Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho

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

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.**

São Paulo

2017

Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Fernanda Calheta
Vieira Portaro

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

2017

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)

Carvalho, Daniela Cajado de Oliveira Souza
Purificação e caracterização de peptidases
presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*
/ Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho;
orientador Fernanda Calheta Vieira Portaro. -- São
Paulo, 2017.
140 p.

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

1. Escorpião amarelo. 2. Veneno. 3. Purificação.
4. Peptidases. 5. Peptídeos bioativos. I. Portaro,
Fernanda Calheta Vieira, orientador. II. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 87131 - 8725434 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho no Programa: Biotecnologia, do(a) Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

Aos 21 dias do mês de setembro de 2017, no(a) ICB IV, realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Purificação e caracterização de peptidases 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>APROVADA</u>
Ivo Lebrun	Titular	IB - Externo	<u>APROVADA</u>
Geraldo Santana Magalhães	Titular	IB - Externo	<u>APROVADA</u>
Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira	Titular	UNIFESP - Externo	<u>APROVADA</u>
Adriana Karaoglanovic Carmona	Suplente	UNIFESP - Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Daniela Reis Niltonova, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 21 dias do mês de setembro de 2017.

Ivo Lebrun

Geraldo Santana Magalhães

Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira

Adriana Karaoglanovic Carmona

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 02.10.17 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Biotecnologia.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505

ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Purificação e caracterização de peptidases presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*", **protocolo nº 1162/13**, sob a responsabilidade de Fernanda Calheta Vieira Portaro e Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/12/2013.

This is to certify that the proposal "Purification and characterization of peptides present in the venom of *Tityus serrulatus* scorpion", **protocol nº 1162/13**, under the responsibility of Fernanda Calheta Vieira Portaro and Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho, - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 12/11/2013. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
12/2014 - 06/2015	
Laboratório de Imunoquímica	48 ratos Wistar 230-250 (M)

São Paulo, 12 de dezembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro por todo carinho e dedicação durante todos esses anos. Sei que muitas vezes te deixei de “cabelo em pé” por conta da minha ansiedade, mas acho que podemos dizer que aprendemos e conquistamos muitas coisas juntas.

Ao Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan e a Dra. Denise Vilarinho Tambourgi pela oportunidade de estágio e de aprimoramento profissional.

Aos meus queridos amigos Alexandre Kazuo Kuniyoshi, Bruno Duzzi, Cristiane Castilho Silva e Roberto Tadashi Kodama pela amizade, discussões científicas de séries e filmes, apoio científico em teorias de universos paralelos, risadas, hamburgeses, sorvetes&gelatos, viagens de congresso e ajuda em grande parte dos experimentos realizados deste trabalho!.

Aos professores, pesquisadores, alunos e funcionários do laboratório, pelo trabalho exemplar e pela ajuda diária - em especial, ao Fábio Carlos Magnoli (Fabinho), pelas discussões sobre purificação; À Isa Villas Boas e À Pri Hess por toda ajuda durante esses anos.

À Dra. Úrsula Castro de Oliveira e ao Dr. Inácio Junqueira-de-Azevedo por disponibilizarem dados do transcriptoma do escorpião *Tityus serrulatus*, fornecendo assim dados essenciais para o trabalho.

À Dra. Ana Karina de Oliveira e sua orientadora Dra. Solange Serrano, que me auxiliaram nas análises iniciais de espectrometria de massas quanto as hidrólises dos peptídeos pela ação das proteases do veneno de *Tityus serrulatus*.

Ao Dr. Leo Kei Iwai e ao técnico Ismael Feitosa Lima do Laboratório de Toxinologia Aplicada pela colaboração com o Orbitrap.

Ao Thiago de Jesus Oliveira e a Soraia Maria do Nascimento, do Laboratório de Toxinologia Aplicada pelas fotos dos *Tityus serrulatus* e pela aula de extração de veneno de escorpião.

Aos meus alunos de PIBIC Junior Isa e Fer por me ensinarem um pouco como é ser uma orientadora e pela ajuda nos experimentos de caracterização das metalloserrulases.

À SBTx e à SBTx jovem – Alê, Andrea, Bruno, Juliana, Felipe – pela experiência de participar da comissão da SBTx jovem. Acredito que pudemos fazer uma diferença na nossa gestão!

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (projeto 2013/15343-0) e o suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho e da publicação dos artigos.

À minha família, em especial minha mãe, minha irmã e meu *futuro-marido* Thiago pelo grande apoio, por lerem quase todos meus textos e ouvirem todas minhas apresentações orais várias e várias (e várias) vezes.

À Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia por toda ajuda.

Aos meus amigos e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

E, finalmente, aos escorpiões amarelos que forneceram seus venenos, permitindo este estudo!

Agradecimento à agência de fomento

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e por suporte financeiro do projeto de doutorado intitulado “Purificação e caracterização de peptidases presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*” (projeto 2013/15343-0), que possibilitou a realização deste trabalho e da publicação dos artigos.

“The desire for knowledge shapes a man”

Patrick Rothfuss – The wise man’s fear

Resumo

CARVALHO, D. C. O. S. Purificação e caracterização de peptidases presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. 2017. 140 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Acidentes causados por escorpião representam um problema relevante para a saúde pública no Brasil, sendo a principal espécie envolvida o escorpião *Tityus serrulatus* devido ao potencial do veneno para induzir quadros de envenenamento graves. O tratamento recomendado no caso de sintomas sistêmicos é o uso dos soros específicos (antiescorpiônico e antiaracnidico). Na composição deste veneno, as neurotoxinas são as moléculas mais estudadas e conhecidas. Em contraste, pouco se sabe sobre os componentes proteolíticos dos venenos de escorpiões e seus efeitos no envenenamento. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar bioquimicamente as peptidases presentes no veneno e suas possíveis participações no envenenamento, além de avaliar o potencial neutralizante dos antivenenos produzidos pelo Instituto Butantan. Primeiramente, foi avaliada a hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos bradicinina, angiotensina I, dinorfina 1-13 e peptídeos da família do neuropeptídeo Y pelo veneno total. Os pontos de clivagem dos substratos foram obtidos por espectrometria de massas, sendo observada concomitante participação de endo, amino e carboxipeptidases. A classe enzimática atuante nestes novos substratos foi verificada, bem como a neutralização pelos antivenenos, sendo observada a ação exclusiva de metalopeptidases que são parcialmente neutralizadas em doses moderadas de ambos os soros. Substratos fluorescentes foram utilizados, Abz-GFLRRV-EDDnp e Abz-FRK(Dnp)P-OH, e pelo uso de inibidores específicos foi notado que são alvos de diferentes proteases do veneno, endopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. Após essas caracterizações, etapas de purificação foram iniciadas com base no *screening* de atividades relevantes observadas no veneno total. Na primeira etapa, troca aniônica, diferentes atividades sobre os substratos naturais foram observadas principalmente em 3 frações, as quais foram posteriormente fracionadas por gel-filtração. Para duas diferentes frações provenientes da etapa de gel-filtração, membranas de corte molecular de 30 kDa foram utilizadas como refinamento, obtendo a purificação de duas endopeptidases. Para a purificação da carboxipeptidase com atividade similar a ACE, foi necessária uma etapa cromatográfica adicional em uma coluna de troca catiônica, resultando na amostra homogênea. As três bandas do gel relativas as peptidases purificadas foram submetidas à análise por espectrometria de massas e os resultados indicaram a purificação das metalloserrulases 3 e 4 e para a carboxipeptidase, com auxílio de sequências do transcriptoma de *T. serrulatus*, foi identificada uma ACE-like. A formação de angiotensina II e a inativação da bradicinina *in vitro* pela ACE-like purificada pode indicar um possível envolvimento desta peptidase no quadro de hipertensão, comumente apresentado pelas vítimas. Os peptídeos da família do neuropeptídeo Y e a dinorfina 1-13, que haviam sido caracterizados inicialmente como substratos para o veneno total, também foram hidrolisados pelas metalloserrulases purificadas, podendo indicar a contribuição destas peptidases nos efeitos neurotóxicos, também presentes nos acidentados. Os pontos de clivagens foram determinados, permitindo o estudo da especificidade primária das duas endopeptidases. Além disso, as condições ótimas de trabalho foram determinadas para todas as peptidases purificadas. Por fim, este trabalho fornece informações importantes sobre três proteases do veneno de *T. serrulatus*, bem como seus possíveis papéis nos sintomas de envenenamento por este escorpião.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*. Escorpião. Proteases. Metalloserrulases. ACE-like. Antivenenos.

Abstract

CARVALHO, D. C. O. S. Purification and characterization of peptidases from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. 2017. 140 p. Doctorate thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Accidents caused by scorpions are a relevant health problem in Brazil, with the *Tityus serrulatus* scorpion as the main species associated to it, as severe envenomations are possible. The recommended treatment for systemic symptoms is the use of specific antivenom (antiscorpion and antiarachnid). In the composition of the venom, neurotoxins are the most studied and, in contrast, little is known about the proteolytic components of scorpion venoms and their effects on envenomation. Thus, the objective of this work was to biochemically study the peptidases present in the venom and their possible role in the envenomation, as well as to evaluate the neutralizing efficacy of the antivenoms produced by the Butantan Institute. First, hydrolysis of the biologically active peptides bradykinin, angiotensin I, dynorphin 1-13 and peptides of the neuropeptide Y family by crude venom was evaluated. The cleavage points of the substrates were obtained by mass spectrometry, indicating concomitant participation of endo, amino and carboxypeptidases. The enzymatic class acting on these new substrates was tested, as well as its neutralization by the antivenoms, and the exclusive action of metallopeptidases which are partially neutralized in moderate doses of both sera were observed. Fluorescent substrates, Abz-GFLRRV-EDDnp and Abz-FRK(Dnp)P-OH, were used, and by the action of specific inhibitors it was noted that they are targets of different venom proteases, endopeptidases and carboxypeptidases, respectively. After these characterizations, purification steps were started based on the screening of relevant activities observed in the crude venom. Firstly, the anion exchange led to 3 different fractions of interest, which were later fractionated by gel filtration. For two different fractions obtained from the gel filtration step, 30 kDa molecular cut off membranes were used, and the purification of two endopeptidases were obtained. A new step, using a cation exchange column, was performed for the purification of carboxypeptidase with ACE-like activity, resulting in a uniform sample. The three gel bands corresponding to the purified peptidases were submitted to mass spectrometry analysis and the results indicated the purification of the metalloserrulases 3, 4 and the carboxypeptidase. The formation of angiotensin II and the *in vitro* inactivation of bradykinin by the purified ACE-like may indicate a possible involvement of this peptidase on the victims' hypertension. The neuropeptide Y family peptides and dynorphin 1-13 - previously characterized as substrates for the crude venom - were also hydrolyzed by the purified metalloserrulases, and this could indicate the contribution of these peptidases to the neurotoxic effects on envenomation victims. The cleavage points were determined, allowing for the study of the primary specificity of the two endopeptidases. In addition, optimal working conditions were determined for all purified peptidases. Finally, this work provides important information on three proteases of *T. serrulatus* venom, as well as their possible roles in the envenomation symptoms.

Keywords: *Tityus serrulatus*. Scorpion. Peptidases. Metalloserrulases. ACE-like. Antivenoms.

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Seleção de novos substratos para o veneno de <i>Tityus serrulatus</i> em tampão 1 e tampão 2.....	46
Tabela 02 - Determinação dos produtos de hidrólise dos novos substratos do veneno total de <i>T. serrulatus</i>	47
Tabela 03 - Determinação dos produtos de clivagem da angiotensina I e bradicinina hidrolisadas pelo veneno de <i>T. serrulatus</i>	50
Tabela 04 - Inibição das peptidases do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> na hidrólise de peptídeos biologicamente ativos utilizando os inibidores captopril e EDTA.....	53
Tabela 05 - Atividade específica do veneno total de <i>Tityus serrulatus</i> e das frações coletadas da troca aniônica sobre a hidrólise de hemopressina e Abz-FRK(Dnp)P-OH.....	60
Tabela 06 - Comparativo de identidade e similaridade de estrutura primária dos transcritos de ACEs do veneno de <i>T. serrulatus</i> , <i>T. bahiensis</i> , e <i>T. obscurus</i> e da ACE testicular humana.....	68
Tabela 07 - Atividade específica do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> e das frações coletadas da troca aniônica na hidrólise de dinorfina 1-13 fluorescente Abz-GFLRRV-EDDnp.....	73
Tabela 08 - Pontos de clivagem do neuropeptídeo Y, peptídeo YY e polipeptídeo pancreático pela hidrólise das metalloserrulases 3 e 4.....	88
Tabela 09 - Determinação das constantes cinéticas da metalloserrulase 4 purificada em pH ideal.....	90
Tabela 10 - Comparativos de inibição entre o veneno total de <i>Tityus serrulatus</i> , metalloserrulase 3 e metalloserrulase 4 frente ao soro antiescorpiônico e soro antiaracnídeo.....	110

Lista de Figuras

Figura 01 - Escorpião amarelo, evidenciando o tamanho, as serrilhas e a coloração.....	21
Figura 02 - Tempo de atendimento versus letalidade de acidentes por escorpiões.....	24
Figura 03 - Esquema representando as etapas de purificação e os <i>screenings</i> de atividade utilizados no presente trabalho.....	37
Figura 04 - Ensaio de atividade do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> sobre os substratos Abz-GFLRRV-EDDnp e Abz-FRK(Dnp)P-OH à direita).....	51
Figura 05 - Inibição das atividades do VTs sobre os substratos fluorescentes para carboxi e endopeptidases.....	52
Figura 06 - Análise de hidrólise da hemopressina pelo VTs em cromatografia de fase reversa e inibição por captopril.....	54
Figura 07 - Efeito da concentração de íons cloreto sobre Enzima Conversora de Angiotensina I e veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	55
Figura 08 - Curva de inibição por neutralização com antivenenos comerciais utilizando o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp e o veneno de <i>T. serrulatus</i>).....	56
Figura 09 - Curva de neutralização com antivenenos comerciais utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH e o veneno de <i>T. serrulatus</i>	57
Figura 10 - Neutralização de peptidases do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> por antivenenos comerciais utilizando como substratos peptídeos biologicamente ativos.....	58
Figura 11 - Perfil cromatográfico do veneno total de <i>T. serrulatus</i> utilizando a coluna de troca aniônica.....	59
Figura 12 - Ação peptidásica da fração F1 em Angiotensina I (incubação <i>overnight</i>) e Hemopressina.....	61
Figura 13 - Gel SDS-PAGE de poliacrilamida a 13% com coloração Coomassie Blue Coloidal do veneno total de <i>T. serrulatus</i> (VTs) e da fração F1 proveniente da cromatografia de troca iônica.....	62
Figura 14 - Perfil cromatográfico da fração F1 em gel-filtração.....	63
Figura 15 - Resultados das subsfrações de F1 obtidas em gel-filtração.....	64
Figura 16 - Cromatografia de troca catiônica da fração F1-2.....	65

Figura 17 – Análise das subfrações de F1-2 obtidas na cromatografia de troca catiônica.....	66
Figura 18 - Resultado da banda de F1-2.7 - Identificação por espectrometria de massas da enzima conversora de angiotensina-I similar a peptidase transcrita em <i>Tityus serrulatus</i>	67
Figura 19 - Alinhamento da sequência primária das enzimas conversoras de angiotensina I.....	69
Figura 20 - Determinação das constantes cinéticas do substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH utilizando a serACE-like do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> ...	70
Figura 21 – Influência do pH na atividade peptidásica de serACE-like.....	71
Figura 22 - Influência da temperatura na atividade de ACE-like.....	72
Figura 23 - Ação do veneno total e das frações da DEAE sobre dinorfina 1-13.....	75
Figura 24 - SDS-PAGE a 13% com coloração por prata das frações do veneno de <i>T. serrulatus</i> após a cromatografia de troca iônica.....	76
Figura 25 - Perfil cromatográfico da fração F3 em gel-filtração.....	77
Figura 26 - Resultados das subsfrações de F3 obtidas em gel-filtração.....	78
Figura 27 - Perfil cromatográfico da fração F5 em gel-filtração.....	79
Figura 28 - Resultados das subsfrações de F5 obtidas em gel-filtração.....	80
Figura 29 - Resultado da banda de F3-4 - Identificação da metalloserrulase 3 de <i>Tityus serrulatus</i> por espectrometria de massas e análise em software Peaks DB.....	81
Figura 30 - Resultado da banda de F5-1 - Identificação da metalloserrulase 4 de <i>Tityus serrulatus</i> por espectrometria de massas e análise em software Peaks DB.....	82
Figura 31 - Alinhamento em BLAST da metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3 maduras.....	83
Figura 32 - Modelagem molecular teórica preliminar de metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3 usando o software Phyre ²	84
Figura 33 - Influência do pH na atividade específica de metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3 utilizando o substrato FRET.....	85

Figura 34 - Estudo da influência de cátions mono e bivalentes na atividade de metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3.....	86
Figura 35 - Influência da temperatura na atividade de metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3.....	87
Figura 36 - Perfil cromatográfico da hidrólise de Abz-GFLRRV-EDDnp por metalloserrulase 3 (ms3) e metalloserrulase 4 (ms4).....	88
Figura 37 - Estudo dos sítios preferencias dos substratos clivados por metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3.	89
Figura 38 - Ensaio de inibição por soroneutralização com antivenenos comerciais utilizando o substrato Abz-FLRRV-EDDnp e as peptidases isoladas metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3.....	91

Lista de Abreviaturas

Abz	Radical fluorescente ácido <i>orto</i> -aminobenzoico
ACE	Enzima conversora de Angiotensina I
ACN	Acetonitrila
ADAM	<i>A Disintegrin and A Metaloproteinase</i>
PRO	Peptídeo Rico em Prolina (<i>Proline Rich Peptide</i>)
DEAE	Diethylaminoethyl
ECE	Enzima conversora de endotelina
EDDnp	Grupo apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Performance
k_{cat}	Constante catalítica
K_i	Constante de Inibição
K_m	Constante de Michaelis–Menten
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
NEP	Neprilisina
PBS	Tampão Fostato Salino
PMSF	Fluoreto de fenil metil sufonil
MALDI-Tof	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization -Time of Flight</i>

Ms3	Metalloserrulase 3
Ms4	Metalloserrulase 4
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SAE	Soro antiescorpiônico
SAAr	Soro antiaracnídico
SINAN	Sistema De Informação De Agravos De Notificação de Animais Peçonhentos
serACE-like	Enzima Conversora de Angiotensina símile do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
UF/min	Unidade de Fluorescência por minuto
VTs	Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>

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	Ille	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.....	20
1.1 Biologia dos escorpiões.....	20
1.2 O envenenamento: epidemiologia e sintomas.....	21
1.3 Tratamento do escorpionismo: Antivenenos comerciais.....	22
1.4 Componentes do veneno.....	25
2 OBJETIVOS GERAIS.....	31
2.1 Objetivos específicos.....	31
<i>2.1.1 Objetivos específicos com o Veneno Bruto.....</i>	<i>31</i>
<i>2.1.2 Objetivos Específico com as Proteases Isoladas.....</i>	<i>31</i>
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Reagentes.....	32
3.2 Veneno e antivenenos.....	32
3.3 Teste de clivagem de peptídeos biologicamente ativos pelo veneno de <u>Tityus serrulatus</u>.....	32
3.4 Análise dos pontos de clivagem dos novos substratos.....	33
3.5 Testes de atividade enzimática, utilizando substratos fluorescentes.....	34
3.6 Neutralização da atividade peptidásica do veneno de <u>Tityus serrulatus</u> por antivenenos comerciais e inibidores.....	34
<i>3.6.1 Uso do Abz-GFLRRV-EDDnp e Abz- FRK(Dnp)P-OH em fluorímetro.....</i>	<i>34</i>
<i>3.6.2 Análise da clivagem de peptídeos biologicamente ativos em cromatografia de fase reversa.....</i>	<i>35</i>
3.7 Purificação das metalopeptidases presentes no veneno de <u>Tityus serrulatus</u>.....	36
<i>3.7.1 Esquema geral de purificação das peptidases serACE-like, metalloserrulase 3 e metalloserrulase 4.....</i>	<i>36</i>
<i>3.7.2 Cromatografia de troca aniônica.....</i>	<i>37</i>
<i>3.7.3 Caracterização das subfrações.....</i>	<i>38</i>
<i>3.7.3.1 Screening de atividade peptidásica das subfrações do veneno de <u>T. serrulatus</u>.....</i>	<i>38</i>
<i>3.7.3.2 Utilização de membrana de corte molecular.....</i>	<i>39</i>
<i>3.7.3.3 Análise em gel de SDS-PAGE 13%.....</i>	<i>39</i>

