em macrófagos de camundongos.

- Tripsina: Os peptídeos TsP5, TsP6, Hipo1 e Hipo2 também foram capazes de aumentar a atividade enzimática da tripsina, com destaque para o peptídeo TsP5, com 117% de aumento. Sugerimos a relação deste aumento de atividade com patologias, por exemplo, em casos de pancreatite aguda. O TsP6 também apresentou citotoxicidade em ensaios de MTT.
 - ECA: não encontramos inibidores desta enzima, porém os peptídeos TsP2 a TsP6 e hipotensinas I e II foram capazes de aumentar a atividade da enzima. O peptídeo TsP2, uma das sequências quiméricas identificadas no VTs, foi testado *in vivo* em relação a alterações da pressão arterial em ratos normotensos. *Per se*, o TsP2 não foi capaz de produzir alterações, mas testado junto à bradicinina se demonstrou um potencializador do efeito hipotensor da mesma. Por ter similaridade de sequência primária com as hipotensinas, sugerimos que o TsP2 possa estar agindo da mesma maneira como sugerido para estas moléculas, que apresentam efeito hipotensor *in vivo* independente da inibição da ECA.
 - NEP: os peptídeos TsP1, TsP2, TsP3, TsP6 e hipotensina I se comportaram como inibidores da enzima. Focamos nossos estudos na interação da hipotensina I com a NEP, uma vez que a hipotensina II, com estrutura similar a hipotensina I, não interagiu com eficácia. Determinamos o mecanismo de ação da hipotensina I como não competitivo, apresentando um K_i de 4,35 μM . Estudos empregando dicróismo circular não demonstraram significativas diferenças entre as estruturas secundárias entre as duas hipotensinas que pudessem explicar os diferentes níveis de interação com a NEP. Assim, sugerimos que a troca de apenas um resíduo de aminoácido (Gln15 na Hipo1 e Glu15 na Hipo2) é responsável pela eficiência da hipotensina I para a inibição da NEP. A inibição da NEP pela Hipo1 pode estar relacionada com os quadros de hipotensão apresentados pelas vítimas de picadas pelo *T. serrulatus* e, neste sentido, sugerimos que a Hipo1 possa estar agindo de forma sinérgica com o [des-Arg¹]-Proctolin ($K_i = 0,94 \mu\text{M}$ para inibição da NEP).
- 3) Os peptídeos não foram reconhecidos pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico produzidos pelo Instituto Butantan. Isso é preocupante, uma vez que alguns casos de sintomas do escorpionismo não revertidos pela soroterapia podem ter ligações com peptídeos potencialmente tóxicos cujas ações não são efetivamente bloqueados pelos antivenenos. Mais estudos são necessários para a identificação destes peptídeos enquanto toxinas importantes do VTs e assim contribuir para a melhoria da terapia usada em casos de acidentes.

4) Caracterizamos o peptídeo FTR em relação a sua ação antinociceptiva. Demonstramos que ele atua de forma direta em receptor delta opioide, porém sem ação por via oral. Este peptídeo possui um potencial biotecnológico a ser explorado em relação a suas possíveis propriedades analgésicas.

5) Através da análise de sequências primárias de peptídeos de frações oriundas de três diferentes lotes do VTs, confirmamos a presença de peptídeos naturais quiméricos.

Assim, acreditamos que o presente trabalho contribuiu para um melhor entendimento sobre a fração peptídica que compõe a peçonha do *T. serrulatus*, apontando tanto para toxinas que podem ter ação no escorpionismo quanto para moléculas com potencial uso biotecnológico.

REFERÊNCIAS*

- ALMAAYTAH, A.; TARAZI, S.; MHAIDAT, N.; AL-BALAS, Q.; MUKATTASH, T. L. Mauriporin, a Novel Cationic α -Helical Peptide with Selective Cytotoxic Activity Against Prostate Cancer Cell Lines from the Venom of the Scorpion *Androctonus mauritanicus*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 281–293, 21 dez. 2013.
- ALMEIDA-REIS, R.; THEODORO-JUNIOR, O. A.; OLIVEIRA, B. T. M.; OLIVA, L. V.; TOLEDO-ARRUDA, A. C.; BONTURI, C. R.; BRITO, M. V.; LOPES, F. D. T. Q. S.; PRADO, C. M.; FLORENCIO, A. C.; MARTINS, M. A.; OWEN, C. A.; LEICK, E. A.; OLIVA, M. L. V.; TIBÉRIO, I. F. L. C. Plant Proteinase Inhibitor BbCI Modulates Lung Inflammatory Responses and Mechanic and Remodeling Alterations Induced by Elastase in Mice. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–13, 2017.
- ALVARENGA, E. R.; MENDES, T. M.; MAGALHAES, B. F.; SIQUEIRA, F. F.; DANTAS, A. E.; BARROCA, T. M.; HORTA, C. C.; KALAPOTHAKIS, E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 02, n. 04, p. 210–220, 2012.
- AMARAL, C. F.; DE REZENDE, N. A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **The American journal of cardiology**, v. 71, n. 2, p. 242–5, 15 jan. 1993.
- AMBROSY, A. P.; MENTZ, R. J.; FIUZAT, M.; CLELAND, J. G. F.; GREENE, S. J.; O'CONNOR, C. M.; TEERLINK, J. R.; ZANNAD, F.; SOLOMON, S. D. The role of angiotensin receptor-neprilysin inhibitors in cardiovascular disease-existing evidence, knowledge gaps, and future directions. **European Journal of Heart Failure**, v. 20, n. 6, p. 963–972, jun. 2018.
- ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 907–916, 1 jan. 1989.
- ARANTES, E. C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S. V.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. 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 (BBA) - General Subjects**, v. 1199, n. 1, p. 69–75, 5 jan. 1994.
- ARAUJO, M. C.; MELO, R. I.; DEL NERY, E.; ALVES, M. F.; JULIANO, M. A.; CASARINI, D. E.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Hypertension*, v. 17, n. 5, p. 665–672, 1999.
- BARROS, N. M. T.; CAMPOS, M.; BERSANETTI, P. A.; OLIVEIRA, V.; JULIANO, M. A.; BOILEAU, G.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Neprilysin carboxydipeptidase specificity studies and improvement in its detection with fluorescence energy transfer peptides. **Biological chemistry**, v. 388, n. 4, p. 447–55, abr. 2007.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATISTA, C. V. F.; DEL POZO, L.; ZAMUDIO, F. Z.; CONTRERAS, S.; BECERRIL, B.; WANKE, E.; POSSANI, L. D. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 803, n. 1, p. 55–66, 15 abr. 2004.

BENARAFÁ, C.; COOLEY, J.; ZENG, W.; BIRD, P. I.; REMOLD-O'DONNELL, E. Characterization of four murine homologs of the human ov-serpin monocyte neutrophil elastase inhibitor MNEI (SERPINB1). **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 44, p. 42028–33, 1 nov. 2002.

BLOW, A. M. Action of human lysosomal elastase on the oxidized B chain of insulin. **The Biochemical journal**, v. 161, n. 1, p. 13–6, 1 jan. 1977.

BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **“Protein Engineering, Design and Selection”**, v. 5, n. 3, p. 191–195, 1 abr. 1992.

BORTOLUZZI, L. R.; QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E. Notes on the occurrence of *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) in the Western areas of Rio Grande do Sul, Brazil. **Biota neotrop. (Online, Ed. port.)**, v. 7, n. 3, p. 357–359, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os Escorpiões**. 1. ed. Salvador: EDUFBA, 2010.

BUCARETCHI, F.; BARACAT, E. C.; NOGUEIRA, R. J. N.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F. A. D.; FONSECA, M. R. C. C.; TOURINHO, F. S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 331–336, ago. 1995.