3.7.4 Cromatografia de exclusão molecular (gel-filtração).....	39
3.7.5 Cromatografia de troca catiônica.....	40
3.7.6. Determinação das sequências primárias das peptidases purificadas por digestão <i>in gel</i> e espectrometria de massas.....	40
3.7.6.1 Análise de dados.....	41
3.8 Análises de bioinformática das peptidases purificadas.....	42
3.9 Análise do ponto de clivagem do substrato fluorescente Abz-GFLRRV-EDDnp.....	42
3.10 Análise do ponto de clivagem dos substratos naturais.....	43
3.11 Determinação de condições ótimas e parâmetros cinéticos das enzimas purificadas.....	43
3.12 Determinação das constantes catalíticas (K_m e k_{cat}) de metalloserrulase 4 e serACE-like sobre substratos FRETs.....	44
3.13 Teste de inibição por soroneutralização das metalloserrulases purificadas por antivenenos comerciais.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Análise da atividade peptidásica do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> utilizando peptídeos biologicamente ativos (PBA).....	46
4.2 Seleção de substratos fluorescentes para endo- e carboxipeptidases do VTs.....	50
4.3 Ensaio de inibição do veneno total de <i>Tityus serrulatus</i>	51
4.4 Influência do íon cloreto na atividade da ACE-like do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	54
4.5 Análise do potencial neutralizante dos antivenenos comerciais sobre as hidrólises dos substratos fluorescentes e peptídeos bioativos pelo veneno total	55
4.6 Fracionamentos do veneno total: Purificação das metalopeptidases do VTs.....	59
4.6.1 Purificação da Enzima conversora de angiotensina I do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	59
4.6.1.1 Passo I: Cromatografia de troca aniônica.....	59
4.6.1.2 Cromatografia de exclusão molecular (Gel-Filtração)	63
4.6.1.3 Cromatografia de troca catiônica.....	64
4.6.1.4 Caracterizações bioquímicas da enzima conversora de angiotensina I-like..	70
4.6.1.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos de serACE-like.....	70
4.6.1.4.2 Determinação das condições ideais do tampão de trabalho de serACE-	71

<i>like</i>	
4.6.2. Purificação das metalloserrulases 3 e 4.....	72
4.6.2.1 Passo I: Cromatografia de troca aniônica.....	72
4.6.2.2 Cromatografia de exclusão molecular (Gel-Filtração)	77
4.6.2.3 Análise de massas e bioinformática.....	81
4.7 Caracterizações bioquímicas das metalloserrulases 3 e 4	84
4.7.1 Influência do pH na atividade proteolítica das metalloserrulases 3 e 4.....	84
4.7.2 Influência dos sais mono e bivalentes na atividade das metalloserrulases 3 e 4.....	85
4.7.3 Determinação da temperatura ideal para melhor atividade catalítica das metalloserrulases 3 e 4.....	86
4.7.4 Determinação dos pontos de hidrólise preferenciais nos substratos fluorescentes e nos peptídeos bioativos.....	87
4.7.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da metalloserrulase 4.....	90
4.8 Ensaio de inibição por soneutralização da atividade das metalloserrulases pelos antivenenos comerciais	91
5 DISCUSSÃO	92
5.1 Estudos com o veneno total para screening de atividades relevantes.....	93
5.2 Purificação da Enzima Conversora de Angiotensina I do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	99
5.3 Purificação das metalloserrulases: diferenciação funcional e estrutural.....	103
6 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	113
ANEXO A – Lista de produções bibliográficas.....	121
ANEXO B – Artigo publicado: “Insights into the Hypertensive Effects of <i>Tityus serrulatus</i> Scorpion Venom: Purification of an Angiotensin-Converting Enzyme-Like Peptidase”	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia dos escorpiões

Animais peçonhentos são encontrados amplamente em todo o globo terrestre e são representados por variados táxons, abrangendo invertebrados (como cnidários, gastrópodes, insetos, aranhas, escorpiões) e vertebrados (peixes, lagartos, serpentes, aves e mamíferos) (CASEWELL et al., 2013). O desenvolvimento de órgãos especializados para a injeção da peçonha fez do envenenamento um ágil e efetivo método de defesa e/ou predação. Curiosamente, o sistema de predação por envenenamento foi proposto para alguns fósseis de animais já extintos, como para dromeossauros do gênero *Sinornithosaurus* spp e para o mamífero *Bisonalveus browni*, devido à presença de presas especializadas em ambos (FOX; SCOTT, 2005; GONG et al., 2010). Sendo assim, a ampla diversidade taxonômica de seres peçonhentos, somada ao alto nível de especialização destes animais indicam uma grande importância do veneno para sua sobrevivência durante a evolução (CASEWELL et al., 2013).

Os escorpiões são exemplo de sucesso evolutivo dentre os animais peçonhentos, por habitarem a Terra há aproximadamente 400 milhões de anos e por, geograficamente, estarem presentes em todos os continentes do planeta, com exceção da Antártida (BORTOLUZZI et al., 2007). Atualmente são catalogadas aproximadamente 2000 espécies de escorpiões que se agrupam em sete famílias em todo o mundo (CORDEIRO et al., 2015). Grande parte das espécies de escorpiões conhecidas está classificada na família Buthidae, a qual compreende os principais escorpiões de importância médica (LOURENÇO, 2015). Essa relevância para a saúde é relacionada com a capacidade destes animais de promoverem um grave quadro de envenenamento em seres humanos, podendo até mesmo levar à morte (COLOGNA et al., 2009).

O escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*, é uma das principais espécies brasileiras de maior relevância para a saúde pública. A espécie foi descrita por Adolpho Lutz e Oswaldo Mello de Campos em 1922, os quais destacaram a alta toxicidade de seu veneno. Esses animais apresentam traços morfológicos bem característicos, medindo entre seis e sete centímetros na fase adulta, apresentando coloração amarelada escura por todo o corpo e a presença de serrilhas dorsais nos dois últimos segmentos de seu corpo, que dá nome à espécie desses animais (*serrulatus*) (Figura 01).

Figura 01 - Escorpião amarelo, evidenciando o tamanho, as serrilhas e a coloração (Fotos: Thiago de Jesus Oliveira / Bruno Duzzi, Daniela Cajado-Carvalho).

A reprodução partenogenética é também característica marcante desta espécie, na qual as fêmeas são capazes de gestar filhotes sem a fertilização pelo macho. Como a maioria dos artrópodes, o crescimento dos filhotes ocorre pela troca de cutícula (ecdise), atingindo a maturidade sexual após a quinta ecdise. O tempo de vida médio do escorpião *T. serrulatus* é de até quatro anos (WILLIAMS, 1987).

1.2 O envenenamento: epidemiologia e sintomas

No Brasil, são registrados, por ano, mais de 150 mil acidentes por animais peçonhentos e aproximadamente 250 óbitos. Os casos de escorpionismo, em especial, vêm aumentando gradativamente, sendo que, em 2013, representou 49% dos envenenamentos por animais, superando casos de picadas por serpentes (17%) e acidentes com aranhas (18,5%), concomitantemente (dados do Sistema De Informação De Agravos De Notificação de Animais Peçonhentos, SINAN, 2017). Os principais fatores para o aumento da incidência estão atrelados à biologia dos escorpiões, em especial devido à reprodução partenogenética dos indivíduos da espécie *Tityus serrulatus* e pela fácil adaptação em ambientes urbanos, o que acarreta em uma maior probabilidade de ocorrência de acidentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Tendo em vista a grande potência de seu veneno, o escorpião *T. serrulatus* é considerado uma das espécies de maior importância epidemiológica e médica no Brasil (SOARES et al., 2002).

O escorpionismo pode levar a complicações clínicas nos acidentados. Por vezes, a ferroadada pode ser seca, ou seja, sem a inoculação de veneno, sendo que o

envenenamento não se desenvolve (BUCARETCHI et al., 2014). Contudo, na maioria dos casos há injeção de veneno, levando a sintomas que são classificados em três principais estágios clínicos (CHIPPAUX, 2012): **Estágio I**, o qual tem início imediato após o acidente, é caracterizado por manifestações locais como dor, parestesia, eritema e equimose; O **Estágio II** é iniciado pelo aparecimento de manifestações sistêmicas moderadas, associadas ao sistema nervoso (confusão, agitação, salivação, sudorese, náuseas, fraqueza, sensação de desmaio, hipotermia/hipertermia), ao sistema cardiovascular e respiratório (taquicardia, arritmias, hipertensão/hipotensão arteriais, dispneia), alterações digestivas (diarreia, vômitos), além de desordens gerais (hiperleucocitose, hiperglicemia, acidose); O **Estágio III**, por sua vez, é potencialmente letal, com intensificação dos sintomas sistêmicos, como a ocorrência de choque cardiogênico, arritmia ventricular, edema pulmonar, convulsões e paralisia. Apesar de os estágios serem normalmente progressivos, existe o risco da evolução direta do estágio I para o estágio III, principalmente em crianças (CHIPPAUX, 2012).

Os efeitos do veneno e a letalidade estão diretamente relacionados com a potência do veneno: em experimento de injeção subcutânea, a dose letal mediana (DL_{50}) do veneno do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* variou de $2,9 \pm 0,3$ mg/Kg, em ratas jovens, a $10,8 \pm 0,6$ mg/Kg, em ratos machos adultos (NUNAN et al., 2001). De fato, acidentes com crianças mostram-se potencialmente mais fatais do que para adultos (GUERRA et al., 2008) que se deve pelo tamanho do corpo e/ou por uma maior susceptibilidade da barreira hematoencefálica, o que permite o acesso de toxinas ao sistema nervoso central (GUIDINE et al., 2014). Por outro lado, comparativamente, a letalidade deste mesmo veneno em insetos mostra-se cerca de um milhão de vezes mais efetiva do que em mamíferos como, por exemplo, a DL_{50} para o grilo preto, presa comum de escorpiões, que foi calculada em 19,91 ng/Kg (MANZOLI-PALMA et al., 2003).

1.3 Tratamento do escorpionismo: Antivenenos comerciais

Os soros antivenenos representam a única terapia existente e recomendada pela Organização Mundial da Saúde e pelo Ministério da Saúde para o tratamento de acidentes com animais peçonhentos. Historicamente, a produção de soros antivenenos iniciou-se por volta de 1897, na França, com a produção dos soros antitetânico e antidiftérico. O método de fabricação descrito se mantém até os dias atuais, com modificações pontuais, sendo eles: extração do soro de cavalos previamente tratado com o *pool* de veneno desejado, precipitação salina deste soro e digestão por pepsina, com o

quais são obtidos os fragmentos de baixo peso, $F(ab')_2$, de IgG como produto final, o que garante redução de reações adversas. Desde então, o que se tem desenvolvido na produção de antivenenos são melhorias no processo de purificação dos anticorpos, que se tornou mais refinado (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008). A duração do processo de produção do soro é de aproximadamente seis meses (SILVA et al., 2005).

No Brasil, três instituições são responsáveis pela produção de soros capazes de neutralizar o veneno de *Tityus serrulatus*: Instituto Butantan (soro antiescorpiônico e soro antiaracnídico), Instituto Vital Brazil (soro antiescorpiônico) e Fundação Ezequiel Dias (soro antiescorpiônico). É interessante apontar que os soros antiescorpiônicos utilizam somente o veneno da espécie *Tityus serrulatus* no pool de imunização dos cavalos. No caso do soro antiaracnídico, produzido pelo Instituto Butantan, os animais são imunizados com uma mistura dos venenos do escorpião amarelo (*T. serrulatus*), e das aranhas armadeira (*Phoneutria nigriventer*) e marrom (*Loxosceles gaucho*). Desde 1986, a distribuição de antivenenos é gratuita, sendo o Ministério da Saúde o órgão responsável pela aquisição, distribuição, e pelo estímulo à pesquisa e ao desenvolvimento de novos produtos (SANTOS, 2005). Apesar da administração de antivenenos ser recomendada para o tratamento de escorpionismo, é relatado que, para adultos em estágio I de envenenamento, a aplicação de anestésicos muitas vezes já é efetiva para o alívio da dor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), embora se recomende que o paciente deva ser observado até a certificação de que o quadro não se agravará.

O tempo entre a picada e a aplicação do antiveneno é um fator determinante para a efetividade do tratamento, pois caso o acidentado leve muitas horas para procurar o tratamento, o quadro pode ser irreversível (ABROUG et al., 1999). Dados do Ministério da Saúde também indicam que a letalidade aumenta progressivamente com o prolongamento do tempo de atendimento (Figura 02).

Figura 02 - Tempo de atendimento *versus* letalidade de acidentes por escorpiões (SINAN, 2017).

Outros trabalhos, por sua vez, demonstram que o volume de veneno injetado é determinante para a gravidade do acidente e, portanto, do tratamento a ser realizado. Foi demonstrada por estudo farmacocinético que a severidade do acidente estaria associada à quantidade de veneno circulante, e que o tratamento com o soro antiescorpiônico brasileiro é capaz de reduzir os níveis de veneno no plasma de acidentados (DE REZENDE et al., 1996).

Outro fato importante a ser considerado é a utilização de altas doses de antiveneno para o tratamento de acidentados (ISMAIL, 1995). Reações adversas dos antivenenos são conhecidas durante o tratamento contra picadas de animais peçonhentos e, geralmente, estão associadas à alta quantidade de proteína heteróloga (anticorpos do cavalo) inoculadas no paciente. Por exemplo, foi reportado que, nos Estados Unidos, 60% dos pacientes apresentaram reações adversas precoces após a utilização do soro antiescorpiônico norte-americano, sendo este composto de IgGs íntegras (ISBISTER et al., 2003). As reações adversas mais comuns são urticária, febre, mal-estar e dores articulares, além de reações anafiláticas conhecidas como “doença do soro” (ISBISTER et al., 2003). Por outro lado, o novo soro antiescorpiônico norte americano contendo apenas a porção $F(ab')_2$ do anticorpo, denominado Anascorp® apresenta menor risco de complicações adversas e é eficiente no tratamento de casos graves de escorpionismo, principalmente em crianças (BOYER et al., 2009; BOYER et al., 2013). Outro fator que

contribui para o aparecimento de reações adversas é o contato múltiplo do paciente com antivenenos (ISBISTER et al., 2003).

Em busca da diminuição dos efeitos colaterais, alguns trabalhos trouxeram alternativas aos antivenenos comerciais para o tratamento do envenenamento por *T. serrulatus* como, por exemplo, o anticorpo monoclonal Serrumab (PUCCA et al., 2012), o qual apresenta eficiência para neutralizar as beta-toxinas como TsTx 1 e TsTx (PUCCA et al., 2014), porém tem baixa capacidade para inibir as alfa-toxinas. Deste modo, os autores discutem que, por conta das beta-toxinas serem majoritárias no veneno, a neutralização do veneno bruto *in vivo* seja eficaz. Recentemente, Ferreira e colaboradores (2016) apresentaram a produção de antiveneno para *T. serrulatus* a partir do soro de ovelhas, sendo que o veneno destoxificado por glutaraldeído foi capaz de produzir anticorpos que reconhecem o veneno bruto (FERREIRA et al., 2016). Assim, pode-se dizer que existe interesse científico e tecnológico para um aprimoramento do tratamento por imunoterapia, a fim de produzir antídotos mais eficazes, possibilitando a redução das quantidades de ampolas de antivenenos aplicadas nos pacientes.

1.4 Componentes do veneno

Diversas moléculas com grande diversidade de ações biológicas são componentes dos venenos animais, dentre as quais se destacam proteínas (que apresentam, ou não, atividade enzimática), peptídeos, sais e componentes inorgânicos por sua abundância e frequência. Devido ao quadro clínico apresentado pelas vítimas de escorpionismo, sabe-se que o alvo principal de suas toxinas é o sistema nervoso (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989).

As neurotoxinas são peptídeos que atuam bloqueando ou excitando canais iônicos, promovendo sintomas como salivação, tremor, convulsões, entre outros (GUIDINE et al., 2014). Segundo estudo realizado por Nunan e colaboradores (2004), foi demonstrado que a tityustoxina (TsTx), uma das neurotoxinas mais letais do veneno de *T. serrulatus*, é difundida mais rapidamente em ratos jovens do que em adultos, sendo encontrada somente no cérebro de indivíduos juvenis (NUNAN et al., 2004). De fato, a barreira hematoencefálica de ratos jovens é mais permeável em comparação a de adultos, tornando o sistema nervoso central mais acessível aos componentes do veneno (GUIDINE et al., 2014). Com isso, é possível hipotetizar que a maior taxa de mortalidade em crianças - cerca de 30% dos casos de óbito por escorpionismo em 2013

(SINAN, 2017) – é, também, devida à maior permeabilidade desta estrutura membranar nos anos de vida iniciais.

A maioria dos efeitos desencadeados pelas neurotoxinas está associada à estimulação de neurotransmissores, em especial, as catecolaminas (TEIXEIRA et al., 2001). As catecolaminas - epinefrina (ou adrenalina), norepinefrina (ou noradrenalina) e a dopamina - são neurotransmissores liberados pela glândula adrenal, cérebro e sistema nervoso simpático, sendo que o aumento de concentração destas moléculas está associado ao quadro apresentado pelos hipertensos por promoverem vasoconstrição (DEQUATTRO; CHAN, 1972). Os envenenados por escorpiões da família Buthidae geralmente apresentam hipertensão relacionada à liberação de catecolaminas (MURTHY, 2014), sendo esta a manifestação sistêmica mais comum em pacientes de escorpionismo em estágio II e acima dos 14 anos no Brasil (BUCARETCHI et al., 2014).

Apesar da importância do conhecimento da composição da peçonha e seus mecanismos de ação, a maioria das informações sobre os componentes do veneno de *T. serrulatus* referem-se às moléculas atuantes em canais iônicos, principalmente as neurotoxinas de canais de sódio e potássio, sendo pouco conhecida a ação de outras moléculas (COLOGNA et al., 2009). Por outro lado, as peptidases são frequentemente encontradas em peçonhas animais e responsáveis diretas por diversos efeitos locais e sistêmicos, sendo os componentes majoritários de venenos de serpentes (FOX; SERRANO, 2008). Recentemente, estudos transcriptômicos têm demonstrado que as peptidases são os transcritos mais abundantes em alguns venenos de escorpião, como em *T. bahiensis*, representando cerca de 40% do veneno total (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Alguns trabalhos atuais indicam que a presença de peptidases pode estar associada a um maior grau de toxicidade de venenos de escorpiões. Recentemente, em um estudo sobre componentes enzimáticos, Díaz-García e colaboradores (2015) demonstraram que o veneno do escorpião cubano *Rhopalurus junceus* não apresenta atividades peptidásica ou fosfolipásica, mas somente atividade hialuronidásica. Tendo em vista que componentes de baixa massa molecular, como peptídeos e neurotoxinas são abundantes no veneno deste escorpião cubano, os autores sugerem que a baixa toxicidade para humanos do mesmo se deva pela sua baixa atividade peptidásica e/ou fosfolipásica (DÍAZ-GARCÍA et al., 2015). É interessante apontar que o veneno total

do escorpião cubano *R. junceus* é utilizado no tratamento da dor, doenças inflamatórias e câncer, não apresentando toxicidade elevada para seres humanos.

A presença de peptidases em venenos de escorpiões tem sido evidenciada nos últimos anos, e pesquisas têm estipulado possíveis relações com o envenenamento. A antarease foi a primeira metalopeptidase purificada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, sendo relacionada com a pancreatite por conta de sua capacidade de hidrolisar proteínas que participam da exocitose de vesículas (FLETCHER et al., 2010). Ortiz e colaboradores (2013) mostraram a existência de antareases em outras espécies de escorpiões da América Central (*T. fasciolatus*, *T. pachyurus*), América do Norte (*Centruroides noxius*) e Ásia (*Mesobuthus eupeus*), indicando uma conservação destas moléculas na família Buthidae, independentemente da região geográfica (ORTIZ et al., 2014). Tal fato pode indicar um papel importante dessas peptidases no veneno, seja para a produção de peptídeos endógenos (VERANO-BRAGA et al., 2013) que poderão agir como toxinas, ou para agir diretamente no envenenamento de suas presas.

Em análise transcriptômica do veneno de *Tityus serrulatus*, dez clones diferentes de peptidases denominadas “metallo-serrulases” foram encontrados, sendo que nove deles apresentaram grande similaridade com as ADAMs (denominadas de TsMS 1 a 9). Dessas dez sequências, três delas são similares à antarease, e um clone foi classificado como representante da família das gluzincinas (metallo-serrulase 10), a qual possui como membros a enzima conversora de angiotensina I, a enzima conversora de endotelina I e a neprilisina (CARMO et al., 2014). Carmo e colaboradores (2014) ainda observaram que o veneno total de *Tityus serrulatus* tem a capacidade de clivar as cadeias α e β do fibrinogênio e que provavelmente ao menos parte desta atividade é causada pelas metallo-serrulases.

De modo geral, a atividade fibrinogenolítica tem sido amplamente investigada em venenos de escorpiões de outras espécies do gênero *Tityus*. Brazón e colaboradores (2014) demonstraram a presença de metalo e serinopeptidases (dependentes de Ca^{+2} e tripsina-like) no veneno do escorpião colombiano *Tityus discrepans* que são capazes de hidrolisar o fibrinogênio. Além disso, outro fato interessante a ser destacado foi que as concentrações de íons como zinco e magnésio neste veneno se mostraram significativas e superiores a outros metais, como o cálcio (BRAZÓN et al., 2014), podendo ter influência na ativação de metalopeptidases. Em relação a escorpiões de outras famílias, foi detectada atividade fibrogenolítica por serinopeptidases no veneno do escorpião amazônico *Brotheas amazonicus*, sendo que o soro antiescorpiônico mostrou bloqueio

efetivo em dose de 1:1 (HIGA et al., 2014). Para o veneno do escorpião negro da Turquia, *Androctonus crassicauda*, ao menos dez enzimas com atividade gelatinolítica foram encontradas, sendo inibidas simultaneamente por EDTA, aprotinina e por PMSF, provavelmente pela presença de uma serinopeptidase dependente de cálcio (CALISKAN et al., 2009). Apesar da comprovação destes fenômenos, nenhum dos trabalhos relata a purificação ou a sequência primária das peptidases responsáveis por estas atividades.