BUCARETCHI, F.; FERNANDES, L. C. R.; FERNANDES, C. B.; BRANCO, M. M.; PRADO, C. C.; VIEIRA, R. J.; DE CAPITANI, E. M.; HYSLOP, S. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon**, v. 89, p. 17–25, 1 out. 2014.

BUCHERL, W. Scorpions and scorpionism in Brazil. 2. Effect of the venom of *Tityus serrulatus* and *T. bahiensis* on mice. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 25, n. 1, p. 83–108, 1953.

CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A. K.; DUZZI, B.; IWAI, L. K.; DE OLIVEIRA, Ú. C.; DE AZEVEDO, I. L. M. J.; KODAMA, R. T.; PORTARO, F. V. Insights into the hypertensive effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom: Purification of an angiotensin-converting enzyme-like peptidase. **Toxins**, v. 8, n. 12, 2016.

CAJADO-CARVALHO, D.; SILVA, C. C. F.; DE OLIVEIRA, I. C. S.; DUZZI, B.; KODAMA, R. T.; KUNIYOSHI, A. K.; PORTARO, F. V. Isolation and biochemical characterization of metalloserrulases 3 and 4 from *Tityus serrulatus* scorpion venom, 2018. No prelo.

CAMPOS, O. de M. Os escorpiões brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, n. 2, p. 237–363, 1924.

CAO, Z.-Y.; MI, Z.-M.; CHENG, G.-F.; SHEN, W.-Q.; XIAO, X.; LIU, X.-M.; LIANG, X.-T.; YU, D.-Q. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensi* Karch. **The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society**, v. 64, n. 1, p. 33–41, jul. 2004.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

CARMO, A. O.; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; HORTA, C. C. R.; MAGALHÃES, B. F.; DANTAS, A. E.; CHAVES, L. M.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon**, v. 90, p. 45–55, 2014.

CARVALHO, D. C.; DUZZI, B.; KUNIYOSHI, A. K.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F. C.; MELO, R. L.; TAMBOURGI, D. V.; RIOLI, V.; PORTARO, F. C. Insights into scorpion venom peptides: Alternative processing of β -KTx propeptide from *Tityus serrulatus* venom results in a new naturally occurring thimet oligopeptidase inhibitor. **Peptides**, v. 40C, p. 30–33, 2012.

CATTERALL, W. A.; CESTÈLE, S.; YAROV-YAROVY, V.; YU, F. H.; KONOKI, K.; SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 2, p. 124–41, fev. 2007.

CERNI, F.; PUCCA, M.; PEIGNEUR, S.; CREMONEZ, C.; BORDON, K.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. Electrophysiological Characterization of Ts6 and Ts7, K⁺ Channel Toxins Isolated through an Improved *Tityus serrulatus* Venom Purification Procedure. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 892–913, 28 fev. 2014.

CERNI, F. A.; PUCCA, M. B.; AMORIM, F. G.; DE CASTRO FIGUEIREDO BORDON, K.; ECHTERBILLE, J.; QUINTON, L.; DE PAUW, E.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 9–17, jun. 2016.

CLEMENTE, G. .; TEIXEIRA, M. .; FREIRE-MAIA, L.; ROSSONI, R. . Mechanisms underlying the structural alterations of the rat submandibular gland induced by *Tityus serrulatus* tityustoxin. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 731–738, 2002.

COLOGNA, C. T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 8, p. 920–32, jan. 2009.

COLOGNA, C. T.; PEIGNEUR, S.; ROSA, J. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; VARANDA, W. A.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 54–61, 1 jul. 2011.

COWAN, F. **Curious Facts in the History of Insects, Including Spiders and Scorpions**. Filadélfia: Lippincott & Company, 1865.

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, J. S. M.; HERING, S. E. Severe scorpion envenomation in Brazil: Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 67–76, 1994.

CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642–649, dez. 2015.

D'SUZE, G.; SALAZAR, V.; DÍAZ, P.; SEVCIK, C.; AZPURUA, H.; BRACHO, N. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 8, p. 851–60, 15 dez. 2004.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 46, n. 10, p. 382–91, out. 1997.

DAS, M.; HARTLEY, J. L.; SOFFERS, R. L. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 4, p. 1316–9, 25 mar. 1977.

DATASUS. **Datasus**Ministério da Saúde Brasília, 2018.

DE MATOS, I. M.; ROCHA, O. A.; LEITE, R.; FREIRE-MAIA, L. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 143–8, out. 1997.

DE OLIVEIRA, U. C.; NISHIYAMA, M. Y.; DOS SANTOS, M. B. V.; SANTOS-DA-SILVA, A. de P.; CHALKIDIS, H. de M.; SOUZA-IMBERG, A.; CANDIDO, D. M.; YAMANOUYE, N.; DORCE, V. A. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. de L. M. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193739, 21 mar. 2018.

DELBAERE, L. T. J.; HUTCHEON, W. L. B.; JAMES, M. N. G.; THIESSEN, W. E. Tertiary structural differences between microbial serine proteases and pancreatic serine enzymes. **Nature**, v. 257, n. 5529, p. 758–763, 30 out. 1975.

DING, L.; WANG, X.; LIU, H.; SAN, M.; XU, Y.; LI, J.; LI, S.; CAO, Z.; LI, W.; WU, Y.; CHEN, Z. A new Kunitz-type plasmin inhibitor from scorpion venom. **Toxicon**, v. 106, p. 7–13, 2015.

DOS SANTOS, M. D. S.; PORTO, T. J.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; BRAZIL, T. K. Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenço, 1997 and notes about males of *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). **ZooKeys**, n. 435, p. 49, 2014.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135–146, fev. 2005.

DUZZI, B. **Busca de novos substratos e/ou inibidores das enzimas timet oligopeptidase (E.C.3.4.24.15) e neurolisina (E.C.3.4.24.16) nas frações de baixa massa molecular do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2014. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

DUZZI, B.; CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A. K.; KODAMA, R. T.; GOZZO, F. C.; FIORAMONTE, M.; TAMBOURGI, D. V.; PORTARO, F. V.; RIOLI, V. [des-Arg¹]-Proctolin: A novel NEP-like enzyme inhibitor identified in *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 18–24, jun. 2016.

EL-HENNAWY, H. K. Scorpions in Ancient Egypt. **Euscorpius**, v. 119, p. 1–12, 2011.

FERREIRA, L. A.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 31, n. 8, p. 941–7, ago. 1993.

FLETCHER, M. D.; POSSANI, L. D.; FLETCHER, P. L. Morphological studies by light and electron microscopy of pancreatic acinar cells under the effect of *Tityus serrulatus* venom. **Cell and tissue research**, v. 278, n. 2, p. 255–64, nov. 1994.

FLETCHER, P. L.; FLETCHER, M. D.; WENINGER, K.; ANDERSON, T. E.; MARTIN, B. M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7405–16, 5 mar. 2010.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. **Natural Toxins**, Pergamon Press, Oxford, p. 139–159, 1989.

FREITAS, J. C. de. Nomenclature in toxinology: relations with the chemical communication between organisms and biological properties of toxins. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, n. 2, p. 191–5, 1991.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL) et al. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1998.

GAO, B.; XU, J.; DEL CARMEN RODRIGUEZ, M.; LANZ-MENDOZA, H.; HERNÁNDEZ-RIVAS, R.; DU, W.; ZHU, S. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 350–359, 1 abr. 2010.

GHOSH, A.; ROY, R.; NANDI, M.; MUKHOPADHYAY, A. Scorpion Venom–Toxins that Aid in Drug Development: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1–11, 5 jun. 2018.

GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 3, p. 899–902, 1966.

GONÇALVES, A. A.; TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; BOSCHERO, A. C. Participation of Na⁺ channels in the potentiation by *Tityus serrulatus* α -toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet β -cells. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1039–1045, 1 jun. 2003.

GUERRA, C. M. N.; CARVALHO, L. F. A.; COLOSIMO, E. A.; FREIRE, H. B. M. Análise de variáveis relacionadas à evolução letal do escorpionismo em crianças e adolescentes no estado de Minas Gerais no período de 2001 a 2005. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 6, p. 509–515, dez. 2008.