É interessante apontar que enzimas de outras classes também têm sido observadas em venenos de escorpiões. Recentemente, hialuronidases do veneno de *T. serrulatus* foram purificadas e sequenciadas, sendo um fator que contribui para a letalidade, juntamente com outras toxinas do veneno (HORTA et al., 2014). Para o escorpião colombiano *Opisthacanthus elatus*, fosfolipases (PLA₂) foram identificadas no veneno, bem como serinopeptidases, sendo que os autores sugerem que a atividade destas enzimas é superior à ação das neurotoxinas (ESTRADA-GÓMEZ et al., 2016). Por outro lado, para *Tityus kardekai*, o *screening* de atividade não foi capaz de detectar atividade fosfolipásica, somente gelatinolítica e hialuronidásica, corroborando com os resultados obtidos com os venenos de escorpiões brasileiros (HORTA et al., 2014; VENANCIO et al., 2013), sendo esta, provavelmente, uma característica da família Buthidae.

Nosso grupo de pesquisa constatou que os venenos dos escorpiões *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus* também apresentam a atividade liberadora de Leu-encefalina por meio da degradação da dinorfina 1-13 por metalopeptidases, assim como observado no veneno de *T. serrulatus* (VENANCIO et al., 2013). Observamos, também, que os soros comerciais produzidos pelo Instituto Butantan (soros antiescorpiônico e antiaracnídico) são capazes de bloquear apenas parcialmente esta atividade, mesmo quando utilizados em altas doses. Os experimentos realizados não puderam detectar atividade de serinopeptidases e fosfolipases com os substratos utilizados, sendo que a atividade enzimática destes escorpiões brasileiros baseia-se, principalmente, por ação de hialuronidases e metalopeptidases (VENANCIO et al., 2013).

A ação de endopeptidases e exopeptidases foi detectada sobre peptídeos endógenos do veneno de *Tityus serrulatus*, sendo importantes agentes pós traducionais (VERANO-BRAGA et al., 2013). Contudo, a ação isolada, tanto *in vitro* quanto *in vivo* das peptidases do veneno de *T. serrulatus* ainda não é muito estudada. Ou seja, não é possível dizer se a atividade peptidásica tem importância significativa no quadro clínico

do envenenamento e se a mesma é eficientemente neutralizada pelos antivenenos comerciais. Para tal, é de extrema importância a purificação e a caracterização *in vitro* destas enzimas para melhor compreensão dos possíveis mecanismos de envenenamento e, caso observada falhas, é necessário indicar possíveis soluções para melhoria do bloqueio destas peptidases pelos soros comerciais.

Neste contexto, este trabalho buscou isolar peptidases do veneno de *Tityus serrulatus* (VTs), com objetivo de obter informações iniciais sobre a participação dessas moléculas no envenenamento e avaliar o potencial neutralizante dos antivenenos comerciais produzidos pelo Instituto Butantan. Estas caracterizações são inéditas na literatura e podem contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos de ação do veneno, além de fornecer informações importantes para a Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan.

Uma vez que as peptidases do VTs foram caracterizadas como importantes agentes pós traducionais, agindo sobre polipeptídeos endógenos ao veneno e formando novos peptídeos (VERANO-BRAGA et al., 2013), focamos nossos estudos na busca de peptídeos ativos como possíveis novos substratos para o veneno e para as peptidases purificadas. Além disso, os peptídeos biologicamente ativos são moléculas fundamentais em diversos processos fisiológicos. A ação de peptídeos bioativos na sinalização celular é bem descrita, sendo essenciais para a ocorrência de processos neurais, endócrinos e imunológicos (SEWALD; JAKUBKE, 2003). Os neuropeptídios são um grupo particular de peptídeos bioativos encontrados amplamente na natureza com grande importância biológica. Apesar de inicialmente serem associados somente com o sistema nervoso central, atualmente sabe-se que neuropeptídios são também sintetizados em outras regiões do corpo, como no sistema digestivo (SEWALD et al., 2003). Por exemplo, o polipeptídeo pancreático foi primeiramente descrito em 1979, sendo extraído de pâncreas de galinhas e bovinos; em seguida, em 1982, com base no mesmo método de extração do polipeptídeo pancreático foram isolados o peptídeo YY, obtido de intestino de porcos e, posteriormente, o neuropeptídeo Y, purificado de extrato de cérebros de porcos (CONLON, 2002). Hoje, sabe-se que estas três moléculas são reunidas no mesmo grupo de peptídeos bioativos como membros da família do neuropeptídeo Y, por possuírem estruturas primárias e terciárias similares e mesma origem gênica (CONLON, 2002).

Sendo assim, o estudo de peptidases que têm como substrato peptídeos biologicamente ativos pode ser interessante para a compreensão de mecanismos de ação

refinados do envenenamento escorpônico, sendo esta a maior motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

2 OBJETIVO GERAL

Com o pressuposto de existirem poucas informações sobre as peptidases presentes no veneno do *T. serrulatus* (VTs), pretende-se purificar e caracterizar *in vitro* metalopeptidases (endo- e exopeptidases) do veneno do escorpião amarelo.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Objetivos específicos com o Veneno Bruto

- Testar novos substratos bioativos.
- Analisar o efeito de inibidores específicos.
- Verificar a neutralização destas atividades pelos antivenenos comerciais do Instituto Butantan.

2.1.2 Objetivos Específico com as Proteases Isoladas

- Purificar proteases por *screening* de atividade.
- Identificar as proteases por espectrometria de massas.
- Caracterizar as preferências bioquímicas *in vitro* (pH ideal , temperatura, Km, kcat, influência de cátions).
- Testar a neutralização das peptidases purificadas com os antivenenos comerciais.
-

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os substratos de fluorescência com supressão intramolecular de fluorescência, FRETs (Fluorescence Resonance Energy Transfer), os substratos análogos a dinorfina 1-13 (Abz-GFLRRV-EDDnp, Abz-FLRRV-EDDnp, Abz-GFLRR-EDDnp), e o substrato de carboxipeptidases (Abz-FRK(Dnp)P-OH) foram fornecidos pelos Prof. Dr. Luiz Juliano Neto e Prof. Dr. Adriana K. Carmona, do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM Com exceção do Abz-FRK(Dnp)P-OH, os substratos foram sendo gerados pelo método de síntese em fase sólida, utilizando o sintetizador automático da marca Shimadzu, modelo PSSM-8 (HIRATA et al., 1994). Por sua vez, o Abz-FRK(Dnp)P-OH foi sintetizado segundo o método de síntese em fase sólida descrito (ARAUJO et al., 2000), que apresenta pequenas modificações para a inserção do (Dnp)-OH.

Os reagentes EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fenilmetanosulfonilfluorido), fosforamidon, tiorfan, e 1,10-fenantrolina, bem como os peptídeos biologicamente ativos substância P, hemopressina, peptídeo Y, cadeia B da insulina, polipeptídeo pancreático, somatostatina, dinorfina 1-13, angiotensina I e bradicinina foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

Os reagentes para a cromatografia de fase reversa em HPLC, acetonitrila e TFA (ácido trifluoroacético) são provenientes das empresas Carlo Erba e J.T. Baker, respectivamente.

3.2 Veneno e antivenenos

Os venenos de escorpiões da espécie *T. serrulatus* (Lotes 1634, 744, 2146) foram fornecidos em sua forma liofilizada pela Sessão de Venenos do Instituto Butantan.

Os antivenenos comerciais antiaracnídico (0706121) e antiescorpiônico (0905104/A) foram fornecidos pela Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan, sendo mantidos a 4°C até suas utilizações.

3.3 Teste de clivagem de peptídeos biologicamente ativos pelo veneno de *Tityus serrulatus*

Os peptídeos biologicamente ativos dinorfina 1-13 (30 μM); neuropeptídeo Y (23,4 μM); peptídeo YY (23,2 μM); polipeptídeo pancreático (22,7 μM); substância P (74,2 μM); hemopressina (10 μM); cadeia B da insulina (71,5 μM); somatostatina (61 μM); angiotensina I (30 μM) e bradiginina (20 μM), foram incubados individualmente com o veneno (1 μg), durante 1 hora a 37 °C em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 (tampão 1) ou em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl_2 10 μM , pH 7,0 (tampão 2). As análises foram realizadas em coluna Restek C-18 (4,6 x 250 mm), utilizando gradiente de 10-60% de B em 20 minutos em sistema de HPLC Shimadzu. Os peptídeos que foram hidrolisados pelo veneno tiveram seus picos de hidrólise coletados manualmente e analisados em espectrometria de massas para a identificação dos fragmentos originados pela hidrólise, e as atividades específicas foram determinadas (μM de substrato hidrolisado/ μg de veneno/min), com base nas áreas dos picos em relação ao controle (apenas peptídeo e tampão). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.4 Análise dos pontos de clivagem dos novos substratos

Os picos correspondentes aos fragmentos gerados pela hidrólise de peptídeos bioativos por VTs em HPLC foram ressuspensos em ácido fórmico a 0,1% e analisados por cromatografia líquida em linha em sistema de HPLC Easy-nLC Proxeon nano acoplado a um espectrômetro Velos LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), por meio de uma fonte de íons de nanoelectrospray. A separação foi realizada em uma coluna de 10 cm, empacotada no laboratório com *beads* de 5 μM Jupiter® C-18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 5-30% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1%, em 45 min a 300 nL/min. O espectrômetro foi operado no modo dependente de dados e os 10 picos mais intensos foram selecionados para fragmentação a partir da dissociação induzida por colisão (CID) após adquirir cada verificação completa. As configurações para o espectrômetro foram definidas como: maior resolução de parâmetros completos MS (1 μ scan; MS faixa de massa m/z de 200-2000 com $R = 30\,000$ e um valor-alvo de 1×10^4 íons; max tempo de injeção = 10 ms). Para examinar fragmentos, as configurações foram: uma janela de isolamento de 2 Da, um tamanho máximo de 500 lista, uma janela

de tempo de 30 s, um sinal mínimo de 5000, tempo de ativação = 10 ms e energia de colisão normalizada = 35%.

Para análise dos dados, os arquivos de dados brutos foram submetidos a buscas usando o software PEAKS studio (versão 7,5, Bioinformatics Solution, Waterloo, Canadá); contra o banco de dados SwissProt restrito para a sequência de cada peptídeo em particular (angiotensina I, bradicinina, hemopressina, peptídeo YY, neuropeptídeo Y e polipeptídeo pancreático). Um banco de dados *decoy* foi também utilizado para calcular a taxa de falso-positivo (FDR, *false discovery rates*), usando o método de *decoy* (MA et al., 2003; ZHANG et al., 2012). Os parâmetros da pesquisa foram: nenhuma especificidade da enzima; tolerância massa precursor definido de ± 10 ppm e uma tolerância de massa de fragmento de íons de $\pm 0,5$ Da; metionina oxidada (M +15,994915 Da) foi definida como modificação variável. Os peptídeos identificados foram então classificados segundo a sua Média de Confiança Local (ALC) e foram filtrados por taxa de descobertas falso-positivas (FDR) $\leq 1\%$.

3.5 Testes de atividade enzimática, utilizando substratos fluorescentes

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), ajustado para leitura de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente. Foram mantidos os mesmos parâmetros do aparelho em todo o trabalho. A temperatura manteve-se constante a 37 °C e foi realizada uma leitura/minuto durante 15 minutos, sendo as placas agitadas automaticamente antes do registro de cada leitura. Os substratos utilizados foram Abz-GFLRRV-EDDnp (5 μ M) em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0, e Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 μ M), em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, 10 M, ZnCl₂ pH 7,0, sendo o volume final 100 μ L. A quantidade de veneno de *Tityus serrulatus* utilizada para os ensaios foi de 1 μ g. Os ensaios foram analisados em software Grafit 5.0 e foram determinadas as atividades específicas das amostras (UF/ μ g de veneno/min, sendo UF = unidades de fluorescência). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.6 Neutralização da atividade peptidásica do veneno de *Tityus serrulatus* por antivenenos comerciais e inibidores

3.6.1 Uso do Abz-GFLRRV-EDDnp e Abz-FRK(Dnp)P-OH em fluorímetro

Para a padronização do uso dos antivenenos, optamos por testes fluorimétricos, utilizando o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp (5 μ M) e o veneno de *Tityus serrulatus* (1 μ g) em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Para o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH, 4 μ M, o tampão utilizado foi Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M pH 7,0, sendo usada a mesma concentração de veneno. Para ambos, o veneno foi pré-incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos com os soros antiescorpiônico (SAE) e antiaracnídico (SAAr) nas concentrações 1:1; 1:2; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:500 e 1:1000 (proporção veneno: antiveneno, em μ g), sendo o substrato adicionado em seguida.

Para a determinação da classe enzimática das peptidases presentes no VTs que atuam nos substratos fluorescentes, foram utilizados os inibidores EDTA, quelante de metais e inibidor de metalopeptidases, e PMSF, inibidor de serinopeptidases. Para esse experimento foram testados 1 μ g de veneno total e 5 μ M de Abz-GFLRRV-EDDnp ou 4 μ M de Abz-FRK(Dnp)P-OH. Para os inibidores EDTA e PMSF, as concentrações foram 50 mM e 2 mM, respectivamente. Inibidores específicos também foram empregados: captopril (100 nM), *Bj*-Pro-10c (16 μ M), tiorfan (10 μ M), fosforamidon (10 μ M), e [des-Arg¹]-Proctolin (10 μ M). Os ensaios foram realizados em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer, MA, USA) e analisados em software Grafit 5.0. Os tampões utilizados para cada substrato e as condições do fluorímetro estão descritas no item 3.5. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Para o estudo do efeito da concentração de íons cloreto sobre a atividade carboxipeptidásica do VTs (1 μ g), a hidrólise do o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 μ g) foi determinada em tampão Tris 100 mM, ZnCl₂ 10 μ M, com quatro concentrações de NaCl: zero, 10 mM, 20 mM e 50 mM. Para comparação, os mesmos experimentos foram realizados com a enzima conversora de angiotensina I (Sigma, 50 ng). Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.6.2 Análise da clivagem de peptídeos biologicamente ativos em cromatografia de fase reversa

Após a seleção de novos substratos biologicamente ativos para endopeptidases (neuropeptídeo Y, peptídeo YY, hemopressina e polipeptídeo pancreático), os mesmos foram submetidos a testes de inibição por soroneutralização com os dois antivenenos comerciais (SAE e SAAr), utilizando dinorfina 1-13 como controle positivo, uma vez

que o mesmo já havia sido estudado anteriormente (VENANCIO et al., 2013). O veneno (1 µg) foi primeiramente pré-incubado com os antivenenos por 30 minutos (proporção veneno: antiveneno, em µg, de 1:50 e 1:100) e, em seguida, cada peptídeo individualmente foi adicionado à solução nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente, onde a reação decorreu durante 1 hora a 37 °C. Nesse caso, o tampão utilizado foi Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Além disso, foi realizado teste de inibição, utilizando 50 mM de EDTA com cada peptídeo individualmente na presença do veneno total.

Para o estudo específico da atividade dipeptidil-carboxipeptidásica, o veneno de *Tityus serrulatus* (0,5 µg) foi também incubado com os peptídeos hemopressina (30 µM) por 2 horas; angiotensina I (30 µM), com 4 horas de incubação; bradiginina (20 µM), incubada por 6 horas, em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0, à 37 °C. Conjuntamente, foi realizado o teste de inibição pelo captopril, que foi utilizado em duas concentrações: 100 nM e 1 µM. O inibidor EDTA (50 mM) também foi usado. Neste caso, a dinorfina 1-13 (30 µM) foi utilizada como controle negativo. Sendo assim, para este experimento, as incubações foram feitas da seguinte forma: 1) controle do peptídeo (apenas peptídeo e tampão); 2) VTs com o peptídeo; 3) VTs com peptídeo e EDTA 50 mM; 4) VTs com peptídeo e captopril 100 nM; 5) VTs com peptídeo e captopril 1 µM. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A inibição da atividade peptidásica do veneno foi calculada pela comparação das áreas dos picos referentes aos peptídeos.

As hidrólises foram analisadas por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna Restek Ultra C-18 (4,6 x 250 mm), com detecção a 214 nm e fluxo de 1 mL/min. O sistema de HPLC e os tampões utilizados foram descritos acima (item 3.3).

3.7 Purificação das metalopeptidases presentes no veneno de *Tityus serrulatus*

3.7.1 Esquema geral de purificação das peptidases serACE-like, metalloserrulase 3 e metalloserrulase 4

Para a melhor compreensão das etapas de purificação e identificação das metalopeptidases realizadas no presente trabalho, foi elaborado um esquema de purificação geral, o qual se encontra na Figura 03.

Figura 03 - Esquema representando as etapas de purificação e os *screenings* de atividade utilizados no presente trabalho para a obtenção de três metalopeptidases – enzima conversora de angiotensina I-like, metalloserrulase 3 e metalloserrulase 4 – a partir do veneno de *Tityus serrulatus*.

3.7.2 Cromatografia de troca aniônica

O veneno total de *Tityus serrulatus* (50 mg) foi diluído em 5 mL de tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 (10 mg/mL). O veneno foi submetido à cromatografia de troca iônica em sistema HPLC (Shimadzu Co, Japão), utilizando a coluna Shim-Pack

PA-DEAE (20 mm x 100 mm), Shimatzu Co, Japão, sob fluxo 5 mL/min em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (tampão A com adição de 500 mM NaCl, pH 8,2). Os tampões foram previamente filtrados em filtro de 20 µm antes do uso. O gradiente utilizado foi de 0-80% de tampão B em 80 minutos.

3.7.3 Caracterização das subfrações

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método Bradford (1976), utilizando o kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio Rad). Os procedimentos descritos a seguir (3.7.3.1 – 3.7.3.3) foram repetidos após cada etapa de purificação subsequente.

3.7.3.1 *Screening* de atividade peptidásica das subfrações do veneno de *T. serrulatus*

Para o *screening* da atividade dipeptilcarboxipeptidásica, as frações (5 µg) foram incubadas com o substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH, 4 µM, o tampão utilizado foi Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0. Conjuntamente, foi verificada a clivagem de hemopressina (30 µM), ou angiotensina I (30 µM), incubadas com as frações por 2 horas e 4 horas a 37 °C, respectivamente, no mesmo tampão de trabalho.

Para o *screening* das endopeptidases, o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp (5 µM) foi incubado individualmente com cada fração coletada. Em paralelo, a clivagem de dinorfina 1-13 (30 µM) foi verificada, sendo que cada fração coletada foi incubada com este peptídeo em banho-maria a 37 °C por 2 horas. Estes experimentos utilizaram o tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0.

Os resultados utilizando substratos fluorescentes foram analisados em fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), ajustado para leitura de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente e analisados em software Grafit 5.0. A temperatura manteve-se constante a 37 °C e foram realizadas uma leitura/minuto durante 15 minutos, sendo as placas agitadas antes do registro de cada leitura pelo aparelho.

Para os substratos biologicamente ativos, as análises foram realizadas por cromatografia de fase reversa em coluna Restek C-18, utilizando gradiente de 10-60% de B (sendo tampão A H₂O/TFA 0,01% e tampão B ACN/solvente A 9:1), em 20 minutos em sistema de HPLC Shimadzu, com detecção a 214 nm.

3.7.3.2 Utilização de membrana de corte molecular

Após selecionar as frações com melhor atividade peptidásica, foi realizada uma etapa de remoção de sal, com troca de tampão, e concentração das amostras utilizando membrana de corte molecular de 3 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices). Para tal, foi utilizada a centrífuga Eppendorf Centrifuge 5804R com rotação 4000 g por 40 minutos. As amostras foram concentradas em cinco vezes em *speed vac*, mantendo a temperatura a 4°C. A membrana de corte molecular de 30 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) foi também utilizada para a etapa final de refinamento da purificação das metaloserrulases.

3.7.3.3 Análise em gel de SDS-PAGE 13%

A eletroforese em gel de SDS-PAGE 13% foi realizada como descrito por Laemmli, 1970 utilizando o sistema de eletroforese Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). As amostras foram diluídas na proporção 1:2 em tampão de amostra em condições não redutoras, sendo aplicadas em volume máximo de 20 µL. Foi utilizado como padrão de massas moleculares Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). As eletroforeses foram desenvolvidas a temperatura ambiente com duração de aproximadamente 2 horas a 90 V. Após a corrida, o gel foi retirado do suporte e submetido à coloração com nitrato de prata (MORRISSEY, 1981) ou por Coomassie Blue Coloidal (CANDIANO et al., 2004). O gel foi fotografado e estocado em solução de ácido acético 1%.

3.7.4 Cromatografia de exclusão molecular (gel-filtração)

A cromatografia de exclusão molecular decorreu em sistema HPLC (Shimadzu), utilizando a coluna Diol-300 (7,9 mm x 50 cm), do fabricante Shim-pack. O tampão de eluição usado foi 200 mM de sulfato de sódio, 10 mM de fosfato, pH 7,0, sendo previamente filtrado em filtro de 20 µm antes de seu uso. As amostras foram cromatografadas son fluxo de 0,5 mL/min durante 80 minutos em gradiente isocrático. O *screening* das frações de interesse foi realizado como descrito no item 3.7.3.1, submetidas à troca de tampão (item 3.7.3.2) e analisadas por SDS-PAGE (item 3.7.3.3).

Adicionalmente, as metaloserrulases foram fracionadas em membrana de corte molecular de 30 kDa, visando um refinamento de sua purificação.