GUIDINE, P. A. M.; CASH, D.; DRUMOND, L. E.; DE SOUZA E REZENDE, G. H.; MASSENSINI, A. R.; WILLIAMS, S. C. R.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M. F. D.; MESQUITA, M. B. S. Brainstem Structures Are Primarily Affected in an Experimental Model of Severe Scorpion Envenomation. **Toxicological Sciences**, v. 137, n. 1, p. 147–157, 1 jan. 2014.

HEDSTROM, L. An overview of serine proteases. **Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]**, v. Chapter 21, p. Unit 21.10, mar. 2002.

HMED, B.; SERRIA, H. T.; MOUNIR, Z. K. Scorpion peptides: potential use for new drug development. **Journal of toxicology**, v. 2013, p. 958797, jan. 2013.

IWASAKI, R.; KIUCHI, H.; IHARA, M.; MORI, T.; KAWAKAMI, M.; UEDA, H. Trans-splicing as a novel method to rapidly produce antibody fusion proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 384, n. 3, p. 316–321, 3 jul. 2009.

IWATA, N.; TSUBUKI, S.; TAKAKI, Y.; SHIROTANI, K.; LU, B.; GERARD, N. P.; GERARD, C.; HAMA, E.; LEE, H. J.; SAIDO, T. C. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5521, p. 1550–2, 25 maio 2001.

JAMIESON, A. **A celestial atlas: comprising a systematic display of the heavens in a series of thirty maps: illustrated by scientific description of their contents and accompanied by catalogues of the stars and astronomical exercises**. G. & WB Whittaker Londres, 1822.

JANOFF, A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. **The American review of respiratory disease**, v. 132, n. 2, p. 417–33, ago. 1985.

KAWABATA, K.; HAGIO, T.; MATSUOKA, S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. **European journal of pharmacology**, v. 451, n. 1, p. 1–10, 6 set. 2002.

KINTER, M.; SHERMAN, N. E. **Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry**. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley & Sons, Inc., 2000.

KORKMAZ, B.; HORWITZ, M. S.; JENNE, D. E.; GAUTHIER, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 4, p. 726–759, 2010.

LAGENTE, V.; MARTIN-CHOULY, C.; BOICHOT, E.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl, p. 131–6, mar. 2005.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 5, p. 896–904, 1 set. 2001.

LEGROS, C.; OUGHUIDENI, R.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. **FEBS letters**, v. 390, n. 1, p. 81–84, 1996.

LI, C.; HERSH, L. B. Neprilysin: assay methods, purification, and characterization. **Methods in enzymology**, v. 248, p. 253–63, jan. 1995.

LIMA, P. C.; BORDON, K. C. F.; PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; ZOCCAL, K. F.; FACCIOLI, L. H.; ARANTES, E. C. Partial purification and functional characterization of Ts19 Frag-I, a novel toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, p. 49, 2015.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M. de; CARVALHO, F. M.; BRAZIL, T. K. Acidentes por escorpião na cidade do Salvador, Bahia, Brasil (1982–2000). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOURENÇO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. Von; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. Escorpiões de importância médica. **CARDOSO JLC et al. Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. SARVIER, São Paulo**, 2003.

LOURENÇO, W. R. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1, 4 dez. 2018.

MAMELAK, A. N.; JACOBY, D. B. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). **Expert opinion on drug delivery**, v. 4, n. 2, p. 175–86, mar. 2007.

MANZOLI-PALMA, M. F.; GOBBI, N.; PALMA, M. S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 174–185, 2003.

MARANGONI, S.; GHISO, J.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, B.; FRANGIONE, B. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Journal of Protein Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 595–601, out. 1990.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MAZZI, M. V. **Escorpiões: Biologia, Envenenamento e Mecanismos de Ação de Suas Toxinas**. 1. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2011.

MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F.; PIMENTA, A. M. C.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M.-E. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 119, p. 253–65, 1 set. 2016.

MARTINS, R. T.; ALMEIDA, D. B. de; MONTEIRO, F. M. do R.; KOWACS, P. A.; RAMINA, R. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75–79, mar. 2012.

MATTHIESEN, F. A. The breeding of *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1927, in captivity (Scorpions, Buthidae). **Revista brasileira de pesquisas médicas e Biológicas**, v. 4, p. 299–300, 1971.

MAYER, J.; RAU, B.; SCHOENBERG, M. H.; BEGER, H. G. Mechanism and role of trypsinogen activation in acute pancreatitis. **Hepato-gastroenterology**, v. 46, n. 29, p. 2757–63, 1999.

MEKI, A.-R. M. A.; NASSAR, A. Y.; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, v. 16, n. 8, p. 1359–1365, 1 jan. 1995.

MINAGAWA, S.; ISHIDA, M.; SHIMAKURA, K.; NAGASHIMA, Y.; SHIOMI, K. Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura aff. xanthogrammica*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 118, n. 2, p. 381–6, out. 1997.

MIYAMOTO, J. G.; ANDRADE, F. B.; FERRAZ, C. R.; CÂNDIDO, D. M.; KNYSACK, I.; VENANCIO, É. J.; VERRI, W. A.; LANDGRAF, M. A.; LANDGRAF, R. G.; KWASNIEWSKI, F. H. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 141, p. 25–33, jan. 2018.

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; THEVISSSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J.; VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 19, p. 4799–4810, out. 2002.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 227–246, maio 2005.

NASCIMENTO, D. G.; RATES, B.; SANTOS, D. M.; VERANO-BRAGA, T.; BARBOSA-SILVA, A.; DUTRA, A. A. A.; BIONDI, I.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; LIMA, M. E. De; PIMENTA, A. M. C. Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 628–639, 1 maio 2006.

NEURATH, H. Proteolytic enzymes, past and future. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p. 10962–10963, 28 set. 1999.

NUNAN, E. A.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T. Lethal effect of the scorpion *Tityus serrulatus* venom: comparative study on adult and weanling rats. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 37, n. 1, p. 39–44, 2001.

OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 615–621, set. 2009.

ONDETTI, M. A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science (New York, N.Y.)**, v. 196, n. 4288, p. 441–4, 22 maio 1977.

PANEQUE PERES, A. C.; NONAKA, P. N.; DE CARVALHO, P. de T. C.; TOYAMA, M. H.; SILVA, C. A. M. e; VIEIRA, R. de P.; DOLHNIKOFF, M.; ZAMUNER, S. R.; DE OLIVEIRA, L. V. F. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 7–8, p. 779–85, jun. 2009.

PATCHETT, A. A.; HARRIS, E.; TRISTRAM, E. W.; et al. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Nature**, v. 288, n. 5788, p. 280–3, 20 dez. 1980.

PIMENTA, A. M.; STÖCKLIN, R.; FAVREAU, P.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 15, n. 17, p. 1562–72, jan. 2001.

PIMENTA, A. M. C.; LEGROS, C.; ALMEIDA, F. de M.; MANSUELLE, P.; DE LIMA, M. E.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 301, n. 4, p. 1086–92, 21 fev. 2003.

POLIS, G. A. **The biology of scorpions**. Stanford University Press, 1990.

POSSANI, L. D.; ALAGÓN, A. C.; FLETCHER, P. L.; ERICKSON, B. W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 180, n. 2, p. 394–403, 1977.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; MOCHCA-MORALES, J.; SVENDSEN, I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Carlsberg Research Communications**, v. 46, n. 4, p. 195–205, jul. 1981.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; SVENDSEN, I. The primary structure of noxiustoxin: A K^+ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **Carlsberg Research Communications**, v. 47, n. 5, p. 285–289, set. 1982.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; SVENDSEN, I.; RODE, G. S.; ERICKSON, B. W. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. **The Biochemical journal**, v. 229, n. 3, p. 739–50, 1 ago. 1985.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, Ö. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4639–4750, 2002.

PUCCA, M. B.; AMORIM, F. G.; CERNI, F. A.; BORDON, K. de C. F.; CARDOSO, I. A.; ANJOLETTE, F. A. P.; ARANTES, E. C. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, p. 326–336, nov. 2014.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; PINHEIRO JUNIOR, E. L.; BORDON, K. de C. F.; AMORIM, F. G.; CORDEIRO, F. A.; LONGHIM, H. T.; CREMONEZ, C. M.; OLIVEIRA, G. H.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* venom – A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272–284, 15 dez. 2015a.

PUCCA, M. B.; PEIGNEUR, S.; COLOGNA, C. T.; CERNI, F. A.; ZOCCAL, K. F.; BORDON, K. de C. F.; FACCIOLI, L. H.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8–16, ago. 2015b.

PUCCA, M.; CERNI, F.; PEIGNEUR, S.; BORDON, K.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. Revealing the Function and the Structural Model of Ts4: Insights into the “Non-Toxic” Toxin from *Tityus serrulatus* Venom. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2534–2550, 6 jul. 2015c.

PUCCA, M. B.; BERTOLINI, T. B.; CERNI, F. A.; BORDON, K. C. F.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J.; BONATO, V. L.; ARANTES, E. C. Immunosuppressive evidence of *Tityus serrulatus* toxins Ts6 and Ts15: insights of a novel K⁺ channel pattern in T cells. **Immunology**, v. 147, n. 2, p. 240–50, fev. 2016a.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; CORDEIRO, F. A.; PEIGNEUR, S.; CUNHA, T. M.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception *in vivo*. **Toxicon**, v. 119, p. 244–252, 1 set. 2016b.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; ZOCCAL, K. F.; et al. Non-disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors. **Peptides**, v. 82, p. 44–51, 1 ago. 2016c.

RAFFA, R. B.; PERGOLIZZI, J. V.; TAYLOR, R.; OSSIPOV, M. H. Indirect-acting strategy of opioid action instead of direct receptor activation: dual-acting enkephalinase inhibitors (DENKIs). **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, n. 4, p. 443–449, ago. 2018.

RANASINGHE, S.; MCMANUS, D. P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. **Developmental and comparative immunology**, v. 39, n. 3, p. 219–27, mar. 2013.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 111, n. 4, p. 409–19, 1 set. 1957.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale's Pharmacology E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access**. 8. ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2014.

RATES, B.; FERRAZ, K. K. F.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 5, p. 611–8, out. 2008.

RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. **Handbook of proteolytic enzymes**. 3. ed. Elsevier, 2013.

READ, R. J.; JAMES, M. N. G. Refined crystal structure of *Streptomyces griseus* trypsin at 1.7 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 200, n. 3, p. 523–551, 5 abr. 1988.

REVELO, M. P.; BAMBIRRA, E. A.; FERREIRA, A. P.; DINIZ, C. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 34, n. 10, p. 1119–25, out. 1996.

RIGONI, V. L. S.; KWASNIEWSKI, F. H.; VIEIRA, R. P.; LINHARES, I. S.; DA SILVA, J. L. V.; NOGUEIRA-PEDRO, A.; ZAMUNER, S. R. Human bronchial epithelial cells injury and cytokine production induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom: An *in vitro* study. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 120, p. 22–28, 21 jul. 2016.

ROCHA-RESENDE, C.; LEÃO, N. M.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A.; PIMENTA, A. M. de C.; VERANO-BRAGA, T. Moving pieces in a cryptomic puzzle: Cryptide from *Tityus serrulatus* Ts3 Nav toxin as potential agonist of muscarinic receptors. **Peptides**, v. 98, p. 70–77, dez. 2017.

ROGERS, R. L.; BEDFORD, T.; HARTL, D. L. Formation and longevity of chimeric and duplicate genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 181, n. 1, p. 313–22, jan. 2009.

ROGOWSKI, R. S.; KRUEGER, B. K.; COLLINS, J. H.; BLAUSTEIN, M. P. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1475–9, 15 fev. 1994.

ROQUES, B. P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 45, n. 1, p. 87–146, mar. 1993.

SAMIR, P.; LINK, A. J. Analyzing the cryptome: uncovering secret sequences. **The AAPS journal**, v. 13, n. 2, p. 152–8, 16 jun. 2011.

SAMPAIO, S. V.; LAURE, C. J.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 21, n. 2, p. 265–277, 1 jan. 1983.

SAMPAIO, S.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. **IUBMB Life**, v. 39, n. 4, p. 729–740, jul. 1996.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. Wiley-Interscience, 1975.

SHOTTON, D. M. Elastase. In: **Methods in enzymology**. Elsevier, 19p. 113–140. 1970.

SILVA, T. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Avaliação da DL50 e edema pulmonar induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* (Scorpiones; Buthidae) procedente da Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1a, p. 221–224, 2005.

SINGH, V. K.; BAJPAI, K.; NARAYAN, P.; YADAV, V. S.; DHAWAN, V. C.; HAQ, W.; MATHUR, K. B.; AGARWAL, S. S. δ -Opioid Receptor Antagonist Inhibits Immunomodulation by Met-Enkephalin Analogs. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, n. 5, p. 355–360, 1999.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 3, p. 295–9, 1 mar. 1956.

SKIDGEL, R. A.; ENGELBRECHT, S.; JOHNSON, A. R.; ERDÖS, E. G. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. **Peptides**, v. 5, n. 4, p. 769–76, 1984.

SKIDGEL, R. A.; ERDÖS, E. G. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 4, p. 1025–9, fev. 1985.

SKIDGEL, R. A.; ERDÖS, E. G. The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. **Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice**, v. 9, n. 2–3, p. 243–59, jan. 1987.

STROUD, R. M.; KAY, L. M.; DICKERSON, R. E. The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 83, n. 2, p. 185–208, 1974.

TASHIMA, A. K.; ZELANIS, A.; KITANO, E. S.; IANZER, D.; MELO, R. L.; RIOLI, V.; SANT'ANNA, S. S.; SCHENBERG, A. C. G.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Peptidomics of three Bothrops snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 11, n. 11, p. 1245–62, nov. 2012.

TOLEDO, D.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 55, n. 2, p. 249–253, 1976.

TORRES-LARIOS, A.; GURROLA, G. B.; ZAMUDIO, F. Z.; POSSANI, L. D. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 5023–5031, ago. 2000.

VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V. L.; BENDHACK, L. M.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 85–92, 2005.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 371, n. 3, p. 515–20, 4 jul. 2008.

VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M. N.; LAUTNER, R. Q.; GOMES, E. R. M.; MATA-MACHADO, L. T.; MURARI, A.; ROCHA-RESENDE, C.; ELENA DE LIMA, M.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B₂ kinin receptor. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 7, p. 1162–71, 15 dez. 2010.

VERANO-BRAGA, T.; DUTRA, A. A. A.; LEÓN, I. R.; MELO-BRAGA, M. N.; ROEPSTORFF, P.; PIMENTA, A. M. C.; KJELDSSEN, F. Moving pieces in a venomous puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 7, p. 3460–70, 5 jul. 2013.

VIGNERON, N.; STROOBANT, V.; CHAPIRO, J.; OOMS, A.; DEGIOVANNI, G.; MOREL, S.; VAN DER BRUGGEN, P.; BOON, T.; VAN DEN EYNDE, B. J. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5670, p. 587–90, 23 abr. 2004.

WAN, H.; LEE, K. S.; KIM, B. Y.; YUAN, M.; ZHAN, S.; YOU, H.; LI, J.; JIN, B. R. A spider (*Araneus ventricosus*) chymotrypsin inhibitor that acts as an elastase inhibitor and a microbial serine protease inhibitor. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 165, n. 1, p. 36–41, maio 2013a.