3.7.5 Cromatografia de troca catiônica

A fim de proceder a purificação da carboxipeptidase, as amostras provenientes da fração F1 pós gel-filtração foram submetidas a cromatografia de troca catiônica. A coluna utilizada foi PA-CM (Shim-pack), 20 mm x 100 mm, sendo o tampão A composto de 20 mM Tris, 20 mM NaCl pH 7,0 e tampão B, composto pelo tampão A contendo adicionalmente 0,5 mM de NaCl. Os tampões foram filtrados em filtro de 20 µm antes da utilização. A eluição teve duração de 80 minutos, com gradiente de 0-30% de tampão B em 40 minutos, 30-80% B em 10 minutos e 80-100% B em 5 minutos, sob fluxo de 5 mL/min. O *screening* das frações de interesse foi realizado como descrito no item 3.7.3.1, submetidas à troca de tampão (item 3.7.3.2) e analisadas por SDS-PAGE (item 3.7.3.3).

3.7.6. Determinação das sequências primárias das peptidases purificadas por digestão *in gel* e espectrometria de massas

Após a determinação de homogeneidade por SDS-PAGE das peptidases purificadas, as bandas únicas foram extraídas do gel para suas identificações por espectrometria de massas seguindo o protocolo de digestão de proteínas *in gel* (HANNA et al., 2000). Para tal, primeiramente, as bandas foram excisadas diretamente do gel com auxílio de uma lâmina, cortadas em pequenos pedaços (aproximadamente 2 mm) e incubadas em 500 µL de solução descorante (50% de metanol, 5% de ácido acético diluídos em H₂O Milli-Q) durante duas horas. Em seguida, as bandas excisadas e picotadas foram incubadas com 200 µL de acetonitrila (100%) durante 10 minutos, sendo esse passo repetido duas vezes. A solução de acetonitrila foi então removida e os tubos foram secos em *speed vac* para a eliminação total de resíduos de acetonitrila. Posteriormente, as amostras foram incubadas com 30 µL solução redutora, contendo 10 mM de DTT em 100 mM de bicarbonato de amônio, durante 30 minutos. Após a remoção desta solução, promovemos a alquilação da amostra utilizando uma solução contendo 50 mM de iodocetamida em bicarbonato de amônio 100 mM, sendo mantida durante 30 minutos na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram lavadas com 100 mM de bicarbonato de amônio durante 10 minutos e, após a remoção desta solução, foi realizada nova desidratação pela adição de acetonitrila a 100%, a qual foi mantida durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido e os excessos de acetonitrila foram evaporados em *speed vac*. As amostras foram incubadas com solução de tripsina (150

ng final em solução de 50 mM de bicarbonato de amônio), adicionados 100 µL de 50 mM de bicarbonato de amônio, sendo incubadas em banho-maria a 37 °C *overnight*.

Foi dada continuidade no procedimento pela adição de 30 µL de solução de extração 1 (ácido fórmico a 5%) durante 10 minutos. Após esse período, por conta de já conterem fragmentos peptídicos, as soluções foram transferidas para novos tubos, previamente identificados. Sob os pedaços de gel, foi adicionada 30 µL de solução de extração 2 (ácido fórmico a 5%, acetonitrila a 50%), sendo mantida durante 10 minutos. A solução final foi transferida para os mesmos tubos novos que continham os peptídeos extraídos da solução 1. Esta etapa foi reproduzida duas vezes e, após isso, a solução com os peptídeos extraídos foi seca em *speed vac*. Essas amostras foram ressuspensas em 0,1% de TFA, dessanilizadas, secas e novamente ressuspensas em ácido fórmico a 0,1% para serem analisadas em espectrômetro de massas no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), sob responsabilidade do Dr. Leo K. Iwai. O equipamento e o método utilizados nas análises por espectrometria de massas foram os mesmos já descritos acima no item 3.4, durante a determinação dos pontos de clivagens de peptídeos bioativos que foram substratos para o VTs.

3.7.6.1 Análise de dados

Os resultados foram averiguados no software PEAKS Studio 7.5. Os parâmetros da pesquisa foram: digestão por tripsina; tolerância massa precursor definido de ± 10 ppm e uma tolerância de massa de fragmento de íons de $\pm 0,5$ Da. Foram selecionadas como modificações pós traducionais (PTM) a carbaminometilação de cisteínas, como modificação fixa, e como variável, a oxidação dos resíduos de metionina e a deamidação de asparagina e glutamina, por conta do tratamento utilizado na extração da banda do gel. O índice de falsas descobertas (False Discovery Rate, FDR) foi ajustado para $<0.01\%$. O banco de dados foi montado a partir de sequências obtidas no UNIPROT/ SwissProt (554567 sequências). Adicionalmente, para análise da ACE, foi montado um banco de dados com sequências depositadas no UNIPROT, com restrição para o gênero *Tityus*, em conjunto com as sequências de ACEs obtidas por análise transcriptômica pelos colaboradores Dra. Ursula Castro de Oliveira e Dr. Inácio Junqueira de Azevedo, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, totalizando 383 sequências.

3.8 Análises de bioinformática das peptidases purificadas

O alinhamento das sequências primárias das enzimas conversoras de angiotensina das espécies *Homo sapiens* (AAA60611.1); *Tityus serrulatus* (Tser01365); *Tityus bahiensis* (Tbah00054); *Tityus obscurus* (Tobs01411) foi realizado no software Mega 7 utilizando a ferramenta MUSCLE (MUltiple Sequences Comparison by Log-Expectation) (KUMAR et al., 2016).

Para as metalloserrulases, as sequências foram analisadas na ferramenta Blast (NCBI)>> Global alignment>> Needleman-Wunsch Global Align Protein Sequences. Além do alinhamento, o grau de identidade e a similaridade entre as sequências foram obtidos.

Para a visualização da modelagem teórica das metalloserrulases, as sequências foram submetidas no software online Phyre² (KELLEY; STERNBERG, 2009) na opção “*Intense mode*”, o qual realiza o modelo com base na homologia entre as sequências primárias. Os modelos selecionados tiveram confiança acima de 97% e acurácia >90%. Os arquivos, em formato PDB, foram submetidos ao software Discovery Studio 4.1, onde os sítios catalíticos e o provável *met-turn* foram destacados.

3.9 Análise do ponto de clivagem do substrato fluorescente Abz-GFLRRV-EDDnp

Para a determinação do ponto de clivagem do substrato Abz-GFLRRV-EDDnp, a metalloserrulase 3 e a metalloserrulase 4, 150 ng, foram incubadas em tampão bórax 50 mM pH 8,5 durante 15 minutos (volume final 100 µL). A cinética foi acompanhada no fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer, MA, USA) e as clivagem foram posteriormente observadas em cromatografia de fase reversa em HPLC (Shimadzu) em coluna Restek C-18, sendo o método variando a concentração de tampão B (10% de tampão A diluído em acetonitrila, onde o tampão A é 0,01% TFA em H₂O deionizada) em 30-80% em 25 minutos. Os picos foram coletados manualmente e, em seguida, os pontos de clivagem das amostras foram determinados em espectrômetro de massas MALDI-TOF no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, sob a supervisão do Dr. Daniel C. Pimenta.

3.10 Análise do ponto de clivagem dos substratos naturais

As metalloserrulases 3 e 4 (150 ng) foram incubadas com os substratos naturais dinorfina 1-13, neuropeptídeo Y, peptídeo YY e polipeptídeo pancreático durante 6 horas à 37 °C, em tampão ácido bórico 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8. Em adendo, a serACE-like (150 ng) foi incubada com angiotensina I *overnight* em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, 10 µM ZnCl₂, pH 7,0. As clivagens foram constatadas por cromatografia de fase reversa C-18 e os produtos de hidrólise foram então analisados por espectrometria de massas (Orbitrap) no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada. A análise das sequências foi feita no software Peaks 8.0, sendo empregados os seguintes parâmetros para o sequenciamento *de novo*: Tolerância de erro de massa parental de 0,5 Da; tolerância de erro de massa do fragmento: 0,2 Da nenhuma enzima; oxidação da metionina e acetilação do N-terminal foram selecionadas como modificações variáveis. Foram selecionados os peptídeos obtidos pelo sequenciamento *de novo* com ALC $\geq$ 80% que correspondiam à sequência dos substratos. A fim de se estudar a especificidade primária das peptidases, os resíduos de aminoácidos nas posições P3-P3' foram determinados a partir dos pontos de clivagens obtidos (SCHECHTER; BERGER, 1967), e analisadas na ferramenta IceLogo (COLAERT et al., 2009), permitindo a visualização da frequência dos resíduos de aminoácidos e seu grau de conservação em diferentes posições.

3.11 Determinação de condições ótimas e parâmetros cinéticos das enzimas purificadas

Para a determinação do pH ótimo de atividade catalítica das enzimas purificadas (metalloserrulase 3, metalloserrulase 4 e serACE-like) os seguintes tampões foram preparados, seguindo o recomendado por Stoll e Blanchard (1990): fosfato de sódio (pH 5,0 – 7,5), bórax/ácido bórico (pH 7,6 – 9,2) e borato de sódio (pH 9,2-10), todos na concentração final de 50 mM (STOLL; BLANCHARD, 1990). O substrato para as metalloserrulases foi o Abz-FLRRV-EDDnp e para a serACE-like, Abz-FRK(Dnp)P-OH.

A influência da temperatura na velocidade de hidrólise dos substratos FRETs das metalloserrulases e da serACE-like também foi analisada. Para tal, a atividade das peptidases foi analisada em temperaturas entre 22 °C e 42 °C, em intervalos de 5 °C, utilizando o melhor tampão indicado com base nos resultados dos experimentos anteriores (pH e influência de sais). Para a certificação da temperatura correta no poço,

cada enzima foi previamente climatizada com incubação de 15 minutos em tampão na temperatura desejada e, após esse período, o substrato foi adicionado, iniciando a reação. Todos os resultados foram obtidos em fluorímetro Victor 3™ (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA), com 1 leitura por minuto durante 15 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os desvios padrões foram calculados. Os gráficos foram plotados no software GraphPad Prism.

Em adição, a influência de íons monovalentes e bivalentes sobre a atividade das metalloserrulases foi avaliada na presença de diversos cátions (Na^+ , K^+ , Li^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2}), todos na concentração final 50 mM, de acordo com a série de Hofmeister na forma de cloreto. A velocidade de hidrólise na presença e ausência do íon foi avaliada, identificando possíveis alterações na atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os desvios padrões foram calculados.

3.12 Determinação das constantes catalíticas (K_m e k_{cat}) de metalloserrulase 4 e serACE-like sobre substratos FRETs

Para a determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e catalíticas (k_{cat}), quantidades sequenciais de substrato fluorescente foram utilizadas. Para a metalloserrulase 4 os substratos analisados foram: Abz-GFLRRV-EDDnp; Abz-FLRRV-EDDnp; Abz-GFLRR-EDDnp e Abz-GGFLR-EDDnp nas concentrações 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . O tampão utilizado para metalloserrulase 4 foi o bórax 50 mM pH 8,5, com exceção do substrato Abz-FLRRV-EDDnp, que também teve suas constantes determinadas em pH fisiológico (PBS pH 7,4). Para serACE-like, o substrato analisado foi o Abz-FRK(Dnp)P-OH nas concentrações 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , 100 μM , 200 μM , em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl_2 10 μM , pH 7,0. O monitoramento das atividades enzimáticas foi realizado em fluorímetro Victor 3 durante 15 minutos, sob temperatura constante (37 °C). As cinéticas foram obtidas em condições onde o consumo de substrato fosse inferior a 10% (velocidades iniciais de hidrólise). As velocidades de hidrólise, velocidade máxima e K_m foram calculados utilizando o *software* Grafit 5.0.

Para o cálculo de k_{cat} (s^{-1}), as velocidades obtidas em UF/min foram convertidas para $\mu\text{M}/\text{min}$. A conversão foi baseada na hidrólise total de 1 μM de Abz-FLRRV-EDDnp (1440 UF = 1 μM). A concentração de cada enzima também foi convertida para

μM com base nas suas massas molares (72 kDa para serACE-like e 25 kDa para ms4). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.13 Teste de inibição por soroneutralização das metalloserrulases purificadas por antivenenos comerciais

Após a determinação das condições ótimas para o estudo das metalloserrulases, o potencial neutralizante dos antivenenos comerciais (antiaracnídico, lote 0706121 - e antiescorpiónico, lote 0905104/A) foi avaliado em ensaios *in vitro*. Para tal, as peptidases ms3 e ms4 foram pré-incubadas com os antivenenos comerciais durante 30 minutos em tampão PBS pH 7,4, em placa de 96 poços branca. As concentrações utilizadas foram 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:500 e 1:1000 (proporção veneno: antiveneno, em μg). Após esse período, o substrato Abz-FLRRV-EDDnp ($1/4 K_m$) foi adicionado e a inibição por soroneutralização determinada em fluorímetro.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da atividade peptidásica do veneno de *Tityus serrulatus* utilizando peptídeos biologicamente ativos (PBA)

Primeiramente, foi realizada a seleção de possíveis novos substratos para as peptidases do veneno de *Tityus serrulatus*. Os peptídeos testados foram: dinorfina 1-13, utilizada como controle positivo (VENANCIO et al., 2013); neuropeptídeo Y; peptídeo YY; polipeptídeo pancreático; substância P; hemopressina; cadeia B da insulina; somatostatina, angiotensina I e bradicinina. O veneno (1 µg) foi incubado com cada peptídeo separadamente a 37 °C em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 (denominado Tampão 1) ou em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0 (denominado Tampão 2). As análises foram realizadas em coluna Restek C-18 utilizando gradiente de 10-60% de B em 20 minutos em sistema de HPLC Shimadzu. O resultado pode ser observado na Tabela 01.

Tabela 01 - Seleção de novos substratos para o veneno de *Tityus serrulatus* em tampão 1 (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8) e tampão 2 (Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7). As análises foram realizadas em cromatografia de fase reversa utilizando coluna Restek C-18 em sistema de HPLC (Shimadzu), com gradiente de 10-60% de B em 20 minutos.

Peptídeo	Atividade específica – Tampão 1 (µM/µg/min)	Atividade específica - Tampão 2 (µM/µg/min)
Neuropeptídeo Y	0,29 ± 0,03	n.d.
Peptídeo YY	0,29 ± 0,03	n.d.
Dinorfina 1-13	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,04
Hemopressina	0,070 ± 0,005	0,39 ± 0,01
Polipeptídeo pancreático	0,050 ± 0,001	n.d.
Substância P	< 0,001	n.h.
Somatostatina	n.h.	n.h.
Cadeia B da Insulina	n.h.	n.h.
Angiotensina I	n.h.	0,054 ± 0,010
Bradicinina	n.h.	0,044 ± 0,003
Neurotensina	n.h.	n.d.

n.h=não foi observada hidrólise;

n.d. = não determinado.

A Tabela 01 demonstra que o veneno de *Tityus serrulatus* apresenta especificidade quanto à proteólise de peptídeos biologicamente ativos. Em especial, os peptídeos membros da família do neuropeptídeo Y, que inclui o peptídeo YY e polipeptídeo pancreático, foram eficientemente clivados pelo veneno, assim como hemopressina e dinorfina 1-13.

Adicionalmente, tendo em vista que normalmente peptidases são sensíveis a características bioquímicas no tampão de trabalho, em especial a enzima conversora de angiotensina I, foram realizados testes de atividade com o Tampão 2 que contém 10 μ M de ZnCl_2 e pH neutro. Como resultado, angiotensina I e bradicinina foram hidrolisadas, além da dinorfina I e da hemopressina. A somatostatina, a cadeia B da insulina e a substância P não foram hidrolisadas pelo veneno em nenhum dos tampões testados, mesmo após longos períodos de incubação, indicando especificidade por parte das peptidases existentes neste veneno.

Os picos de hidrólise dos novos substratos hidrolisados quando da utilização do Tampão 1 foram coletados e analisados por espectrometria de massa. O resultado das clivagens encontra-se na Tabela 02.

Tabela 02 - Determinação dos produtos de hidrólise dos novos substratos do veneno total de *T. serrulatus* em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Resultados obtidos por espectrometria de massas (Orbitrap).

Peptídeo	Sequência	Massa (Da)	Fragmento
Hemopressina	PVNFKFLSH*	1087,5815	
	PVNFKFL--	863,4905	1-7
	PVNFKF---	750,4064	1-6
	PVNFK----	603,338	1-5
	----KFLSH	630,3489	5-9
	-----FLSH	502,254	6-9
Peptídeo YY	YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH2*	4310,80	
	YPIKPEAPGEDA-----	1285,619	1-12
	YPIKPEAPGED-----	1214,5819	1,11
	YPIKPEAPGE-----	1099,5549	1-10
	YPIKPEAPG-----	970,5123	1-9
	YPIKPEAP-----	913,4908	1-8
	-----EDASPEELNRYYA-----	1555,679	10-22
	-----DASPEELNRYYA-----	1426,6365	11-22
	-----ASPEELNRYYA-----	1311,6095	12-22
	-----SPEELNRYYA-----	1240,5724	13-22
	-----EELNRYYAS-----	1143,5197	15-23
	-----EELNRYYA-----	1056,488	15-22
	-----ASPEELNRYYASLRHYLNLVTR---	2664,3772	12-33
	-----YASLRHYLNLVTRQR-	1889,0383	20-35
	-----YASLRHYLNLVT----	1448,7776	21-32

	-----YASLRHYLNL-----	1248,6615	21-30
	-----YASLRHYLN-----	1135,5774	21-19
	-----ASLRHYLNLVTRQR-----	1725,9751	22-34
	-----SLRHYLNLVTRQ-----	1654,938	23-34
	-----SLRHYLNLVTR-----	1370,7782	23-33
	-----SLRHYLNLVT-----	1214,6771	23-32
	-----RHYLNLVTRQR-----	1454,8218	25-34
	-----RHYLNLVT-----	1014,561	25-32
	-----HYLNLVTRQR-----	1298,7207	26-35
	-----HYLNLVTRQ-----	1014,561	26-34
	-----YLNVLVTRQR-----	1161,6619	27-35
	-----YLNVLVTRQ-----	1005,5607	27-34
	-----LNLVTRQ-----	842,4974	28-34
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY-NH2*	4274,72	
	YPSKPDNPGEDAPAEDMAR-----	2058,895	
Neuropeptídeo Y	-----PSKPDNPGED-----	1054,457	1-19
	--SKPDNPGED-----	957,4039	2-11
	--SKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQ-----	3690,785	3-11
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQR-----	4107,002	2-33
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQ-----	3950,901	1-35
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITR-----	3822,842	1-34
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITR-----	3666,741	1-33
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLIT-----	3339,525	1-32
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYIN-----	3112,398	1-31
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHY-----	2949,335	1-30
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRH-----	2543,091	1-29
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALR-----	2472,054	1-23
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYS-----	2385,022	1-22
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYY-----	2221,959	1-21
	YPSKPDNPGEDAPAEDMARY-----	2058,895	1-20
	YPSKPDNPGEDAPAEDMAR-----	1700,717	1-19
	YPSKPDNPGEDAPAED-----	1585,69	1-16
	YPSKPDNPGEDAPAE-----	1456,647	1-15
	YPSKPDNPGEDAPAE-----	1385,61	1-14
	YPSKPDNPGEDAP-----	1288,557	1-13
	YPSKPDNPGEDAP-----	1217,52	1-12
	YPSKPDNPGED-----	1102,493	1,11
	YPSKPDNPGE-----	973,4504	1-10
	YPSKPDNPG-----	819,3762	1-9
	YPSKPDN-----	705,3333	1-7
	-----AEDMARYYS-----	1104,455	1-6
	-----NPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQ-----	3263,578	14-22
	-----DAPAEDMARYYSALRHYINLITRQ-----	2866,419	7-34
	-----APAEDMARYYSALRHYINLITRQ-----	2751,391	11-34
	-----APAEDMARYYSALRHYINLITR-----	2623,333	12-34
	-----MARYYSALRHYINLITRQ-----	2268,195	12-33
	-----SALRHYINLITRQ-----	1583,89	17-34
	-----SALRHYINLIT-----	1299,73	22-34
	-----ALRHYINLIT-----	1212,698	22-32
	-----LRHYINLITRQ-----	1496,858	23-32
	-----RHYINLITRQ-----	1425,82	23-34
	-----HYINLITRQ-----	1312,736	24-34
	-----YINLITRQ-----	1156,635	25-34
	-----INLITRQ-----	1019,576	26-34
	-----INLITRQ-----	856,5131	27-34
	APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLRRYINTLTPRY-NH2*	4399,91	28-34
Polipeptídeo Pancréatico	APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLRRYINTLTPR-----	4078,012	1-34
	APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLRRYINT-----	3610,726	1-30
	APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLRRY-----	3282,552	1-27
	APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLRR-----	3119,488	1-26

APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLR-----	2963,387	1-25
APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQL-----	2807,286	1-24
APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQ-----	2694,202	1-23
APLEPMYPGDYATHEQRAQYET-----	2566,143	1,22
APLEPMYPGDYATHEQRAQY-----	2336,053	1-20
APLEPMYPGDYATHEQRAQ-----	2172,99	1-19
APLEPMYPGDYATHEQRA-----	2044,9313	1-18
APLEPMYPGDYATHE-----	1689,734	1-15
APLEPMYPGDYAT-----	1423,633	1-13
APLEPMYPGDYA-----	1322,585	1-12
APLEPMYPGDY-----	1251,548	1-11
APLEPMYPGD-----	1088,485	1-10
-PLEPMYPGDYATHEQRAQYETQL-----	2736,249	2-24
-----GDYATHEQRAQYETQLRRYINTLTRPR-	3335,687	9-35
-----GDYATHEQRAQYETQLRRYINTLTRP--	3179,586	9-34
-----GDYATHEQRA-----	1146,505	9-18
-----YATHEQRAQYETQLRRYINTLTRP--	3007,538	11-24
-----YATHEQRAQYETQL-----	2963,387	11-24
-----ATHEQRAQYETQ-----	1460,664	11-23
-----ATHEQRAQYE-----	1231,558	11-21
-----THEQRAQYETQ-----	1389,627	12-23
-----THEQRAQYE-----	1160,521	12-21
-----HEQRAQYETQ-----	1288,58	13-23
-----HEQRAQYE-----	1059,473	13-21
-----EQRAQYETQL-----	1689,734	14-24
-----QRAQYETQL-----	3610,726	15-24
-----QRAQYETQLRRYINTLTRPR-	2562,389	15-35
-----RYINTLTRP--	1132,635	26-34
-----YINTLTRP--	1132,635	27-35
-----YINTLTRP--	976,5342	27-34

*= sequência do peptídeo nativo

A análise de espectrometria de massas dos fragmentos revelou diferentes quantidades de produtos formados – hemopressina (5 fragmentos); peptídeo YY (23 fragmentos); neuropeptídeo Y (40 fragmentos); polipeptídeo pancreático (31 fragmentos) - e apresentando diferentes tamanhos como, por exemplo, para neuropeptídeo Y foram encontradas sequências curtas (NPY₁₋₆) e longas (NPY₁₋₃₅). Por fim, outro fator interessante observado foi em relação aos membros da família do neuropeptídeo Y, pois em todos os fragmentos gerados houve a remoção da tirosina amidada (Y₃₆-NH₂) presente no C-terminal dos peptídeos.

Os peptídeos hidrolisados exclusivamente no tampão da ACE (Tampão 2) também tiveram seus picos coletados e analisados em espectrômetro de massas. Os resultados estão apresentados na Tabela 03.

Tabela 03 - Determinação dos produtos de clivagem da angiotensina I e bradicinina hidrolisadas pelo veneno de *T. serrulatus* em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0. Resultados obtidos por espectrometria de massas (Orbitrap).

Peptídeo original	Fragmento	Identificação do fragmento	Massa (kDa)
Angiotensina I	DRVY-----	Inativo Ang ₁₋₄	551,270
	----IHPFHL	Inativo Ang ₅₋₁₀	762,418
	-----HPFHL	Inativo Ang ₆₋₁₀	649,334
	DRVYIHP---	Ang ₁₋₇	898,466
	DRVYIHPF--	Ang II	1045,465
	--RVYIHPF--	Ang III	930,5075
	-----FHL	Inativo Ang ₈₋₁₀	415,2219
Bradicinina	RPPGF----	Inativo BK ₁₋₅	572,31
	RPPGFSP--	Inativo BK ₁₋₇	756,39
	--PGFSPFR	Inativo BK ₃₋₉	806,4075

Como resultado da clivagem da angiotensina I e bradicinina pelo veneno total, foram originados sete peptídeos a partir da angiotensina I, dentre os quais quatro são reportados como inativos e três ativos, angiotensina II, angiotensina III e angiotensina 1-7, com atividades biológicas já descritas. Em relação à bradicinina, a clivagem pelo VTs originou três produtos de hidrólise, sendo fragmentos sem atividade.

4.2 Seleção de substratos fluorescentes para endo- e carboxipeptidases do VTs

Como foi possível observar pelos produtos de hidrólise dos substratos peptídicos biologicamente ativos, há evidências da ação de endo- e exopeptidases no veneno do *T. serrulatus*. Assim, antes do início do processo de purificação destas peptidases, foi padronizado o uso de substratos fluorescentes para a seleção de endopeptidases e carboxipeptidases presentes no VTs.

O veneno de *Tityus serrulatus* (VTs), 1 µg, foi inicialmente testado nos substratos fluorescentes Abz-GFLRRV-EDDnp (5 µM), já utilizado pelo nosso grupo para os estudos de metalopeptidases presentes no VTs (CAJADO CARVALHO et al., 2014; VENANCIO et al., 2013), e Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 µM), peptídeo fluorescente especialmente desenhado para estudos com a carboxipeptidase ACE por apresentar o C-

terminal livre (ARAÚJO et al., 2000). O resultado encontra-se expresso na figura a seguir.

Figura 04 - Ensaio de atividade do veneno de *Tityus serrulatus* sobre os substratos Abz-GFLRRV-EDDnp (esquerda, em azul e verde) e Abz-FRK(Dnp)P-OH (direita, rosa e roxo) utilizando o tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, 10 μ M ZnCl₂, pH 7,0. Os controles dos substratos (substrato com tampão) também estão representados em ambas as figuras (em cinza, à esquerda, e em preto e branco, à direita). Os ensaios foram realizados em duplicatas, as velocidades de hidrólise foram determinadas em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) e as análises feitas em software Grafit 5.0.

Como demonstra a Figura 04, o Abz-FRK(Dnp)P-OH foi clivado eficientemente pelo veneno total. O substrato Abz-GFLRRV-EDDnp já havia sido caracterizado como substrato para as metaloendopeptidases do VTs (CAJADO CARVALHO et al., 2014; VENANCIO et al., 2013) e utilizado rotineiramente no laboratório. Assim, como estes substratos permitem a clivagem por diferentes tipos de peptidases – Abz-GFLRRV-EDDnp por endopeptidases e Abz-FRK(Dnp)P-OH por carboxipeptidases – ambos os substratos foram utilizados para os *screening* de atividade subsequentes.

4.3 Ensaio de inibição do veneno total de *Tityus serrulatus*

A fim de se obter mais informações sobre as peptidases atuantes em cada substrato fluorescente, o VTs foi testado na presença de diversos inibidores utilizando os substratos fluorescentes Abz-FRK(Dnp)P-OH e Abz-GFLRRV-EDDnp. Foram utilizados inibidores sítio-específicos para serinopeptidases (PMSF) e para metalopeptidases (1,10-fenantrolina e EDTA), e inibidores seletivos para atividade ACE

símile, captopril e *Bj*-PRO-10c (CAMARGO et al., 2012); para a enzima conversora de endotelina e neprilisina, o fosforamidon (KUKKOLA et al., 1995); e para neprilisina, tiorfan e [des-Arg¹]-proctolin (DUZZI et al., 2016), tendo em vista que são enzimas que compartilham certos substratos como, por exemplo, a angiotensina I (RAWLINGS et al., 2010). O resultado é demonstrado na Figura 05.

Figura 05 - Inibição das atividades do VTs sobre os substratos fluorescentes para carboxi- e endopeptidases. Captopril (100 nM), *Bj*-Pro-10c (16 µM), tiorfan (10 µM), fosforamidon (10 µM), EDTA (50 mM), 1,10-fenantrolina (2 mM), PMSF (2 mM) e [des-Arg¹]-proctolin (10 µM) foram testados com o veneno total de *Tityus serrulatus* (1 µg) em ensaio fluorimétrico utilizando Abz-FRK(Dnp)P-OH (cinza-escuro) e Abz-GFLRRV-EDDnp (cinza-claro). As reações ocorreram em tampão 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 µM ZnCl₂, pH 7,0 a 37 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata, as velocidades de hidrólise foram determinadas em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) e as análises feitas em software Grafit 5.

Como aponta a Figura 05, a 1,10-fenantrolina e o EDTA foram capazes de inibir 100% da atividade enzimática sobre ambos os substratos, enquanto que a hidrólise foi mantida na presença do PMSF, assim, pode-se concluir que somente metalopeptidases atuam nos substratos FRETs testados. Além disso, o VTs não tem sua atividade peptidásica reduzida sobre o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp na presença do captopril, enquanto quando incubado com Abz-FRK(Dnp)P-OH, foi possível observar inibição

quase total (96%) da hidrólise do substrato pelo veneno em pequenas concentrações desde inibidor (100 nM). O peptídeo *Bj*-PRO-10c também foi capaz de inibir mais efetivamente a hidrólise de Abz-FRK(Dnp)P-OH (91% de inibição) do que em relação a hidrólise do substrato Abz-GFLRRV-EDDnp (1%). Em seguida, o fosforamidon inibiu fracamente o VTs sobre ambos os substratos, Abz-FRK(Dnp)P-OH (5%) e Abz-GFLRRV-EDDnp (6%), ao passo que o tiorfan foi capaz de inibir parcialmente somente a clivagem de Abz-FRK(Dnp)P-OH (14%). O peptídeo [des-Arg¹]-proctolin não afetou a atividade proteolítica do veneno em nenhum dos substratos testados.

Em adendo, por conta da inibição significativa obtida pelo captopril, foi verificada a porcentagem de inibição deste inibidor sobre a hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos relacionados à ACE humana (angiotensina I, bradicinina e hemopressina). A dinorfina 1-13 foi utilizada como controle negativo, tendo em vista que não houve inibição pelo captopril sobre o substrato fluorescente análogo (Abz-GFLRRV-EDDnp). Os resultados estão representados na Tabela 04.

Tabela 04 - Inibição das peptidases do veneno de *Tityus serrulatus* na hidrólise de peptídeos biologicamente ativos utilizando os inibidores captopril e EDTA. Experimento realizado em cromatografia de fase reversa com coluna Restek C-18 em sistema de HPLC (Shimadzu).

Inibição da atividade de VTs (%)			
Peptídeo	EDTA 50 mM	Captopril 100 nM	Captopril 1 µM
Angiotensina-I	100 ± 0	8,2 ± 4,0	49,0 ± 7,0
Bradicinina	100 ± 0	36,0 ± 4,0	60,0 ± 5,0
Dinorfina 1-13	100 ± 0	0,0 ± 5,0	2,0 ± 4,0
Hemopressina	100 ± 0	38,0 ± 5,0	9,0 ± 4,0

O captopril foi seletivo para a inibição da hidrólise dos substratos relacionados à atividade ACE-like, tendo em vista que a hidrólise da dinorfina 1-13 não foi afetada, enquanto as clivagens da angiotensina I e bradicinina foram inibidas de acordo com o aumento da concentração deste inibidor.

Apesar da hidrólise da hemopressina ter sido inibida pelo captopril, foi atingido um menor valor de porcentagem de inibição na presença da maior dose deste inibidor (1 μ M). Contudo, ao observar o perfil de hidrólise obtido em HPLC deste substrato (Figura 06), é possível notar que o pico correspondente ao fragmento PVNFKFL, produto esperado pela ação de peptidases ACE-símile (DALE et al., 2005), é totalmente inibido mesmo com 100 nM de captopril. Assim, podemos concluir que a hemopressina é substrato tanto para as endopeptidases quanto para as carboxipeptidases presentes no VTs.

Figura 06 - Análise de hidrólise da hemopressina pelo VTs em cromatografia de fase reversa e inibição por captopril. (A) Hemopressina, 30 μ M, sem veneno; (B) Hemopressina após 2 horas de incubação com o veneno de *Tityus serrulatus* (1 μ g), indicando os produtos de hidrólise; Clivagem de hemopressina pelo VTs na presença de 100 nM (C) e 1 μ M (D) de captopril, indicando a não formação do pico PVNFKFL em ambas condições testadas. Experimento realizado em cromatografia de fase reversa com coluna Restek C-18 em sistema de HPLC (Shimadzu).

4.4 Influência do íon cloreto na atividade da ACE-like do veneno de *Tityus serrulatus*

Considerando que a ACE humana sofre influência positiva na presença de cloreto (YATES et al., 2014), foi realizado um experimento comparativo entre a hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH pelo veneno total e pela ACE (Sigma) na presença de concentrações crescentes de NaCl. O resultado pode ser observado na figura a seguir.

Figura 07 - Efeito da concentração de íons cloreto sobre (A) Enzima Conversora de Angiotensina I (Sigma) (B) veneno de *Tityus serrulatus*. Para ambos, a hidrólise sobre o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH foi determinada em tampão Tris 100 mM, ZnCl_2 10 μM , com quatro concentrações de NaCl: zero, 10 mM, 20 mM e 50 mM. O resultado representa a média de dois experimentos independentes.

Como demonstrado, tanto para o veneno total quanto para a enzima conversora de angiotensina I comercial, as atividades foram positivamente afetadas com o aumento de concentrações de NaCl. Na presença de NaCl 10 mM, o VTs e a ACE de pulmão de coelho demonstraram um aumento de 15% e 25% em suas atividades catalíticas, respectivamente, e na maior concentração testada (50 mM) a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH pelo VTs aumentou mais de 35%, e cerca de 46% para a ACE de mamífero.

4.5 Análise do potencial neutralizante dos antivenenos comerciais sobre as hidrólises dos substratos fluorescentes e peptídeos bioativos pelo veneno total

O ensaio de inibição da atividade proteolítica de 1 μg de VTs por soroneutralização foi realizado primeiramente com o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp utilizando os soros antiescorpionico (SAE) e antiaracnídico (SAAr) (Figura 08).

Figura 08 - Curva de inibição por soroneutralização com antivenenos comerciais utilizando o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp e o veneno de *T. serrulatus* (1 µg). O veneno foi previamente incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, com nove concentrações de antivenenos (relação massa veneno/massa antiveneno, em µg): 1:1; 1:2; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100 ; 1:200; 1:500 e 1:1000, e o substrato foi adicionado na sequência. Doses abaixo de 1:10 não mostraram inibição e por isso foram excluídas do gráfico. O resultado é representativo de dois experimentos independentes, e expresso como a inibição da atividade peptidásica do veneno (%). SAE= soro antiescorpiônico e SAAr = soro antiaracnídico. As velocidades de hidrólise foram determinadas em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) e as análises realizadas em software Grafit 5.0.

A Figura 08 mostra que o SAAr apresenta, no geral, maior porcentagem de inibição do que SAE, pois o soro antiaracnídico é capaz de inibir em doses anteriores (a partir de 1:10 relação massa veneno/massa antiveneno) do que o soro antiescorpiônico, que demonstra atividade inibitória somente a partir de 1:50. Ambos os antivenenos foram somente capazes de inibir totalmente a atividade enzimática sobre o substrato fluorescente na concentração 1:1000 e não foi observada nenhuma inibição em doses abaixo de 1:10.

Tendo em vista que o substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH mostrou ser alvo de diferente(s) enzima(s) em relação ao Abz-GFLRRV-EDDnp, o ensaio de inibição pelos antivenenos comerciais também foi realizado neste FRET. O resultado encontra-se expresso a seguir, na Figura 09.

Figura 09 - Curva de inibição por soroneutralização com antivenenos comerciais utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH e o veneno de *T. serrulatus* (1 µg). O veneno foi incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, com nove concentrações (relação massa veneno/massa antiveneno): 1:1; 1:2; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100 ; 1:200; 1:500 e 1:1000, e o substrato foi adicionado na sequência. O resultado é representativo de dois experimentos independentes e expressa a inibição da atividade peptidásica do veneno (%). SAE= soro antiescorpiônico e SAAr = soro antiaracnídeo. As velocidades de hidrólise foram determinadas em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) e as análises realizadas em software Grafit 5.0.

Para a atividade do VTs sobre Abz-FRK(Dnp)P-OH, o bloqueio iniciou-se logo na primeira dose de SAE utilizada mas, apesar disso, mesmo na maior dose utilizada (1:1000), a atividade proteolítica sobre esse substrato não foi completamente inibida por nenhum dos antivenenos (94% de inibição por SAE e 97% por SAAr).

Em seguida, realizamos o ensaio de eficácia da neutralização do VTs pelos antivenenos (1:50 e 1:100) com os substratos selecionados (neuropeptídeo Y, peptídeo YY, hemopressina e polipeptídeo pancreático e dinorfina 1-13). O resultado pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Inibição de peptidases do veneno de *Tityus serrulatus* por soroneutralização utilizando os antivenenos comerciais utilizando como substratos peptídeos biologicamente ativos. Foram utilizados os seguintes substratos: dinorfina 1-13 (Dyn 1-13); neuropeptídeo Y (NPY); peptídeo YY (PYY); polipeptídeo pancreático (PP) e hemopressina (HEMO). O veneno de *T. serrulatus* (1 µg) foi incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente com doses de 1:50 e 1:100 de soro antiescorpiônico (SAE) ou soro antiaracnídeo (SAAr). Os experimentos foram feitos em duplicata. Os resultados foram obtidos em cromatografia de fase reversa com coluna Restek C-18 em sistema de HPLC (Shimadzu).

A Figura 10 mostra que, para a maioria dos peptídeos, observou-se uma resposta de inibição proporcional ao aumento da dose de soro, com exceção da hemopressina. No geral, a neutralização pelo SAAr foi mais efetiva do que pelo SAE. A clivagem sobre o polipeptídeo pancreático (PP) foi a melhor neutralizada por ambos os antivenenos, atingindo 86% de inibição para SAAr e 64% para SAE na maior dose testada, e também em 1:50 (63% de inibição por SAE e 72% de inibição por SAAr). A atividade do veneno sobre a dinorfina 1-13 (Dyn 1-13) e o peptídeo YY (PYY) foram similarmente inibidas pelo SAE tanto na menor dose (12% e 14%, respectivamente) quanto na maior (38% e 34%, respectivamente), porém, o SAAr na dose de 1:50 atingiu melhores valores de inibição sobre a clivagem de PYY (34%) do que para a hidrólise de Dyn 1-13 (11%). No caso da clivagem de NPY, tanto o SAE e quanto o SAAr resultaram em valores de inibição similares em ambas as doses (29% de inibição na dose de 1:50 para ambos os antivenenos, e 34% por SAE e 43% para SAAr na concentração 1:100). Por fim, a clivagem da hemopressina apresentou os piores valores de inibição do que em relação aos demais substratos e, curiosamente, a menor

concentração de ambos os soros (11% para SAE e 37% para SAAr) atingiu melhores valores de bloqueio da atividade do que em relação à dose de 1:100, na qual a inibição foi praticamente ausente (SAE) ou muito baixa (6% de bloqueio da atividade por SAAr).

Os resultados referentes à atividade metaloendopeptidásica descritos até o momento foram publicados na revista *Toxinological Science* em 2014 (CAJADO CARVALHO et al., 2014).

4.6 Fracionamentos do veneno total: Purificação das metalopeptidases do VTs

4.6.1 Purificação da enzima conversora de angiotensina I do veneno de *Tityus serrulaus*

4.6.1.1 Passo I: Cromatografia de troca aniônica

Após a caracterização dos dois substratos FRETs e dos peptídeos biologicamente ativos para serem utilizados em *screening* de atividade durante as etapas de purificação, o VTs foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica utilizando a coluna de HPLC PA-DEAE (Shim-Pack) (Figura 11). A coleta inicial foi a partir de 50 mg diluídos em 5 mL de tampão A (10 mg/mL).

Figura 11 - Perfil cromatográfico do veneno total de *T. serrulatus* utilizando a coluna de troca aniônica para HPLC PA-DEAE (Shim-Pack) em sistema de HPLC (Shimadzu). A eluição foi feita sob fluxo 5 mL/min utilizando tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (tampão A com adição de 500 mM, NaCl pH 8,2), sendo o gradiente de 0- 80% B em 80 minutos (linha azul).

A Figura 11 mostra que foram coletadas onze frações do veneno total obtidas em intervalo de 5 em 5 minutos, com exceção da fração F11.

Após a coleta, as frações da DEAE tiveram suas concentrações dosadas pelo método de Bradford e foram analisadas quanto a sua atividade peptidásica utilizando o substrato fluorescente e a hemopressina. A Tabela 05 mostra as velocidades de hidrólise obtidas sobre o substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH e sobre a hemopressina. A hemopressina foi selecionada para o *screening* de atividade dentre os peptídeos biologicamente ativos, uma vez que a atividade específica do VTs é mais elevada neste substrato do que em relação a angiotensina I e bradicinina (Tabela 05) no tampão 2. Além disso, a hemopressina é 100 vezes melhor hidrolisada pela ACE humana quando comparada com a angiotensina I (RIOLI et al., 2003).

Tabela 05 - Atividade específica do veneno total de *Tityus serrulatus* (VTs) e das frações coletadas da troca aniônica (DEAE) sobre a hidrólise de hemopressina e Abz-FRK(Dnp)P-OH. Os resultados foram obtidos em cromatografia de fase reversa com coluna Restek C-18 em sistema de HPLC (Shimadzu) para a hemopressina. Para o substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH, as hidrólise foram determinadas em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) e as análises realizadas em software Grafit 5.0.

Amostra	Hidrólise de Hemopressina ($\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$)	Hidrólise de Abz-FRK(Dnp)P-OH (UF/min)
VTs	0,180	1002
DEAE-F1	0,097	215
DEAE-F2	0,041	6
DEAE-F3	S/A	8
DEAE-F4	S/A	11
DEAE-F5	S/A	16
DEAE-F6	S/A	11

É possível observar claras diferenças entre as frações testadas. A fração F1 foi cerca de 200 vezes mais ativa para a hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH do que em relação as outras frações. Para o substrato natural, as frações F1 e F2 foram capazes de hidrolisar a hemopressina, enquanto as demais frações não tem atividade sobre este

peptídeo. Como é possível observar na Figura 11, é importante destacar que a fração F1 não ficou retida na coluna cromatográfica utilizada.