WAN, H.; LEE, K. S.; KIM, B. Y.; et al. A Spider-Derived Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor that Acts as a Plasmin Inhibitor and an Elastase Inhibitor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53343, 4 jan. 2013b.

WARREN, E. H.; VIGNERON, N. J.; GAVIN, M. A.; COULIE, P. G.; STROOBANT, V.; DALET, A.; TYKODI, S. S.; XUEREBO, S. M.; MITO, J. K.; RIDDELL, S. R.; OTHERS. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. **Science**, v. 313, n. 5792, p. 1444–1447, 2006.

WERKMAN, T. R.; GUSTAFSON, T. A.; ROGOWSKI, R. S.; BLAUSTEIN, M. P.; ROGAWSKI, M. A. Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1. 2 K⁺ channel. **Molecular pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 430–436, 1993.

WHITCOMB, D. C.; GORRY, M. C.; PRESTON, R. A.; FUREY, W.; SOSSENHEIMER, M. J.; ULRICH, C. D.; MARTIN, S. P.; GATES, L. K.; AMANN, S. T.; TOSKES, P. P.; LIDDLE, R.; MCGRATH, K.; UOMO, G.; POST, J. C.; EHRLICH, G. D. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. **Nature Genetics**, v. 14, n. 2, p. 141–145, 1 out. 1996.

WIEDOW, O.; MEYER-HOFFERT, U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 4, p. 319–328, 14 mar. 2005.

WILLIAMS, S. C. Scorpion bionomics. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 275–295, 1987.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends in pharmacological sciences**, v. 20, n. 8, p. 329–37, ago. 1999.

YAMAJI, N.; DAI, L.; SUGASE, K.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T.; IWASHITA, T. Solution structure of IsTX. A male scorpion toxin from *Opisthacanthus madagascariensis* (Ischnuridae). **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 271, n. 19, p. 3855–64, out. 2004.

YAN, R.; ZHAO, Z.; HE, Y.; WU, L.; CAI, D.; HONG, W.; WU, Y.; CAO, Z.; ZHENG, C.; LI, W. A new natural α -helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 11–19, 1 jan. 2011.

YANG, H. Y.; ERDÖS, E. G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 214, n. 2, p. 374, 1970.

ZENG, X.-C.; WANG, S.; NIE, Y.; ZHANG, L.; LUO, X. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: Gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 44–51, 1 jan. 2012.

ZHANG, J.; DEAN, A. M.; BRUNET, F.; LONG, M. Evolving protein functional diversity in new genes of *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16246–50, 16 nov. 2004.

ZHANG, Y.; XU, J.; WANG, Z.; ZHANG, X.; LIANG, X.; CIVELLI, O. BmK-YA, an enkephalin-like peptide in scorpion venom. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40417, jan. 2012.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M.; WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 348–355, 1 mar. 2006.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. da S.; SECATTO, A.; SORGI, C. A.; BORDON, K. de C. F.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7–8, p. 1101–1108, 1 jun. 2011.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. da S.; SORGI, C. A.; BORDON, K. de C. F.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 61, p. 1–10, jan. 2013.

ZORN, J. A.; WELLS, J. A. Turning enzymes ON with small molecules. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 179–188, mar. 2010.

APÊNDICE A

Lista com as sequências peptídicas obtidas das frações selecionadas e sequenciadas por espectrometria de massas

Sequência	Sequência	Sequência	Sequência	Sequência
AALCSR	CGLRLN	DGLFLW	EESEEVEHWAHEAEE	FFLKHFKLFT
AAPEVAALVT	CHLFTFKPLPP	DGLFLW	EEVSEYLK	FGLLPK
AAPGAALT	CHLHTARALPP	DGLM(+15.99)SSLT	EFCQDSGL	FGLSQLT
ADVDFKL	CHLHWKTLPP	DGLRHLT	EFLPAP	FGVNL
ADVDDRK	CHLPKVLPLPP	DKFTR	EGAPADPGD	FKPVHKPNLL
ADVQNGNN	CHLPRWPLPP	DLKTR	EGFDALWV	FLFLT
AFAAGAPP	CHLPWRPLPP	DLLAPLAGTPAP	EGPFLWL	FLGPM(+15.99)PGKAL
AFKLFRAALT	CHLRDKYGLK	DLLAPTPAHVDASAH	EM(+15.99)GPLALT	FLKLVN
AGLAVFVLVLV	CHLRKKTSLPP	DLLAKTKN	EM(+15.99)KVHC	FLLLPKV
AKAFRL	CHLSHCLGLPLPP	DPQANTNNAAGAASHA	EM(+15.99)VLQAVAYET	FLLPK
ALVTPEPADAHAP	CHLTNHNQLLPP	DSLLYLR	ENVNDLTYVLLPP	FLNATTSGSSSAT
ALWELLGKLKRTLLTV	CHLTPEHRSLPP	DVDFLK	EPDAPKTALLPAPDQGP	FLRPGS
APEPAPEAAPEAKL	CHLTPLFFAQPP	DVDFLK	EPPADSAAPEAPATKP	FLSKIKETNA
APVDPKKLAT	CHLTPLWGHLP	DVYLN	EPPCCT	FLSKLSQLT
ARLRS	CLCAAPPLG	EAALLPNDK	EPPNDKPEPQ	FLSLVK
ASLLRHA	CPGSQLLPQVVG	EAGKGKEILGKIKE	EPPPLPK	FLSTLVKGL
ATLLRPT	CPLAVHSAVHSAVSEPAHA	EAGKLLNSLGKIKEKIEA	ERADPK	FLSWR
ATNKETNAHK	CPSGEAEDT	EATKLLGT	ESDEHACNCSDQ	FLTSLPGKQ
AVDLGLSRGFSGSQAAKH	CVGEPLGTT	EAYKVELPE	ESRYEQSE	FLVEVLT
AVLLPGGDQL	CVLLPQVL	EDAARSAPALLPSPEPAPAHA	ESVLVETLV	FLVLWDVPVLVLES
AVTAVASY	CVVKKVHKLPVGA	EDLDKSGFGGF	ETDEEVEWHA	FLWPKKFNAPPA
AYFPNEKDLLPP	DACM(+15.99)YRT	EDTEEM(+15.99)FAWAHQVKCEWNCHEE	EVLLPQ	FM(+15.99)DELWVPHHST
CCM(+15.99)HACYGSLPP	DDECCSM(+15.99)V	EDTEEVEHWAHEAEVH	FADGAQL	FPAAAAAH
CFNPPGP	DDWQPP	EDYDAH	FAEHAEGHEVEESCH	FPDNLQP
CGALKHKALVKQLN	DEPAPLLAPSPAHH	EESEEVEHADAH	FCDENT	FPTFTYDH
FPVGLFSCGT	GPRALRT	HYLLKWR	KETNAKPPALLPKV	KLCCAFYCDQL