A Figura 12 demonstra o perfil de hidrólise da fração F1 sobre os substratos angiotensina I (Painel A), selecionado por ser alvo de interesse biológico e clivada pela enzima conversora de angiotensina I, e hemopressina (Painel B), a qual foi bem hidrolisada pelo veneno total e reconhecida por ser um bom substrato para a ACE (Figura 06).

Figura 12 - Ação peptidásica da fração F1. (A) Angiotensina I (incubação *overnight*) e (B) Hemopressina, (incubação de 2 horas). Os resultados foram obtidos em cromatografia de fase reversa utilizando coluna C-18 no sistema HPLC (Shimadzu).

A partir da Figura 12, observa-se a formação de picos similares obtidos quando foi utilizado o veneno total (Figura 06) e a fração F1. Além dos picos mais hidrofílicos PVNFK, KFLSH e FLSH, observa-se a formação da fração PVNFKFL, o que indica a remoção dos aminoácidos Ser-His do N-terminal por uma dipeptilcarboxipeptidase. Para a angiotensina I, é possível observar a formação de angiotensina II e outros dois picos de hidrólise mais hidrofílicos.

Após selecionar a fração com melhor atividade carboxipeptidásica (F1), foi realizada a retirada de sal e concentração das amostras utilizando membrana de corte molecular de 3 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices), além da troca do tampão de eluição da DEAE para Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0, visando a manutenção da atividade ACE-like. A fração foi analisada em gel 13% corado por Coomassie Blue Coloidal. O resultado pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Gel SDS-PAGE de poliácridamida a 13% com coloração Coomassie Blue Coloidal do veneno total de *T. serrulatus* (VTS) e da fração F1 proveniente da cromatografia de troca iônica, todos em condições não redutoras. O marcador molecular utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standards (7,6–216 kDa).

O gel de poliácridamida demonstrou um perfil bem complexo e, por conta das bandas apresentarem diferentes massas moleculares, a etapa de purificação seguinte foi a cromatografia de exclusão molecular.

4.6.1.2 Cromatografia de exclusão molecular (Gel-Filtração)

A cromatografia de exclusão molecular decorreu em sistema HPLC (Shimadzu) utilizando a coluna Diol-300 (Shim-pack). A fração F1 foi aplicada e suas subfrações coletadas manualmente (Figura 14).

Figura 14 - Perfil cromatográfico da fração F1 em gel-filtração utilizando a coluna Diol-300. A amostra foi eluída sob fluxo 0,5 mL/min utilizando tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, em 80 minutos. Em vermelho, detecção a 214 nm e em preto, detecção em 280 nm.

Como demonstra a Figura 14, a fração F1 em gel-filtração resultou em sete novas frações principais, sendo que na última foram reunidos os picos de componentes com menor massa molecular.

Após a coleta, as subfrações foram primeiramente quantificadas pelo método de Bradford e posteriormente submetidas à *screening* de atividade com o substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH. Além disso, o tampão foi novamente trocado para Tris 100 mM, NaCl 50 mM, $ZnCl_2$ 10 μM , pH 7,0 utilizando uma membrana de corte molecular de 3 kDa, tendo em vista a sensibilidade desta enzima quanto ao tampão de estoque. Os ensaios cinéticos e o perfil eletroforético das frações estão expressos na figura a seguir.

Figura 15 - Resultados das subsfrações de F1 obtidas em gel-filtração: À esquerda, *screening* de atividade das subfrações de F1 pós gel-filtração (5 µg) utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (5 µM) e à direita, gel de SDS-PAGE 13%, em condições não redutoras, corado por prata. S/A = sem atividade. O marcador molecular utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standards (7,6–216 kDa).

Como mostra a Figura 15, após a gel-filtração, as frações que apresentaram atividade proteolítica foram F1-2 e F1-3. O gel demonstra ao menos três bandas proteicas principais em F1-2 e duas em F1-3, indicando a necessidade de uma próxima etapa de purificação.

4.6.1.3 Cromatografia de troca catiônica

Por se tratar de uma fração proveniente da F1, a qual não interagiu com a coluna aniônica, a amostra F1-2 da gel-filtração foi submetida à troca catiônica. A coluna utilizada foi PA-CM (Shim-pack), sendo o tampão A composto de Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0 e o tampão B composto pelo tampão A com adição de 0,5 mM de NaCl. A eluição teve duração de 80 minutos a 0,4 mL/min. A Figura 16 mostra o resultado.

Figura 16 - Cromatografia de troca catiônica da fração F1-2 utilizando a coluna de HPLC PA-CM (Shim-Pack). A eluição foi feita sob fluxo 0,4 mL/min em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0) e tampão B (tampão A com adição de NaCl 500 mM, pH 7,0), sendo o gradiente (linha azul) de 0-30% B em 40 minutos, 30-80% B em 10 minutos e 80-100% B em 5 minutos. Detecção em 280 nm.

As frações foram coletadas, concentradas em membrana de corte molecular de 3 kDa a 4 °C e, afim de manter a atividade proteolítica, e o tampão foi novamente trocado para Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0. Em seguida, as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e testadas com o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH e angiotensina I. O perfil eletroforético da amostra com melhor atividade em SDS-PAGE 13% foi realizado (Figura 17).

Figura 17 – Análise das subfrações de F1-2 obtidas na cromatografia de troca catiônica – (A) *Screening* fluorimétrico de atividade enzimática usando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH, apontando atividade principalmente em F1-2.6 (500 ng) e F1-2.7 (500 ng), (B) gel de poliacrilamida 13%, demonstrando uma banda fraca em F1-2.7, em condições não redutoras; (C) Conversão de angiotensina I em angiotensina II pela fração F1-2.7 (aproximadamente 100 ng) após incubação *overnight*.

Como mostra a Figura 17, após a troca catiônica, as frações F1-2.6 e F1-2.7 foram as únicas capazes de clivar o substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH, além de realizar a conversão de angiotensina I em angiotensina II, mimetizando a atividade da enzima conversora de angiotensina I humana. O gel de poliacrilamida 13% revelou a uma banda fraca em F1-2.7 de aproximadamente 70 kDa, indicando a finalização da purificação.

A banda do gel de SDS-PAGE foi recortada, tripsinizada, e submetida ao espectrômetro de massas Orbitrap do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan. Os resultados foram analisados no software PEAKS 7.5. Para tal, foram selecionadas como modificações pós traducionais (PTM) a carbaminometilação de cisteínas, como modificação fixa, e como variável, a oxidação dos resíduos de metionina e a deamidação de asparagina e glutamina, por conta do tratamento utilizado na extração da banda do gel.

Para a análise de sequenciamento da banda que corresponde à proteína com atividade similar a ACE, foi montado um banco de dados com sequências obtidas no UNIPROT (restrição para o gênero *Tityus*), sendo adicionadas as sequências de ACEs de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. obscurus* obtidas por análise transcriptômica pelos colaboradores Dra. Ursula Castro de Oliveira e Dr. Inácio Junqueira de Azevedo, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, pois se tratavam de sequências inéditas e ainda não encontradas em outros bancos de dados disponíveis. O resultado está representado na Figura 18.

A

Figura 18 - Resultado da banda de F1-2.7 - Identificação por espectrometria de massas da enzima conversora de angiotensina-I similar a peptidase transcrita em *Tityus serrulatus* analisada em software PEAKS 7.5, com cobertura de 2% da molécula. (A) Peptídeos resultantes da digestão *in gel* da banda de 70 kDa marcados em azul na sequência primária da enzima, onde a consenso de metalopeptidases está destacado em vermelho (FDR < 1%); (B) Espectros anotados dos dois peptídeos únicos encontrados.

Para a fração F1-2.7, foram identificados dois peptídeos únicos da sequência da enzima conversora de angiotensina I do veneno de *Tityus serrulatus*, com índice de falsas descobertas (FDR) menor que 1%. Por conta disso, esta molécula foi nomeada neste trabalho como serACE-like. O peso molecular predito de 72 kDa para esse transcrito está de acordo com a banda referente à ACE I do VTs (Figura 17).

Tendo em vista que sequências similares à enzima conversora de angiotensina I estão presentes em outros transcritos provenientes de glândulas de veneno de escorpiões brasileiros do gênero *Tityus*, um alinhamento entre essas sequências foi realizado, sendo comparadas suas porcentagens de similaridades e identidades (Tabela 06). Em adendo, as sequências de ACE-like de escorpiões foram também comparadas com a estrutura primária da ACE testicular humana, considerando que esta molécula possui massa molecular similar, em torno de 70 kDa (HAGAMAN et al., 1998).

Tabela 06 - Comparativo de identidade (branco) e similaridade (cinza) de estrutura primária dos transcritos de ACEs do veneno de *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, e *T. obscurus* e da ACE testicular humana.

	testicularACE <i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)
testicularACE <i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)		39,18%	23,12%	39,18%
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	46,39%		67,21%	90,34%
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	28,16%	67,34%		61,22%
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	46,53%	92,51%	62,31%	

A Tabela 06 demonstra alta identidade entre as ACEs dos venenos de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. obscurus*, com mais de 67% dos aminoácidos idênticos. Em termos de similaridade, todas as sequências apresentam grau de similaridade acima de 46% entre si, indicando uma possível aproximação em termos funcionais.

Por conta de valores relevantes de identidade e similaridade, a sequências de ACE dos escorpiões brasileiros do gênero *Tityus* foram alinhadas com a sequência da ACE humana testicular (*Homo sapiens* [AAA60611.1]) (Figura 19).

<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	M G Q G W A T A G L P S L L F L L L C Y G H P L L V P S Q E A S Q Q V T V T H G T S S Q A T T S S Q	[50]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	- M L - - H A F I I Y L S - - - - - S I -	[50]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- Q A F I I Y L S - - - - - S I -	[50]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	- M L - - P A F L L Y L C - - - - - S I -	[50]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	T T T H Q A T A H Q T S A Q S P N L V T D E A E A S K F V E E Y D R T S Q V V W N E Y A E A N W N Y	[100]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	- N C C K H S A L Q E H F A A H F V R H A N E V N E K Q C N L F Q T A Y W N Y	[100]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- N C C N H S A F Q E H F A A H F I R H A N E V N E K Q C N L F Q T A S W N Y	[100]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	- S C K I R K K T S L E A D M T K I Y S T T I C D F K N K K C N L F Q R A S W N Y	[100]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	N T N I T T E T S K I L L Q K N M Q I A N H T L K Y G T Q A R K F D V N Q L Q N T T I K R I I K K V	[150]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	D T N I T I F N K N K M I Q Q Q M I A S N V S K K I W G V L T K F P W K K F S D P Q L R R Q F Y Q L	[150]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	D T D I T I L N K N K M I Q Q Q M I A S N V S K K I W G V L T K F P W K K F S D P Q L R R Q F Y Q L	[150]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	D T N I T I P N K N K M I E Q Q M I A S N I S K E M W K V L T K F Q W K K F F D P Q L R R Q F Y H L	[150]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	Q D L E R A A L P A Q E L E E Y N K I L L D M E T T Y S V A T V C H P - - - - N G S C L Q L E P D L T	[200]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	S F L G D S A L S D D K L R K K S S L E A D M T K I Y S T T T I C D F T N K N K C N L S L D P D L S	[200]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	S F L G D S A L S D D K L R K K S S L E A D M T K I Y S T T T I C D F T N K N K C N L S L D P D L S	[200]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	S F L G D S A L P S D K I R K K T S L E A D M T K I Y S T T T I C D F K N K K C N L S L E P D L S	[200]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	N V M A T S R K Y E D L L W A W E G W R D K A G R A I L Q F Y P K Y V E L I N Q A A R L N G Y V D A	[250]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	N I L A N S N N Y Y E L L Y V W K E W R N K V G R K I K P L Y W E F V H L K N E A A R L N G F K N A	[250]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	N I L A N S N N Y Y E L L Y V W K E W R N K V G R K I K P L Y W E F V H L K N E A A R L N G F K N A	[250]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	S I M A N S N D Y Y E L L H V W K E W R N K V G R K I R P L Y W E F V D L K N E A A R L N G F N D A	[250]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	G D S W R S M Y E T P S L E Q D L E R L F Q E L Q P L Y L N L H A Y V R R A L H R H Y G A Q H I N L	[300]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	G E F Q R E K Y E S P T L I Q D L E D L W Q Q I R P L Y Q Q L H A Y V R R R L I E K Y G N D K I S A	[300]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	G E F Q R E K Y E S P T L I Q D L E D L W Q Q I R P L Y Q Q L H A Y V R R R L I E K Y G N D K I S A	[300]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	G E F Q R E K Y E S P T L I Q D L E L W H Q I R P L Y Q Q L H A Y V R R K L I E M Y G S D K I V K	[300]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	E G P I P A H L L G N M W A Q T W S N I Y D L V V P F P S A P S M D T T E A M L K Q G W T P R R M F	[350]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	D G P I P A H L L G N M W S Q E W Q N I N I T I P Y R N K P S L D V T P Q M K A K G M K P V Q I A	[350]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	H G P I P A H L L G N M W S Q E W Q N I N I T I P Y R N K P S L D V T P Q M K A K G M K P V Q I A	[350]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	D G P I P A H L L G N M W S Q E W Q N I N I T M P Y R N K P S L D V T P Q M K A K G M T P V Q I A	[350]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	K E A D D F F T S L G L L P V P P E F W N K S M L E K P T D G R E V V C H A S A W D F Y N G K D F R	[400]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	K L A E R F F V S L G L K P M T K E F W S N S L L E K P K D - R K V V C H A S A W D L C N K R D F R	[400]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	K L A E Q F F V S L G L K P M T K E F W S N S L L E K P K D - R K V V C H A S A W D L C N K R D F R	[400]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	K L A E Q F F V S L G L Q P M T K E F W S N S L F E K P K D - R K V V C H A S A W D L C D K R D F R	[400]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	I K Q C T T V N L E D L V V A H H E M G H I Q Y Y F M Q Y K D L P V A L R E G A N P G F H E A I G D V	[450]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	I K M C M E T T M D F L I T T H H E M G H V Q Y Y M Q Y A N Q P H V F R K G A N P G F H E A I G D V	[450]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	I K M C M E T T M D F L I T T H H E M G H V Q Y Y M Q Y A D Q P H V F R K G A N P G K F * - - - -	[450]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	I K M C M E C T M D F L I T T H H E M G H V Q Y Y M Q Y A N Q P H V F R K G A N P G F H E A I G D V	[450]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	L A L S V S T P K H L H S L N L L S S E G G S D E H D I N F L M K M A L D K I A F I P F S Y L V D Q	[500]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	M S L S V Y T P N H L Q S I G L M N Y T V S D R E G D I N F L L Q M A L K K I A F L P Y G Y I L D K	[500]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- -	[500]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	M S L S V Y T P N H L Q S I G L L N D I V S D R E A D I N F L L Q M A L K K I A F L P F G Y I L D K	[500]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	W R W R V F D G S I T K E N Y N Q E W W S L R L K Y Q G L C P P V P R T Q G D F D P G A K F H I P S	[550]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	W R W G V Y S G E V E L D E W N T K W W E M R F K Y Q G V C P P V R R T E I D F D P G A K F H V P A	[550]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- -	[550]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	W R W E V Y S G E I E F E E W N R R W W E M R F K Y Q G V C P P I R R T E I D F D P G A K F H V P A	[550]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	S V P Y I R Y F V S F I I Q F Q F H E A L C Q A A G H T G P L H K C D I Y Q S K E A G Q R L A T A M	[600]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	D T P Y I R Y F I S F I I Q F Q F H E A L C R V T G F Q G P L H K C D I Y N S K E A G K L I S E M M	[600]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- -	[600]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	D T P Y I R Y F I S F I I Q F Q F H E A L C R V S G F Q G P L H K C D I Y N S K E A G K L I S G M M	[600]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	K L G F S R P W P E A M Q L I T G Q P N M S A S A M L S Y F K P L L D W L R T E N E L H G E K L G W	[650]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	Q M G S S R P W P E A F E K I T G T R K M N A N S L L E Y F K P L Y E W L K E A N K - N E T I G W	[650]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- -	[650]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	Q M G S S R P W P E A F E K I T G S R K M N A D S L L E Y F K P L Y E W L K E A N K - N E V I G W	[650]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	P Q Y N W T P N S A R S E G P L P D S G R V S F L G L D L D A Q Q A R V G Q W L L L F L G I A L L V	[700]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	N T I D P T V C P -	[700]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- -	[700]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	E T F D P T V C P -	[700]
<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	A T L G L S Q R L F S I R H R S L H R H S H G P Q F G S E V E L R H S	[735]
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	- -	[735]
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	- -	[735]
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	- -	[735]

Figura 19 - Alinhamento das sequências primárias das enzimas conversoras de angiotensina I das espécies *Homo sapiens* (AAA60611.1); *Tityus serrulatus* (Tser01365); *Tityus bahiensis* (Tbah00054); *Tityus obscurus* (Tobs01411). As análises foram realizadas no software Mega 7 utilizando a ferramenta MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Em cinza estão marcadas as regiões

conservadas, em cinza-escuro as cisteínas; em vermelho, o sítio de ligação com o zinco com assinatura de metalopeptidase HEMGH, e em laranja, os peptídeos encontrados em espectrometria de massas.

Como resultado do alinhamento, é possível notar a conservação de várias regiões, em especial, cisteínas localizadas na mesma posição e o sítio catalítico com aminoácidos idênticos (HEMGH), o que é um forte indício para uma atividade similar.

Os resultados referentes à purificação e caracterização por bioinformática da serACE-like descritos até este momento encontram-se publicados na revista *Toxins* (Anexo I).

4.6.1.4 Caracterizações bioquímicas da enzima conversora de angiotensina I-like purificada do VTs

4.6.1.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos de serACE-like

As constantes cinéticas de ACE-like na hidrólise de Abz-FRK(Dnp)P-OH foram obtidas em fluorímetro utilizando o tampão de trabalho Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0. O resultado pode ser observado na Figura 20.

Figura 20 - Determinação das constantes cinéticas para a hidrólise do substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH em tampão Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0, utilizando a serACE-like do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. O

resultado representa a média das triplicatas, e o valor de K_m foi obtido no software Grafit 5.0.

Como resultado, é possível observar que a serACE-like hidrolisou o substrato com um alto valor de K_m (aproximadamente 20 μM), mas também apresentou um alto valor de k_{cat} (cerca de 77 s^{-1}). Assim, a constante de especificidade (k_{cat}/K_m) foi relativamente baixa (3,8 $\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$).

4.6.1.4.2 Determinação das condições ideais do tampão de trabalho de serACE-like

A influência do pH na atividade de serACE-like foi avaliada no intervalo entre pH 5,0 e 10,0. O resultado encontra-se expresso na figura a seguir.

Figura 21 - Influência do pH na atividade peptidásica de serACE-like (500 ng). Os sais utilizados foram; fosfato de sódio (pH 5,0 – 7,5); bórax-ácido bórico (pH 8,0 – 9,0) e bórax-NaOH (pH 9,5-10). A atividade proteolítica específica foi monitorada durante 15 minutos utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 μM). Experimento realizado em triplicata, e velocidades calculadas no software Grafit 5.0. Os gráficos foram construídos no software GraphPad Prism 5.0.

Como é possível observar, a serACE-like apresenta baixa atividade hidrolítica em meio ácido, sendo que não foi detectada atividade em pH 5,0. É possível observar aumento gradativo de acordo com a alcalinização do tampão de trabalho, apresentando um pico ótimo em pH 8,0.

A influência da temperatura na atividade hidrolítica de serACE-like também foi avaliada entre 22 °C e 42 °C (Figura 22).

Figura 22 - Influência da temperatura na atividade de serACE-like (500 ng) do veneno de *Tityus serrulatus* em intervalo de 5 °C entre 22 °C e 42 °C. A atividade proteolítica específica foi monitorada em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) durante 30 minutos. A peptidase foi pré-incubada durante 15 minutos na temperatura desejada antes da adição do substrato. As atividades específicas (μM/μg/min) foram calculadas no software Grafit 5.0 e os gráficos construídos no software GraphPad Prism 5.0. O experimento realizado em triplicata.

Para serACE-like, foi possível observar que a temperatura tem pouca influência na hidrólise do substrato. Em geral, a velocidade de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH se manteve constante no intervalo testado.

4.6.2. Purificação das metalloserrulases 3 e 4

4.6.2.1 Passo I: Cromatografia de troca aniônica

Prosseguindo a purificação das demais peptidases de interesse, o fracionamento também se deu inicialmente pela mesma cromatografia utilizada para a purificação da ACE-símile. Ou seja, em cromatografia de troca aniônica utilizando a coluna de HPLC PA-DEAE (Shim-Pack) a partir de VTs na concentração de 10 mg/mL diluído em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2). Para uma melhor compreensão dos resultados, optamos pela rerepresentação do perfil cromatográfico obtido com esta coluna (Figura 11).

Figura 11 - Perfil cromatográfico do veneno total de *T. serrulatus* utilizando a coluna de troca aniônica para HPLC PA-DEAE (Shim-Pack) em sistema de HPLC (Shimadzu). A eluição foi feita sob fluxo 5 mL/min utilizando tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (tampão A com adição de 500 mM, NaCl pH 8,2), sendo o gradiente de 0- 80% B em 80 minutos (linha azul).

Como demonstrado anteriormente, onze frações foram coletadas em intervalo de 5 em 5 minutos, com exceção da fração F11.