FRLGGFLKK	GRAQGKH	HYLRATLR	KETNAKPPALVA	KLCGADPVVN
FRLVKRL	GRLHDPKRSQPP	HYVKFAPGSGTAKL	KETNAQPALLPKV	KLEKLLPKV
FRVKFL	GRPFKF	KACLQLAPP	KFASLPGF	KLEKVVPG
FSSVVVARAGNK	GSLLSLGSK	KACLTAAATPPA	KFKPVVELH	KLELKLPKV
FTLLPK	GSLLYLR	KADNVRPPA	KFVKVVG	KLETKA
FVKKTT	GYAAAEWPS	KAFEELDPPA	KGGKEILGLVN	KLETNAKPAPLVN
GDCFVVLT	HCLARATHGNLPP	KASAFPGAPP	KGLYPNEP	KLFKLPTH
GDLKLVKLDK	HCLDELDK	KAVLPYGH	KGPFNPP	KLFLT
GEEHPTLT	HCLDELDKS	KDDFCGEHVQL	KGVKNGH	KLFQAELLKHDVE
GEPKANTKGK	HCLTLGSWYLP	KDTAKKPKAPP	KHAQLPGLLQ	KLFRYLLHTALW
GFGSQDLESLT	HCLTNSLGNHLPP	KEALANGCEEPAPGPTAPEA	KHFGQDSNFPF	KLGGKNN
GHLTPK	HCLVYHNPLPP	KEALAPEPAPEPAPEPAP	KKDKE	KIKEKIIEA
GKGKEILGKI	HDM(+15.99)GCHM(+15.99)RLGCT	KEGPETFGR	KKEVPLTEL	KIKEKIIEAF
GKGKEILGKLFAL	HETPFAN	KEKLLPKVAT	KKHDDK	KIKEKIIEAKIKE
GKGKEILGKIKE	HHLGKEALLVT	KEKLLPKVV	KKKAKHVKKLVA	KIKEKIIESRTPAKK
GKGKEILGKIKEKIIEA	HKFPGLH	KELGLLVN	KKKAVGLNPR	KIKEKLNKALLK
GKGKEILGKIKEL	HKKPNSDH	KEILGKIKE	KKKNLP	KIKELKLEA
GKGKEILGLLPK	HKNQAVEH	KEILGKIKEKIIEA	KKLFVVG	KIKELKLEA
GKKPADTAAP	HLVYWDYLP(+15.99)YGG	KEILGKIKETNAKPPA	KKPHT	KIKELKLEAF
GKSVATA	HLYTRV	KEILGKLQNKLEA	KKSASANEVGTEGP	KIKELKLEALA
GKTALVK	HSKLQCAKLKPAP	KEILKGIKE	KKSDVL	KIKETNAKHKLPPKV
GLDLGLSRGFSRNGSKH	HYARLVTR	KELLTKKNWAKPAP	KKVFN	KIKETNAKPPAKLWDK
GLVWKHVKQLAV	HYLARRLT	KESAKKPPA	KLAELLS	KIKETNAKPPALFT
GPLRLVVWLT	HYLATRAP	KETGVM(+15.99)KPPA	KLAM(+15.99)SR	KIKETNAKPPALLK
GPLVHLT	HYLLKWR	KETLKKPGGA	KLCALVGQ	KIKETNAKPPALVN
KIKKTGKKLSAHH	KLTPAKIIEA	KPQDELDPYGT	KSSLYVLKK	LALLPNDKLGW
KIKSVDLVKK	KLTRT	KPSVKALKLRQ	KSTKLVL	LAVRLSP

KLLAHE	KLTWKVRVKR	KPTAKTGSAPP	KTCTLT	LDAPKANVLGAL
KLLAHE	KLVALLPNDQLR	KPVDQTALAPP	KTKYEYRSGVE	LDELDKSM(+15.99)L
KIIEAKDKCRAGVSER	KLVALLS	KPVNKGPKAPP	KTLLLELT	LDNM(+15.99)LLHT
KIIEAKDRCKAGSVER	KLVALSSSAKRHG	KPWKTGKPAPAP	KTSLVRR	LDSSVAM(+15.99)CHLDAP
KIIEAKDRCKASSLLQ	KLVCNPPA	KQCGEKDS	KTVEKFLSH	LEAKDQFLAELE
KIIEALLAK	KLVLALPNDKNKN	KQC NATNHVT	KVAKLGCAAKPPA	LFFRT
KIIEALLPK	KLVRAGKHSV	KQELTSQLEQYRN	KVCLLLPG	LFKALT
KIIEALLPK	KLVSDDKKLV	KQNDKHRR	KVEWLAAAP	LFKLPTH
KIIEALVN	KLVSDDKKLV	KREDAGAPP	KVLLPNDQL	LFKLT
KLLLPKVG	KLWRSKLVKR	KRGKGH	KVLLPQVG	LFRGL
KLLLPNDQL	KLWTKVRVKR	KRPYTVAPP	KVPKVECAR	LGDLGLSRFGSGSQ
KLLSVVF	KNDEKLKLV	KRVM(+15.99)LK	KVPSKKV	LGDLGLTFCGAKAQAA
KLLPVG	KNDYPKL	KSAEAEPLYQSK	KVTKEFLSH	LGEGFPAGH
KLLTQKSL	KNHPPK	KSATATQASAAP	KVVCLLH	LGGVDHG
KLM(+15.99)PAP	KNNLLPNDK	KSAWAPSPAP	KVVFGFLKK	LGLHLYVVAHLV
KLNSGKKRVKRL	KNPKADSPR	KSAWAPSPPA	KVVLVSGTVNLV	LGSKLLPKV
KLPVWTA FNACPT	KNPKLM(+15.99)PAP	KSDVVGL	KWLALST	LGSKLLPKV
KLSVDK	KNPLEDDEKLDK	KSEKAPCPPA	KWQLP	LGVGNAL
KLSVDKLLS	KNRHELQSPAP	KSGGTLLKHQLL	KYLGPVVGAPP	LKCAKLQPPAKH
KLSVVM(+15.99)QLPG	KNRLALGP	KSGLLPKVALT	LAAGM(+15.99)NCFL	LKCKLAKCKFVN
KLSWR	KNSTNAKPAP	KSGLLPLKVVG	LADRSF	LKEKIIEA
KLSWRLLN	KNWKLL	KSLKSKSSTNAKPPA	LAFTDAKPAP	LKEKIIEAF
KLTCRTL	KPGLLKTAKKPPA	KSNPKKASAPA	LALAAPVT	LKETNAKPAPLFT
KLTLAPPQKALNQV	KPPAKHK	KSSLVYLKK	LALLPK	LKETNAKPPAL
LKETNAKPPTALK	LLKLFTR	LLRGVR	LQETNAKPVKLQ	LVCSRKL
LKGLVTLKGLEA	LLKLLPNDQ	LLRRLS	LQHPPRPLPPP	LVEKKTSKVSPGP
LKKLSTKLQV	LLKLLS	LLSAAGLVLM(+15.99)LAKPP	LQKFWVL	LVGDGTEELVV

LKKLSTQLKLV	LLKLVN	LLSAKIKEKIIIEA	LQLLLSV	LVGR TK
LKKLWRSKLV	LLKQL	LLSAKIKTRLLEA	LQNEKLGKKEF	LVHLRPPCC
LKKRALARK	LLKQL	LLSAKIIIEA	LRSFGLSLLN	LVKAKKTP
LKLCEEFALQPP	LLHPS	LLSAKLVC RNAKPP	LSAFGWHALLKAAK	LVKFLGS
LKLLHVVP	LLHPS	LLSAKLWRS	LSALFTR	LVKLFTR
LKLLPKVR	LLHPS	LLSALLK	LSALLSLGSK	LVKLLPKV
LKTAELLK	LLNSNNFFCDHYLNWEPQ	LLSKNKTIIEAL	LSGCTLGGNLTAANN	LVKLLPKV
LLAGVLAL	LLNTAPEPAPEPAPEP	LLSLGSK	LSGFWGLADDLNN	LVRTLPS
LLDCLTPEDS	LLPFK	LLSLLQTPAQQ	LSGGM(+15.99)GLKAWAANN	LVSVGSKLV
LLDPKANTKTLKPP	LLPKF	LLSLNASPCPG	LSGM(+15.99)WGKRGWNN	LVSVGSKLV
LLELLL	LLPKLTAGVT	LLSLSGKGALLSL	LSLCSC	LVVSGNLLV
LLFLT	LLPKRS	LLSLVK	LSLLPK	LWNGKPL
LLFTR	LLPKVDS	LLTNLKLVPAT	LSLTGKPL	LWRSKLVKR
LLFVRDQF	LLPKVGVVR	LLVLGGS A	LSTKHTTEESM(+15.99)PL	LYDKESL
LLGKASSQPPALLK	LLPKVLVN	LNATFGSTTATLN	LSTRK	LYVLLYGH
LLGKIKEKIIIEA	LLPKVQ	LPEGSDDLLKKQKPGPLGL	LTCTLAPLTLGL	M(+15.99)FPDDPAGGH
LLGLLK	LLPKVQLLAE	LPGLFTR	LTEAGKGRTLGL	M(+15.99)LKSLLTDLT
LLGQLQEQIIIEA	LLPKVRLK	LPKVLLSA	LTQGYPADSKGTDQTTM(+15.99)	M(+15.99)LSKLVALKPYPPA
LLGVRR	LLPKVVG	LPKVLLSP	LTTLPS	M(+15.99)LVDK
LLKALDR	LLPKVVGKQ	LPKVLV	LTYGTQSAP	M(+15.99)PATGGM(+15.99)
LLKALFRT	LLPKVVGKRE	LPKVVG	LVALPSYLAAHA	M(+15.99)PDHEGGYTDQ
LLKALRGV	LLPNLLLPNDK	LPPQVW	LVALRR	M(+15.99)PGDHM(+15.99)
LLKLAV	LLPSKIKEKIIIEA	LPSLTQSL	LVAWANTAAP	M(+15.99)SDLPWLA AH
M(+15.99)SGLYGASSCGPT	PVPGRLL	QSYEQLAENRKQ	RTPPLL	TASAKLL
M(+15.99)SSQEYGLPS	PVPKLPT	QTKYLH	RVFLT	TDLRAR
M(+15.99)SVCNHAKLPP	QALTWQPP	QTLGYCECLYPN	RVWLEPAP	TGVGGHDA AH
NADSGARLVFHL	QARTAKH	QASSGLPFPAP	RYSEEYRM(+15.99)L	TLTLPS