Como dito anteriormente, após a coleta as frações tiveram suas concentrações proteicas determinadas pelo método de Bradford. Para o *screening* de atividade das endopeptidases, as frações da DEAE foram analisadas quanto a sua velocidade de hidrólise sobre os substratos Abz-GFLRRV-EDDnp e dinorfina 1-13 (Tabela 07).

Tabela 07 - Atividade específica do veneno de *Tityus serrulatus* (VTs) e das frações coletadas da troca aniônica (DEAE) na hidrólise de dinorfina 1-13 obtidos em coluna de C-18 no sistema HPLC (Shimadzu) de fase reversa, e na clivagem do substrato fluorescente Abz-GFLRRV-EDDnp, a qual foi determinada em fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer) e as análises realizadas em software Grafit 5.0.

Amostra	Hidrólise de Dinorfina 1-13 ($\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$)	Hidrólise de Abz-GFLRRV-EDDnp (UF/min)
VTs	0,29	384,5
DEAE-F1	S/A	S/A

DEAE-F2	0,260	14
DEAE-F3	1,000	72
DEAE-F4	1,429	64
DEAE-F5	0,440	78
DEAE-F6	0,900	37

Os valores mais expressivos de velocidades de hidrólise do substrato Abz-GFLRRV-EDDnp foram observados nas frações F3 (72 UF/min) e F5 (78 UF/min). As frações subsequentes (F7 em diante) não foram capazes de clivar ou hidrolisaram fracamente o substrato testado e, por isso, não foram selecionadas para as próximas etapas de purificação.

A dinorfina 1-13 foi bem hidrolisada por todas as frações, com destaque para F3, F4 e F5, exceto pela F1, na qual não foi detectada atividade peptidásica neste substrato. Os produtos formados por cada fração são também diferenciados, sendo assim, a Figura 23 representa os perfis cromatográficos das frações pós-DEAE hidrolisando a dinorfina 1-13, em comparação com o veneno total.

Figura 23 - Ação do veneno total e das frações da DEAE sobre dinorfina 1-13. (A) Veneno total; (B) fração F3; (C) fração F5. Os resultados foram obtidos por cromatografia de fase reversa em coluna de C-18 (Restek) no sistema HPLC (Shimadzu).

Para dinorfina 1-13, a fração F3 hidrolisou os substratos da mesma maneira que o veneno total, ocorrendo a liberação de Leu-encefalina (YGGFL). A fração F2 também manteve o perfil de clivagem no HPLC do veneno total, contudo com menor atividade (resultado não mostrado). Para a fração F5, foi possível observar um perfil diferenciado

da hidrólise da Dyn 1-13, onde não há formação de Leu-encefalina (somente YGGFLR// RIRPKLK), mesmo após a hidrólise total do peptídeo. O mesmo padrão de hidrólise obtido com a F5 foi observado nas frações F4 e F6, contudo, com atividades específicas menores (resultados não mostrados).

As frações subsequentes (F7 em diante) não foram capazes de clivar ou hidrolisaram fracamente a dinorfina 1-13 e, por isso, não foram selecionadas para serem purificadas.

As frações provenientes da DEAE (F2 – F5) foram analisadas em SDS-PAGE 13% corado por prata em condições não redutoras. Para tal, foi realizada a retirada de sal e concentração das amostras utilizando membrana de corte molecular de 3 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices), além da dosagem por método de Bradford. O resultado pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 - SDS-PAGE a 13% com coloração por prata das frações do veneno de *T. serrulatus* após a cromatografia de troca iônica. A figura mostra o perfil eletroforético do veneno total (VTs) e das frações F2, F3, F4 e F5, todos em condições não redutoras.

Por conta de apresentarem padrões de clivagem diferentes sobre a dinorfina 1-13 (liberação de Leu-encefalina para F3 ou ausência de formação deste peptídeo por F5), prosseguimos com a purificação de ambas as frações utilizando uma coluna de gel-filtração.

4.6.2.2 Cromatografia de exclusão molecular (Gel-filtração)

As frações F3 e F5 foram fracionadas separadamente utilizando a coluna Diol-300 (Shim-pack) em sistema HPLC (Shimadzu). O perfil cromatográfico de F3 encontra-se na Figura 25.

Figura 25 - Perfil cromatográfico da fração F3 em gel-filtração utilizando a coluna Diol-300 em sistema HPLC (Shimadzu), 214 nm (vermelho) e 280 nm (preto). A amostra foi eluída sob fluxo de 0,5 mL/min utilizando tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, durante 80 minutos.

No caso de F3, foram obtidas seis subfrações após a aplicação da amostra na coluna Diol-300. As frações foram coletadas, concentradas com membrana de corte molecular de 3 kDa, dosadas por método de Bradford e testadas com substrato fluorescente e natural, além de serem analisadas em gel de SDS-PAGE de 13% (Figura 26).

Figura 26 - Resultados das subfrações de F3 obtidas em gel-filtração: (A) *Screening* de atividade das subfrações de F3 pós gel-filtração utilizando o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp (5 μ M); (B) Gel de SDS-PAGE 13%, das frações F3-3 e F3-4, evidenciando a presença de uma banda mais aparente de 24 kDa para F3-4; (C) Ação da fração F3-4 (88 ng) sobre dinorfina 1-13 (2 horas de incubação à 37 °C) em fase reversa C-18.

Para a fração F3, as subfrações que demonstraram maior atividade peptidásica foram F3-3, seguida das F3-4 e F3-2. O perfil eletroforético demonstrou a presença de duas bandas bem evidentes em F3-3 (aproximadamente 24 kDa e 42 kDa), e uma banda de aproximadamente 24 kDa em F3-4. Na análise com o substrato biologicamente ativo, foi demonstrado que F3-4 (88 ng) também foi capaz de clivar a dinorfina 1-13, mimetizando a ação do veneno total (Figura 23), sendo observado consumo total do substrato em 2 horas e formação de Leu-encefalina (YGGFL).

A fração F5, a qual apresentava apenas um ponto de clivagem para a dinorfina 1-13 e ausência de liberação de Leu-encefalina, foi também fracionada em coluna de gel-filtração. O perfil cromatográfico desta amostra está demonstrado na Figura 27.

Figura 27 - Perfil cromatográfico da fração F5 em gel-filtração utilizando a coluna Diol-300 em sistema HPLC (Shimadzu), 214 nm (rosa) e 280 (verde). A amostra foi eluída sob fluxo de 0,5 mL/min utilizando tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato 10 mM, pH 7,0, durante 80 minutos.

Após o fracionamento em coluna de gel-filtração, seis subfrações de F5 (F5-0 a F5-5) foram obtidas. As amostras foram concentradas em membrana de corte molecular de 3 kDa, quantificadas por método Bradford e testadas com os substratos natural e fluorescente específicos. A subfração com maior atividade proteolítica também foi analisada em gel de SDS-PAGE 13% (Figura 28).

Figura 28 - Resultados das subfrações de F5 obtidas em gel-filtração: (A) *Screening* de atividade das subfrações de F5 após a gel-filtração utilizado o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 μ M); (B) Análise em gel de poliacrilamida 13% demonstrando banda única com massa molecular de aproximadamente 25 kDa; (C) A fração F5-1 mostrou-se capaz de clivar a dinorfina 1-13, porém sem liberação de Leu-encefalina.

No caso das subfrações de F5, apenas as subfrações F5-1 e F5-2 foram capazes de clivar o substrato Abz-GFLRRV-EDDnp (Figura 28, Painei A), porém a fração F5-1 foi mais ativa. A dinorfina 1-13 foi clivada por F5-1, não sendo formada Leu-encefalina, assim como esperado (Figura 28, Painei C). Por fim, o gel de poliacrilamida 13% corado por prata demonstrou banda única e intensa, revelando a homogeneidade da amostra (Figura 28, Painei B).

4.6.2.3 Análise de massas e bioinformática

Considerando o exposto acima, as frações F3-4 e F5-1 foram selecionadas para a análise por espectrometria de massas. Para tal, as bandas dos géis de SDS-PAGE foram recortadas e os peptídeos resultantes da digestão trípica foram analisados em espectrômetro de massas Orbitrap do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan. Os resultados foram analisados utilizando o software PEAKS, sendo selecionadas como modificações pós traducionais (PTM) a carbaminometilação de cisteínas (como modificação fixa) e, como variável, a oxidação dos resíduos de metionina e a deamidação de asparagina e glutamina, por conta do tratamento utilizado na extração da banda do gel. O índice de falsas descobertas (False Discovery Rate, FDR) foi ajustado para <0,01%.

A Figura 29 representa o resultado obtido do Peaks DB para a fração F3-4.

Figura 29 - Resultado da banda de F3-4 - Identificação da metaloserrulase 3 de *Tityus serrulatus* por espectrometria de massas e análise em software Peaks DB, com cobertura de 57% da molécula madura. Os peptídeos resultantes da digestão *in gel* da banda de 24 kDa estão marcados em azul e a sequência consenso de metalopeptidases está destacada em vermelho. Em verde, o peptídeo sinal e em roxo a porção do pró-peptídeo. O banco de dados utilizado foi UNIPROT/SwissProt (554.567 sequencias), com restrição taxonômica para Metazoa (*animals*).

Por conta de possuírem atividades diferentes, principalmente com relação à liberação de Leu-encefalina a partir da dinorfina 1-13, as sequências da metalloserrulase 3 e metalloserrulase 4 maduras foram comparadas por alinhamento de sequências primárias utilizando a ferramenta BLAST (Figura 31).

Score		Esperado	Método	Identidade	Similaridade	Gaps																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
128 bits(321)	1e-40	Compositional matrix adjust.		79/237(33%)	123/237(51%)	6/237(2%)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Ms3	1	EDK	C	I	V	V	E	S	L	C	V	T	E	S	R	F	T	R	R	F	K	T	N	Q	A	L	T	E	Y	V	T	L	M	F	T	G	A	Q	N	M	Y	D	T	M	N	L	G	I	K	L	R	L	I	G	V	Q	A	F	A	60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
		ED+C+	++	L	+T+S	F			F			+	+	Y	MF		Q		DT+	L	IK+	LIG	++																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

Figura 31 - Alinhamento em BLAST da metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3 maduras. Sublinhado, a sequência do sítio ativo de metaloproteases, HEXXH. As cisteínas estão marcadas em vermelho.

O alinhamento entre as metalloserrulases 3 e 4 maduras demonstrou uma identidade de 33% e 51% de similaridade. É possível observar também diferença quanto ao número de resíduos de cisteínas nas duas moléculas: enquanto a metalloserrulase 4 tem apenas 8, a metalloserrulase 3 apresenta 10 resíduos (Figura 31), o que pode implicar em diferenças de estrutura tridimensional. Além disso, a metalloserrulase 4 apresenta um motivo metalopeptidase estendido HEXXHXXGXXH, característico da família denominada “metzincinas” (que agrupam enzimas como as ADAMs, adamlisina, astacina, entre outras), enquanto a metalloserrulase 3 apresenta uma pequena modificação neste sítio, possuindo alanina ao invés da glicina conservada. A fim de se verificar se tais modificações estariam influenciando a estrutura terciária destas moléculas, foi realizada uma modelagem teórica preliminar de ambas as peptidases usando a ferramenta Phyre².

Figura 32 - Modelagem molecular teórica preliminar de metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3 usando o software Phyre². Os modelos foram construídos automaticamente pelo software, com confiança de 99% sobre os resíduos e acurácia de >90%. O *template* de maior ranking, baseado na qualidade dos alinhamentos da sequência primária, para ms4 foi ADAM22 (código PDB 3g5c) e para ms3, TNF-alpha converting enzyme (TACE) (código PDB 2i47). Ambos os sítios catalíticos estão marcados em verde (ms4) e rosa (ms3), e a metionina em vermelho. A seta laranja indica a coordenação típica de metzincinas.

Apesar de se tratar de um resultado preliminar, a modelagem molecular teórica demonstra que provavelmente ambas metalloserrulases apresentam conformação típica de “metzincinas”, onde a metionina auxilia na coordenação do zinco, embora a ms3 não apresente o motivo estendido HEXXHXXGXXH. Por outro lado, é possível observar preliminarmente que existem diferenças sutis na estrutura terciária entre estas enzimas. É interessante observar também que a modelagem teórica selecionou por homologia a ADAM22 como *template* de metalloserrulase 4, e TACE (enzima conversora de TNF-alfa) para metalloserrulase 3, ambas enzimas classificadas como metzincinas. Além disso, essa similaridade com metaloproteases humanas podem indicar um papel biológico destas peptidases de veneno de escorpião durante o envenenamento.

4.7 Caracterizações bioquímicas das metalloserrulases 3 e 4

4.7.1 Influência do pH na atividade proteolítica das metalloserrulases 3 e 4

Para a determinação dos pHs ótimos para ms4 e para ms3, as atividades das enzimas foram avaliadas na presença de diferentes valores de pH do tampão de trabalho. A faixa de pH testada foi de 5,0 a 10,0 e os resultados podem ser observados na Figura 33.

Figura 33 - Influência do pH na atividade específica de metalloserrulase 4 (150 ng) e metalloserrulase 3 (88 ng) utilizando o substrato FRET Abz-GFLRRV-EDDnp. Os sais utilizados foram; fosfato de sódio (pH 5,0 – 7,5); bórax-ácido bórico (pH 8,0 – 9,0) e bórax-NaOH (pH 9,5-10). A atividade peptidásica foi monitorada durante 15 minutos. Experimento realizado em triplicata, e velocidades calculadas no software Grafit 5.0. Os gráficos foram construídos no software GraphPad Prism 5.0.

Como é possível observar, a metalloserrulase 4 é ativa entre pH 5,0 e pH 10,0, contudo, a velocidade de hidrólise em meio ácido é inferior, indicando uma preferência de meio alcalino para o melhor funcionamento desta enzima. O pico de maior atividade detectado foi em pH 8,5.

No caso da metalloserrulase 3, a sensibilidade a meios ácidos foi mais expressiva, pois a atividade é próxima ou igual a zero abaixo de pH 6,5. No entanto, em tampões alcalinos (pH 8,0 e pH 8,5) tem-se o pico de maior atividade desta peptidase. Por fim, a atividade proteolítica torna a ser drasticamente reduzida em meios muito alcalinos (pH 10,0).

Comparativamente, pode-se observar que a atividade específica de ms4, sobre o substrato FRET Abz-GFLRRV-EDDnp, é o dobro da atividade de ms3, e que valores mais extremos de pH (mais ácido ou mais alcalino) têm maior influência sobre a atividade de ms3, do que em relação a ms4.

4.7.2 Influência dos sais mono e bivalentes na atividade das metalloserrulases 3 e 4

A avaliação da influência de cátions monovalentes (Li^+ , Na^+ , K^+) e bivalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+}) na atividade enzimática das metalloserrulases purificadas foi determinada em fluorímetro com a adição de cátions na forma de cloreto (50 mM). O tampão bórax

50 mM, pH 8,5 à 37 °C foi utilizado como controle. O monitoramento da atividade foi realizado durante 15 minutos e os resultados estão expressos na Figura 34.

Figura 34 - Estudo da influência de cátions mono e bivalentes na atividade de metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3. Os cátions na forma de cloreto foram adicionados na concentração de 50 mM em tampão bórax 50 mM pH 8,5 para metalloserrulase 4 e bórax 50 mM pH 8,0 para metalloserrulase 3. As atividades proteolíticas sobre o substrato FRET Abz-GFLRRV-EDDnp de metalloserrulase 4 (150 ng) e metalloserrulase 3 (88 ng) foram monitoradas durante 15 minutos a 37 °C. As atividades específicas (µM/µg/min) foram calculadas no software Grafit 5.0 e os gráficos construídos no software GraphPad Prism 5.

De maneira geral, as metalloserrulases são afetadas positivamente por Na^+ e K^+ e negativamente por cátions bivalentes. Contudo, o aumento de atividade na presença de sódio e potássio é menos expressiva na atividade da metalloserrulase 3 do que em comparação com a ms4. A influência do lítio foi mais drástica na redução de atividade de ms3 do que para ms4, ao contrário do cálcio, o qual teve um efeito mais expressivo na diminuição da atividade da metalloserrulase 4 do que da metalloserrulase 3. O magnésio, na concentração utilizada (50 mM) foi capaz de inibir completamente a atividade de ambas as peptidases.

4.7.3 Determinação da temperatura ideal para melhor atividade catalítica das metalloserrulases 3 e 4

O resultado da influência da temperatura sobre a atividade das metalloserrulases está demonstrado na Figura 35.

Figura 35 - Influência da temperatura na atividade de metaloserrulase 4 e metaloserrulase 3. Os testes foram realizados em temperaturas entre 22 °C e 42 °C, em intervalos de 5 °C. As peptidases foram pré-incubadas durante 15 minutos na temperatura desejada antes da adição do substrato FRET Abz-GFLRRV-EDDnp. A atividade proteolítica foi monitorada durante 15 minutos. Experimento realizado em triplicatas, e velocidades calculadas no software Grafit 5.0.

No geral, as metaloserrulases se comportaram da mesma forma diante variações de temperaturas. Ambas possuem pico ótimo de atividade a 32 °C, e foram ativas e estáveis em todas as temperaturas na faixa testada. Em temperatura de 42 °C, contudo, a atividade proteolítica diminuiu cerca de 50%, indicando uma possível desnaturação de ambas as peptidases.

4.7.4 Determinação dos pontos de hidrólise preferenciais nos substrato fluorescentes e nos peptídeos bioativos

O ponto de clivagem do substrato Abz-GFLRRV-EDDnp por metaloserrulase 3 e metaloserrulase 4 foi determinado. A análise foi realizada em cromatografia de fase reversa e posteriormente, por espectrometria de massas em MALDI-TOF. O resultado pode ser observado na figura a seguir.

Figura 36 - Perfil cromatográfico da hidrólise de Abz-GFLRRV-EDDnp por metaloserrulase 3 (ms3) e metaloserrulase 4 (ms4). Em vermelho, o perfil do substrato controle; em

preto, o perfil do incubado do FRET com a enzima ms4; em azul, resultado da clivagem de Abz-GFLRRV-EDDnp por ms3.

Como demonstra a Figura 36, a ms4 hidrolisou o substrato em um único ponto, entre Arg-Arg. Para ms3, dois pontos de clivagem são observados: entre Arg-Arg e entre Leu-Arg. Estes pontos de clivagens correspondem aos obtidos com o substrato natural dinorfina 1-13. É importante destacar que o ponto de clivagem adicional de ms3 permite a liberação da Leu-encefalina a partir da dinorfina 1-13.

A capacidade das metaloserrulases 3 e 4 de hidrolisarem os substratos membros da família do neuropeptídeo Y foi verificada, tendo em vista a alta preferência do veneno total por estas moléculas. A Tabela 08 mostra os fragmentos obtidos por análise de espectrometria de massas.

Tabela 08 - Pontos de clivagem dos neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo YY (PYY) e polipeptídeo pancreático (PP) pela hidrólise de metaloserrulase 4 (↓) e metaloserrulase 3 (↑). Em verde, os pontos de clivagem compartilhados por ambas as peptidases.

Peptídeo	Fragmento
NPY	YPSKP↑D↓NPGED↓A↑PAEDM↓A↓R↓Y↓Y↓S↓A↓L↓R↓H↓Y↓I↓N↓LIT↓R↓Q↓RY-NH ₂
PYY	YPIKPEAPGED↓ASPEEL↓N↓R↓YYASL↓R↓HY↓L↓NLVT↑R↓Q↓RY-NH ₂
PP	APLEPMYP↓G↑D↑Y↑A↑TH↑E↑Q↑RAQ↑YETQL↓R↑R↓Y↑INTLTR↓PRY-NH ₂

A Tabela 08 mostra que o neuropeptídeo Y foi o substrato preferencial para as metaloserrulases testadas, apresentando maior quantidade de pontos de clivagem (17 pontos de clivagem para ms4 e 14 para a ms3) do que em relação aos demais substratos que foram atingidos em 10 pontos de clivagem ou menos. É interessante lembrar que o NPY também foi o melhor substrato para o veneno total, onde mais fragmentos foram formados em relação aos demais (Tabela 02), totalizando 40 produtos de hidrólise. Em adendo, alguns pontos de hidrólise são compartilhados por ambas as metaloserrulases (Tabela 08, realce verde), contudo a maioria dos fragmentos formados é exclusiva de cada uma das peptidases. Além disso, o polipeptídeo pancreático é mais hidrolisado por ms3, no passo que o peptídeo YY apresenta mais pontos de hidrólise na presença de

ms4, indicando certa especificidade destas enzimas. Pode-se dizer também que parte dos fragmentos formados pelo veneno total (Tabela 02) é produto de hidrólise das metalloserrulases 3 e 4, contudo um maior número de pontos de clivagem foram formados pelo VTs. Por fim, o resultado demonstra a ausência do C-terminal amidado nos fragmentos formados por ambas as metalloserrulases, assim como constatado para o veneno total.

A partir da obtenção dos fragmentos, foi possível realizar o estudo dos sítios preferenciais de clivagem das metalloserrulases 3 e 4 (Figura 37).

Figura 37 - Estudo dos sítios preferências dos substratos clivados por metalloserrulase 4 e metalloserrulase 3 com auxílio do software IcelLogo (COLAERT et al., 2009).