NAGKEILGQLKE	QAVLAGVKM(+15.99)LPAP	QTPFDLPDDK	RYSEERYM(+15.99)L	TM(+15.99)LVQR
NFFNNVV	QDPNVD	QVLLLPNDQ	SGFLKV	TNAKPPAKIIEA
NKAKLLLLFALV	QEALAEPPAM(+15.99)HM(+15.99)ARP	QVLLPKV	SGGGGGGGLGSSNLR	TPM(+15.99)QFVAH
NKLPNLAAASTALVT	QEYGGYEAYLPN	QVPQVDDDN	SGLGSEAVLT	TRAGAPAP
NKYEDELNKR	QLCLARP	RAAGAPPA	SGLVETVL	TRANEVLVPP
NKYLL	QLCLCLFNPAF	RADWS	SGTRPEGS	TRFEEM(+15.99)GHN
NLAGPK	QLKVKANNNP	RAPNEP	SLLKKVFPKNAKPPA	TSKHLKNQVLA
NNGGGLGSHTVLGH	QLLLAL	RATGPR	SLLKLLPK	TSLVAVKLAS
NNGGGLGSKWR	QLLTLQ	RAVLPP	SLLSLGSK	TTKGPLKK
NNGGGLGSKWR	QLLTVLLPNDQ	RDVLLN	SLRRFLS	TTLLLAT
NNLVEVLT	QLM(+15.99)RPKKKREPK	REALRGDT	SLSLLAK	TTLLSLGTN
NNSGNLCLELR	QLQETNAKPPAL	RETNAKAPAP	SNGGGGGLGSWKR	TVFAAGAPP
NPSGLM(+15.99)EHH	QLSVVGSFLGP	RGPAPLGR	SPAPEPAM(+15.99)QKAPSPAGHC	TVHKEKIIEA
PALLWGHLRP	QLTLSEA	RGPFKF	SPNLNTDM(+15.99)Y	TVLCVLVS
PEEKWW	QLVHKFNH	RGPFKF	SRDGKKPP	TVLRFT
PNLPETTHLPP	QLVVKD	RGPFKFLSH	SRYRP	TVM(+15.99)DGSLLPED
PPLTFNPPLPPAP	QNVHSGNLP	RHTAPPA	SSFGRWLDPN	VADKPKSGRP
PPLTFNPPLPPAP	QPKDELDTNGFN	RLSLLKAVVH	SSFGRWLDPN	VADLGLLKCCSGSKAAKH
PRGFKFLSH	QPPM(+15.99)GE	RLSLLKAVVH	SSNYAGYYGGSKPVWGSYS	VADLGLTVCSGSGSKAA
PSAPEDSDPALLP	QPVAADGEALPP	RSLLALT	SVKPWGAPP	VCLATKH
PSTRTNAKAPAP	QKKKVT	RSTLLQPPN		
PTRTSLH	QSSEGYLVM(+15.99)SSEHE	RTKKPP		
VFKKTT	VVHLLPKVR	YQSGGKFP		
VFLNAGGCCLT	VVLVCDET	YRLGGFLK		
VFLNATHNPADASVT	VVPDYRRKSDE	YSEERYPY		
VFLNATSCKGSAVT	VVPPVGSK	YVPATSPVG		
VFSTGFKGT	VVQLLPNDKLEN	YFKPAP		

VGLLSLGSK	VVWPHKLFAP	YPGKRVLV
VKLFNNH	WAFWKLLP	VVGLSSLSNGHK
VKRACLV	WCLAKH	VVHLLPKV
VKWPLM(+15.99)KPAP	WDFLWPKAVPKLLGLE	SVNPKAGH
VLALLPNDQ	WEGDGM(+15.99)ALT	SVSVVVK
VLCVAHETAH	WGLVKVSH	VDETRPT
VLGALPNDK	WKPFLPPV	VDYLPH
VLLALAGT	WNPVAAKAPP	
VLSASPKLV	WPKALRAN	
VLSVGSKLV	WPKAVV	
VLTHVLAF	WPKLHSVPG	
VQLLPKV	WPKPYPNK	
VQLLSAHH	WSVKR	
VRLVLGT	WVCLLVEKAN	
VSDPFLH	WVPM(+15.99)SVD	
VSPKAFANGH	WVRFLVT	
VSTTSLT	WYVFLNATTSFTGAN	
VTPVDHK	YDESQWWHQAYADY	
VVGFRVA	YEKHGNSHQWRPD	

APÊNDICE B

Espectros das sequências peptídicas selecionadas para síntese

TsP1 – KEILGKIKETNAKPPA – Isolado da Fração F9

#	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	b (2+)	Seq	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	y (2+)	#
1	129.10	111.09	112.08	65.05	K					16
2	258.15	240.13	241.12	129.10	E	1608.93	1590.92	1591.90	804.97	15
3	371.23	353.22	354.20	186.12	I	1479.90	1461.88	1462.86	740.44	14
4	484.31	466.30	467.29	242.19	L	1366.81	1348.79	1349.78	683.90	13
5	541.34	523.32	524.31	271.17	G	1253.72	1235.71	1236.69	627.36	12
6	669.43	651.42	652.65	335.21	K	1196.74	1178.69	1179.69	598.86	11
7	782.51	764.50	765.50	391.76	I	1068.63	1050.59	1051.58	534.80	10
8	910.61	892.60	893.58	455.80	K	955.55	937.51	938.49	477.78	9
9	1039.65	1021.64	1022.64	520.33	E	827.43	809.42	809.97	414.21	8
10	1140.70	1122.69	1123.67	570.85	T	698.39	680.37	681.36	349.69	7
11	1254.74	1236.73	1237.72	627.87	N	597.34	579.32	580.35	299.17	6
12	1325.78	1307.76	1308.76	663.39	A	483.29	465.28	466.27	242.19	5
13	1453.88	1435.86	1436.85	727.44	K	412.26	394.24	395.23	206.63	4
14	1550.93	1532.92	1533.90	775.96	P	284.16	266.15	267.13	142.58	3
15	1647.99	1629.97	1630.95	824.49	P	187.11	169.10	170.08	94.05	2
16					A	90.05	72.04	73.03	45.53	1

TsP2 – KETNAKPPALLPKV – Isolado da Fração F12

#	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	b (2+)	Seq	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	y (2+)	#
1	129.10	111.09	112.08	65.05	K					14
2	258.15	240.14	241.12	129.10	E	1377.82	1359.80	1360.78	689.41	13
3	359.19	341.18	342.17	180.10	T	1248.77	1230.76	1231.74	624.88	12
4	473.24	455.23	456.32	237.12	N	1147.68	1129.71	1130.69	574.36	11
5	544.27	526.26	527.25	272.64	A	1033.70	1015.67	1016.65	517.79	10
6	672.37	654.36	655.34	336.68	K	962.64	944.63	945.61	482.22	9
7	769.42	751.41	752.39	385.21	P	834.55	816.52	817.52	417.77	8
8	866.49	848.46	849.45	433.74	P	737.49	719.48	720.46	369.25	7
9	937.51	919.50	920.48	469.26	A	640.45	622.43	623.41	320.95	6
10	1050.60	1032.63	1033.70	526.26	L	569.41	551.39	552.38	285.20	5
11	1163.68	1145.66	1146.66	582.34	L	456.32	438.20	439.29	229.16	4
12	1260.74	1242.72	1243.70	630.87	P	343.23	325.22	326.21	172.12	3
13	1388.83	1370.82	1371.80	694.91	K	246.18	228.18	229.16	123.59	2
14					V	118.09	100.08	101.10	59.54	1

TsP3 – GKGKEILGKIKE – Isolado da Fração F9

#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	58.03	40.02	41.00	29.51	G					12
2	186.12	168.11	169.10	93.56	K	1242.78	1224.77	1225.75	621.89	11
3	243.15	225.14	226.12	122.07	G	1114.69	1096.67	1097.66	557.84	10
4	371.24	353.22	354.20	186.12	K	1057.66	1039.65	1040.63	529.33	9
5	500.28	482.27	483.28	250.64	E	929.57	911.57	912.57	465.28	8
6	613.37	595.36	596.34	307.18	I	800.52	782.51	783.47	400.76	7
7	726.45	708.44	709.43	363.73	L	687.44	669.43	670.41	344.20	6
8	783.47	765.47	766.45	392.24	G	574.36	556.35	557.33	287.68	5
9	911.57	893.55	894.57	456.28	K	517.34	499.32	500.28	259.13	4
10	1024.65	1006.64	1007.64	512.83	I	389.24	371.24	372.19	195.11	3
11	1152.75	1134.74	1135.72	576.87	K	276.16	258.15	259.13	138.58	2
12					E	148.06	130.05	131.03	74.53	1

TsP4 – KEILGKIKE – Isolado da Fração F9

#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	129.10	111.09	112.08	65.05	K					9
2	258.15	240.14	241.12	129.10	E	929.56	911.55	912.54	464.81	8
3	371.23	353.22	354.20	186.12	I	800.52	782.51	783.51	400.76	7
4	484.32	466.30	467.29	242.19	L	687.44	669.43	670.42	344.22	6
5	541.34	523.32	524.31	271.13	G	574.36	556.35	557.33	287.68	5
6	669.43	651.41	652.40	335.21	K	517.34	499.32	500.30	259.13	4
7	782.51	764.50	765.49	391.76	I	389.24	371.23	372.21	195.12	3
8	910.61	892.60	893.59	455.81	K	276.16	258.15	259.13	138.58	2
9					E	148.06	130.05	130.93	74.53	1

TsP5 – GKGKEILGKIKEKIIIEA – Isolado da Fração F14

#	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	b (2+)	Seq	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	y (2+)	#
1	58.03	40.02	41.00	29.51	G					17
2	186.12	168.11	169.10	93.56	K	1797.12	1779.11	1780.09	899.06	16
3	243.13	225.14	226.12	122.07	G	1669.03	1651.02	1652.02	835.01	15
4	371.24	353.22	354.21	186.12	K	1612.01	1593.99	1594.98	806.50	14
5	500.29	482.27	483.26	250.64	E	1483.92	1465.91	1466.91	742.45	13
6	613.37	595.36	596.34	307.18	I	1354.87	1336.87	1337.86	677.93	12
7	726.46	708.44	709.42	363.73	L	1241.79	1223.77	1224.78	621.39	11
8	783.47	765.46	766.45	392.24	G	1128.70	1110.69	1111.67	564.85	10
9	911.59	893.56	894.54	456.32	K	1071.68	1053.67	1054.65	536.34	9
10	1024.67	1006.65	1007.62	512.83	I	943.59	925.57	926.59	472.29	8
11	1152.74	1134.73	1135.74	576.87	K	830.50	812.49	813.47	415.75	7
12	1281.80	1263.79	1264.76	640.92	E	702.41	684.45	685.38	351.70	6
13	1409.89	1391.86	1392.89	705.44	K	573.36	555.35	556.35	287.18	5
14	1522.97	1504.97	1505.96	761.98	I	445.27	427.23	428.25	223.13	4
15	1636.06	1618.05	1619.03	818.53	I	332.18	314.22	315.17	166.59	3
16	1765.10	1747.09	1748.07	883.05	E	219.10	201.09	202.07	110.05	2
17					A	90.05	72.04	73.03	45.53	1

TsP6 – FTLLPK – Isolado da Fração F14

#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	148.08	130.09	131.05	74.54	F					6
2	249.12	231.11	232.10	125.06	T	571.38	553.37	554.36	286.19	5
3	362.21	344.20	345.18	181.13	L	470.33	452.32	453.31	235.67	4
4	475.29	457.28	458.27	238.15	L	357.25	339.24	340.22	179.12	3
5	572.34	554.36	555.32	286.67	P	244.17	226.16	227.17	122.58	2
6					K	147.11	129.10	130.09	74.06	1

TsP7 – LLPKVQLLAE – Isolado da Fração F14

#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	114.09	96.08	97.06	57.55	L					10
2	227.18	209.17	210.15	114.09	L	1010.66	992.61	993.60	505.81	9
3	324.23	306.22	307.21	162.61	P	897.58	879.57	880.57	449.27	8
4	452.32	434.31	435.30	226.66	K	800.52	782.52	783.50	400.74	7
5	551.39	533.38	534.37	276.20	V	672.43	654.42	655.41	336.70	6
6	679.49	661.48	662.48	339.73	Q	573.36	555.41	556.30	287.16	5
7	792.57	774.56	775.55	396.77	L	445.27	427.26	428.24	223.13	4
8	905.66	887.61	888.59	453.32	L	332.18	314.17	315.15	166.59	3
9	976.66	958.65	959.63	488.83	A	219.10	201.09	202.07	110.05	2
10					E	148.06	130.05	131.07	74.53	1

TsP8 – LLPKVDS – Isolado da Fração F9

#	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	b (2+)	Seq	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	y (2+)	#
1	114.41	96.08	97.06	57.55	L					7
2	227.18	209.13	210.16	114.41	L	658.38	640.37	641.34	330.17	6
3	324.23	306.22	307.21	162.61	P	545.29	527.28	528.27	273.15	5
4	452.32	434.31	435.30	226.66	K	448.24	430.23	431.21	224.62	4
5	551.39	533.38	534.37	276.20	V	320.15	302.13	303.12	160.57	3
6	666.42	648.41	649.39	333.71	D	221.08	203.07	204.05	111.04	2
7					S	106.05	88.04	89.02	53.52	1

TsP9 – FLLPK – Isolado da Fração F12

#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	148.08	130.09	131.05	74.54	F					5
2	261.16	243.15	244.17	131.05	L	470.33	452.32	453.31	235.67	4
3	374.25	356.24	357.25	187.62	L	357.25	339.24	340.22	179.12	3
4	471.30	453.29	454.27	236.15	P	244.17	226.16	227.17	122.58	2
5					K	147.11	129.10	130.09	74.06	1

APÊNDICE C

Fluxograma com o delineamento experimental envolvendo os peptídeos sintéticos da fração de baixa massa molecular do VTs testados