Como mostrado acima, pode-se dizer que ambas as metalloserrulases apresentam grande preferência para a hidrólise de substratos que possuem resíduos de arginina e tirosina, independente de seu posicionamento na sequência clivada. No entanto, segundo dados obtidos pelo software IcelLogo (Figura 37, *conservation line*), a ms4 mostra preferência para a hidrólise de substratos contendo arginina na posição P1, enquanto a ms3 possui maior especificidade para a hidrólise de substratos que apresentam o resíduo de arginina na posição P1'. Em ambos os casos, o resíduo de arginina é detectados nestas respectivas posições com três vezes mais frequência do que

em relação aos outros aminoácidos. Adicionalmente, a metalloserrulase 3, além da preferência para a hidrólise de substratos contendo Arg e Tyr, pode apresentar especificidade por glutamina (Q) na posição P1.

4.7.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da metalloserrulase 4

A determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e catalítica (k_{cat}) para a hidrólise de substratos análogos a dinorfina 1-13 (Abz-GFLRRV-EDDnp, Abz-GFLRR-EDDnp; e Abz-FLRRV-EDDnp) pela metalloserrulase 4 foi realizada, e estão demonstradas na Tabela 09. Como a metalloserrulase 3 apresentou dois pontos de clivagem no substrato Abz-GFLRRV-EDDnp (Figura 36), não foi possível a determinação de suas constantes catalíticas.

Tabela 09 - Determinação das constantes cinéticas da metalloserrulase 4 purificada em pH ideal. Os valores de K_m e k_{cat} foram obtidos no software Grafit 5.0.

Substrato	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)
Abz-GFLRRV-EDDnp	$16,2 \pm 6,3$	$491,67 \pm 59,0$	29,62
Abz-GFLRR-EDDnp	$36,6 \pm 6,8$	$170,83 \pm 8,5$	4,67
Abz-FLRRV-EDDnp	$28,1 \pm 2,6$	$1108,33 \pm 33,2$	39,44
Abz-FLRRV-EDDnp PBS pH 7,4	$14,49 \pm 5,9$	$170,83 \pm 16,6$	11,79

Segundo dados obtidos para a metalloserrulase 4, apesar do substrato Abz-GFLRRV-EDDnp apresentar o menor K_m (16,2 μM), o substrato Abz-FLRRV-EDDnp ($K_m=28,1$ μM), mostrou cerca de 1,5 vezes maior constante de especificidade (k_{cat}/K_m) em pH 8,5, por conta do alto valor de k_{cat} apresentado para a hidrólise deste último substrato. Contudo, em meio neutro a constante de especificidade para o substrato Abz-FLRRV-EDDnp reduz em três vezes, pois apesar do K_m ter uma grande melhora (redução de 50%), o valor de k_{cat} foi seis vezes inferior ao obtido em pH ideal. O aminoácido Valina em C-terminal mostrou-se um fator importante na interação com o substrato com esta enzima, pois a constante de especificidade da ms4 sobre o substrato Abz-GFLRR-EDDnp foi reduzida, apresentando o mais alto valor de K_m e mais baixo k_{cat} dentre os substratos testados neste pH.

4.8 Ensaio de inibição da atividade das metaloserrulases pelos antivenenos comerciais

Tendo em vista que o presente trabalho visa avaliar o potencial de soroneutralização das peptidases isoladas de *T. serrulatus*, o ensaio de inibição de atividade de ms4 e ms3 pelos soros comerciais foi realizado. O resultado encontra-se demonstrado na Figura 38.

Figura 38 - Ensaio de inibição por soroneutralização utilizando o substrato Abz-FLRRV-EDDnp e as peptidases isoladas (A) metaloserrulase 4 (100 ng) e (B) metaloserrulase 3 (88 ng) em tampão PBS pH 7,4. O veneno foi previamente incubado sem substrato durante 30 minutos 37 °C, com sete concentrações (relação massa veneno/massa antiveneno): 1:10; 1:25; 1:50; 1:100 ; 1:200; 1:500 e 1:1000 e as velocidades de hidrólise foram comparadas ao controle (sem antiveneno). O resultado é relativo à média de três experimentos independentes com erro padrão e expressa a porcentagem de inibição da atividade proteolítica (%). SAE= soro antiescorpiônico e SAAR= soro antiaracnídico.

O ensaio de inibição por soroneutralização demonstrou efetividade em baixas quantidades de antiveneno (1:10). Para ms3, a neutralização por SAAR foi observada em doses menores do que em reação à SAE, assim como observado com o veneno total (Figura 08). Por outro lado, ms4 apresentou, no geral, uma melhor soroneutralização por SAE, mostrando eficiência acima de 50% quando a dose 10 vezes superior ao veneno foi utilizada (1:10). Para ambas, no geral, foi possível observar aumento da inibição com o incremento da quantidade de antiveneno, e a soroneutralização total foi atingida na dose de 1:500 para ambas as peptidases.

5 DISCUSSÃO

Os venenos animais são formados por uma mistura de toxinas de diversas naturezas, com diferentes ações biológicas, sendo fonte de obtenção de moléculas bioativas. Dentre essas moléculas, as peptidases estão presentes em venenos de diversos organismos, o que indica a importância destas moléculas para sua sobrevivência. Para exemplificar, um estudo comparativo com várias espécies animais, incluindo serpentes, anfíbios, lagartos e artrópodes (aranhas, escorpiões, formigas e abelhas) foi capaz de detectar atividade peptidásica no veneno de todos os seres testados, contudo com diferentes graus de atividade (TAN; PONNUDURAI, 1992). Mesmo assim, é importante lembrar que as peptidases, assim como os hormônios, exercem suas funções em concentrações baixas nos fluidos fisiológicos, não sendo necessárias, portanto, grandes quantidades dessas moléculas para que seus efeitos sejam observados.

Diferentemente das serpentes, os venenos de artrópodes são pouco estudados quanto aos seus componentes proteolíticos, apresentando um maior foco nos componentes ativos em tecidos excitáveis, como as neurotoxinas. Tal fato pode ser explicado pela ausência de efeitos conhecidos de peptidases no envenenamento ou até mesmo pela dificuldade de obtenção de quantidades ideais desses venenos para o isolamento de tais moléculas. Felizmente, as técnicas “ômicas” (proteômicas e transcriptômicas) têm recentemente auxiliado no estudo de peptidases nos venenos desses aracnídeos (ALMEIDA et al., 2012; ALVARENGA et al., 2012; MORGENSTERN et al., 2011). Particularmente, estudos transcriptômicos têm demonstrado que as peptidases são os componentes mais abundantes em alguns venenos de escorpião, como em *T. bahiensis*, representando 36% dos transcritos deste veneno (DE OLIVEIRA et al., 2015).

O aumento do interesse pelos acidentes ocasionados por escorpiões no âmbito da saúde pública é reflexo do crescimento da ocorrência destes acidentes. Desta maneira, o conhecimento sobre os componentes do veneno e seus mecanismos de ação torna-se extremamente relevante. Além disso, também é importante o conhecimento do potencial neutralizante dos antivenenos comerciais frente a novas toxinas, uma vez que seu uso é o tratamento utilizado e recomendado pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

5.1 Estudos com o veneno total para *screening* de atividades relevantes

Neste trabalho, foi possível observar a clivagem de peptídeos que possuem papel importante na fisiologia de mamíferos: família do neuropeptídeo Y, hemopressina, angiotensina I e bradicinina.

Apesar de serem agrupados na mesma família por conta de sequência, estrutura tridimensional e receptores semelhantes, os membros da família do neuropeptídeo Y apresentam funções diferenciadas. O neuropeptídeo Y é encontrado abundantemente no sistema nervoso e participa de diversos processos, como vasoconstrição (induzido por noradrenalina), ação antiepilética, redução de estresse e ansiedade, redução de percepção da dor. O peptídeo YY é encontrado principalmente no intestino, auxiliando no controle de apetite e aumentando a absorção de água e de eletrólitos no colón, além de suprimir a secreção pancreática. Por sua vez, o polipeptídeo pancreático tem papel importante na regulação de secreções pancreáticas (CONLON, 2002; GRUNDEMAR; HÅKANSON, 1990). A hemopressina, substrato para as peptidases do veneno, é uma molécula encontrada no sistema nervoso central, que auxilia na redução da sensibilidade dor e na regulação da pressão arterial (DALE et al., 2005). A angiotensina I e bradicinina são importantes para o controle de pressão arterial, sendo moléculas chave em dois sistemas conhecidos como Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA) e Caliceína-Cinina, respectivamente. Assim, alguns sintomas observados durante o envenenamento podem estar relacionados com a destruição ou a manutenção dessas moléculas pela ação de peptidases e, por este motivo, foram escolhidas para serem estudadas enquanto substratos para o VTs.

A clivagem de dinorfina 1-13 pelo VTs já foi caracterizada por nosso grupo em trabalhos prévios (VENANCIO et al., 2013). Brevemente, a dinorfina 1-13 é um neuropeptídeo opióide endógeno com efeito nociceptivo 100 vezes superior ao da morfina, e a inativação desta molécula pelo VTs pode estar parcialmente relacionada com a intensa dor relatada pelos pacientes. Além disso, a Leu-enkefalina, produto da hidrólise de dinorfina 1-13, dentre outras funções, pode causar entrada de correntes de potássio em neurônios da região centro respiratória, ocasionando uma hiperpolarização das membranas e resultando em uma ação inibitória na atividade dos neurônios (INYUSHKIN, 2007). Portanto, uma das possíveis consequências da ação de peptidases do veneno total seria a interação com canais iônicos por ação indireta. Por fim, é importante dizer que a dinorfina 1-13 não é o precursor natural deste pentapeptídeo, que endogenamente é formado a partir da pró-enkefalina pela ação de convertases

(SALZET, 2001). Assim, o veneno do *T. serrulatus* é capaz de inativar *in vitro* um neuropeptídeo (dinorfina 1-13), com formação de outro neuropeptídeo (Leu-encefalina), com consequências *in vivo* ainda desconhecidas.

Nos peptídeos que se comportaram como melhores substratos para o veneno, ou seja, os componentes da família do neuropeptídeo Y (polipeptídeo pancreático e peptídeo YY), verificamos que a remoção da tirosina amidada ($Y_{36}-NH_2$) foi uma modificação constantemente observada nos fragmentos próximos ao C-terminal da molécula. A amidação presente no carboxiterminal é considerada de extrema importância para os peptídeos da família do NPY, sendo responsável pela ligação dessas moléculas em seus receptores. A remoção da tirosina amidada, portanto, causaria perda da atividade *in vivo* destes peptídeos (GRUNDEMAR et al., 1990).

Em particular, é relevante apontar que a queda de níveis de neuropeptídeo Y e de polipeptídeo pancreático têm consequências fisiológicas já descritas e que podem ter relação com sintomas do envenenamento. Estudos demonstram que a queda de NPY circulante pode estar relacionada com alterações comportamentais, tais como ansiedade e depressão (SERAFINI et al., 2013). Sendo assim, possivelmente algumas das desordens neurológicas observadas nos envenenados por *T. serrulatus* (COLOGNA et al., 2009), tais como agitação e confusão mental, podem estar associadas à degradação ou inativação de NPY, juntamente com a ação das neurotoxinas e/ou outras moléculas.

Por outro lado, alterações de PP geralmente estão relacionadas a desordens patológicas como obesidade e pancreatite (TISCORNIA et al., 2015). Em especial, pacientes com pancreatite crônica associada ao alcoolismo têm concentrações de PP significativamente mais baixas quando comparadas com humanos saudáveis, tanto em níveis basais quanto após a ingestão de alimentos (PIERAMICO et al., 1995). Levando isso em conta, é possível que a inativação deste peptídeo pelo VTs contribua com a disfunção exócrina do pâncreas em pacientes envenenados. Apesar da pancreatite não ser um sintoma comum para o envenenamento por *Tityus serrulatus*, esta complicação já foi reportada como consequência do envenenamento por vários escorpiões, incluindo do gênero *Tityus* (*Tityus trinitatis*) (ORTIZ et al., 2014). Além disso, estudos demonstraram que o VTs é capaz de alterar *in vitro* a descarga exócrina do pâncreas, podendo tanto estimular quanto inibir dependendo da dose, metodologia ou mecanismo estudado (FLETCHER et al., 1994; FLETCHER et al., 2010). Curiosamente, alguns autores sugerem que esses efeitos do veneno sobre a secreção pancreática não são somente causados por neurotoxinas, mas também por ação sinérgica com outras

moléculas presentes no veneno (ORTIZ et al., 2014). Em conclusão, pode-se dizer que os efeitos do veneno sobre a secreção pancreática podem ter relação com a inativação do polipeptídeo pancreático.

Apesar de não possuírem atividade similar à molécula original, os fragmentos gerados pela hidrólise dos peptídeos da família do NPY pelo VTs podem ser ativos em outros sistemas ainda não relacionados, como o que provavelmente ocorre durante a clivagem de dinorfina pelo VTs com a liberação de Leu-encefalina, que é um fragmento ativo. Em adendo, a observação dos fragmentos formados permitiu a clara observação de endo e exopeptidases no veneno do escorpião amarelo. É interessante notar que, com o estudo de especificidade das peptidases (ms3 e ms4) purificadas, fica claro que a remoção das tirosinas é devido a grande preferência das metalloserrulases por este aminoácido, independentemente de sua posição na sequência do substrato. Tal fato reforça a importância de estudos bioquímicos de tais moléculas para a compreensão dos mecanismos de ação do veneno.

Os peptídeos angiotensina I e bradicinina também foram clivados pelo VTs, ocorrendo a formação de Ang II, Ang III, Ang 1-7 e a inativação de bradicinina. Em relação aos aspectos fisiológicos, a Ang II e Ang III contribuem para o aumento da pressão sanguínea, pois ambas são capazes de ligar nos receptores de Ang II (MARC; LLORENS-CORTES, 2011; REAUX et al., 2001), estimulando a vasoconstrição. Além disso, observamos a inativação da bradicinina por amino- e carboxipeptidase(s) presentes no VTs, sendo que esta degradação também pode contribuir para efeitos hipertensivos do veneno. Por outro lado, a Ang 1-7 não se liga a receptores de Ang II, mas sim ao receptor denominado “Mas”, com isso promovendo vasodilatação e levando a hipotensão arterial (FERRARIO, 2006). Assim, a formação de Ang II/Ang III pelo VTs contrastaria à atividade hipotensiva de Ang 1-7. Contudo, tal paradigma corrobora com os efeitos do envenenamento na vítima, uma vez que a hipertensão é seguida de uma intensa hipotensão (BUCARETCHI et al., 2014) podendo, em partes, ser explicada pela formação destes peptídeos pela ação peptidásica do veneno total. Por fim, apesar de claramente mais de uma enzima atuar na clivagem destes substratos no veneno total, é possível estabelecer uma relação de atividade típica de enzima conversora de angiotensina I (ACE), a qual forma Ang II e inativa BK pela remoção de dois aminoácidos a partir do carboxiterminal dos peptídeos.

Além dos substratos biologicamente ativos, foram utilizados substratos fluorescentes para mensurar a atividade proteolítica do veneno total. Para isso, foram

selecionados substratos com diferentes propriedades – Abz-GFLRRV-EDDnp para endopeptidases e Abz-FRK(Dnp)P-OH para carboxipeptidases, uma vez que a prolina carboxiterminal encontra-se livre (sem ligação direta do grupo apagador), permitindo a interação com este tipo de exopeptidase. Além disso, este substrato foi construído especificamente para estudos com a enzima conversora de angiotensina I ou ACE (ARAÚJO et al., 2000).

Apesar de se tratarem de metalopeptidases, igualmente inibidas pelo EDTA, o uso de inibidores mais seletivos forneceu informações relevantes sobre os tipos de enzimas que agem em cada um dos substratos fluorescentes. O captopril é um inibidor que apresenta seletividade para a ACE, sendo utilizado como fármaco para tratamento da hipertensão humana. O captopril é capaz de inibir outras enzimas relacionadas à ACE como, por exemplo, as ACE-likes presentes na mosca *Drosophila*, Dcp ($K_i = 3$ nM) e Ance ($K_i = 11$ nM) (RAWLINGS et al., 2014). Além do captopril, o Bj-PRO-10c foi utilizado, sendo este um peptídeo típico inibidor de ACE. De fato, o desenvolvimento do captopril foi baseado na sequência primária dos PROs, **P**roline **R**ich **O**ligopeptides, também conhecidos como peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs). Estes peptídeos foram inicialmente purificados de venenos de serpentes, mas já foram descritos em venenos e secreções de diversos animais peçonhentos (VERANO-BRAGA et al., 2009). Com isso, por conta de bons valores de inibição do Bj-PRO-10c e do captopril sobre a hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH pelo VTs, foi possível dizer que o veneno apresenta uma atividade ACE-like.

O fosforamidon foi capaz de inibir fracamente a hidrólise de ambos os substratos fluorescentes testados. Apesar de ser capaz de afetar a hidrólise de enzimas das famílias M4 e M3 das metalopeptidases, este inibidor apresenta melhores constantes de inibição para a neprilisina ($K_i = 43$ nM) e ECE (Enzima Conversora de Endotelina, $K_i = 3,5$ μ M) do que para a ACE ($K_i = 74$ μ M). Por outro lado, o tiorfan é descrito como um forte inibidor seletivo para a neprilisina ($K_i = 4,7$ nM), apresentando valores menos significativos para ACE ($K_i = 150$ nM) (RAWLINGS et al., 2014). O peptídeo [des-Arg¹]-proctolin, por outro lado, é um peptídeo presente no VTs que mostrou seletividade para a inibição da neprilisina (0,94 μ M), e não é capaz de inibir a ACE (DUZZI et al., 2016). Assim, as baixas porcentagens de inibição por fosforamidon, tiorfan e [des-Arg¹]-proctolin (todas inferiores a 15%) provavelmente estão atribuídas à fraca seletividade destes inibidores sobre enzimas tipo conversoras de angiotensina I, e à pequena concentração utilizada (10 μ M) que se distancia das constantes de inibição

descritas para ACE (RAWLINGS et al., 2014). Por fim, esses resultados indicam que o veneno do *T. serrulatus* não apresenta enzimas do tipo NEP e ECE-I agindo nesse substrato.

Além de inibir a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH, o captopril também mostrou ser capaz de modular seletivamente a clivagem pelo VTs de peptídeos biologicamente ativo relacionados à ACE – angiotensina I, bradicinina e hemopressina. A dinorfina 1-13, utilizada como controle negativo, não teve sua clivagem afetada nas duas concentrações de captopril utilizadas, demonstrando a ação de diferentes enzimas nesses substratos, assim como o observado com os substratos fluorescentes. Apesar de terem sido testadas duas concentrações de captopril, 100 nM e 1 μ M, não foi possível obter inibição total da atividade do veneno sobre esses substratos, pois outras peptidases que atuam nesses substratos não são afetadas por esse inibidor. No caso da hemopressina, foi observado que o fragmento com sequência PVNFKFL, correspondente à ação da ACE humana sobre a hemopressina (BLAIS et al., 2005), não é formado na presença do captopril, o que mais uma vez indica a presença de uma ACE-like no VTs. Em adição, os demais fragmentos PVNFK e FLSH são formados por outra(s) peptidase(s) que não é (são) inibida(s) pelo captopril, mas ao mesmo tempo apresenta(m) ausência de atividade na presença de EDTA.

No caso da bradicinina, aparentemente menos enzimas atuam sobre este substrato, uma vez que somente são formados fragmentos relacionados à atividade ACE humana - BK₁₋₅ e BK₁₋₇ (CAMARGO et al., 2012), além do fragmento BK₃₋₉ provavelmente gerado pela ação de uma aminopeptidase que não é afetada pela presença de captopril, o que pode explicar não ter sido atingido 100% de inibição na concentração de 1 μ M de captopril.

A ativação por íons de cloreto sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina é bem conhecida (YATES et al., 2014). Em ensaio comparativo, foi demonstrado que a hidrólise de Abz-FRK(Dnp)P-OH pelo veneno total também é aumentada com o incremento de NaCl, sendo esta outra evidência da presença de uma enzima conversora de angiotensina I-like neste veneno.

Neste trabalho também avaliamos a capacidade neutralizante dos antivenenos comerciais do Instituto Butantan – antiaracnídio (SAAr) e antiescorpiônico (SAE) - sobre a atividade peptidásica do VTs. Em ambos os casos, foi observada uma inibição parcial da atividade peptidásica do VTs tanto nas hidrólises dos substratos fluorescentes

quanto nas hidrólises de peptídeos biologicamente ativos quando analisadas nas mesmas concentrações de antiveneno (1:50 e 1:100). Além disso, foram observadas diferenças na curva de inibição por soroneutralização entre endopeptidases (Abz-GFLRRV-EDDnp) e exopeptidases (Abz-FRK(Dnp)P-OH). Para o substrato FRET das endopeptidases, a inibição pelo SAAr foi superior a de SAE, sendo necessário uma maior dose de SAE para iniciar a soroneutralização de 1 µg de veneno, tendo-se obtido a inibição total na maior dose (1:1000). No caso da atividade de serACE-like, o bloqueio iniciou-se logo na primeira dose de SAE, provavelmente por conta da maior porcentagem de veneno de *T. serrulatus* utilizado na imunização de cavalos (pool de imunização composto por 100% de veneno de *T. serrulatus*) em relação ao SAAr (cujo o pool de imunização é composto por 57% de veneno de *T. serrulatus*). Apesar disso, na maior dose a inibição da atividade carboxipeptidásica foi próxima a 100% para ambos os antivenenos.

Para a hidrólise dos substratos biologicamente ativos, na maioria dos peptídeos foi observada uma inibição dose-resposta pelo uso dos antivenenos, com exceção da hemopressina. Novamente, as diferenças de inibição por soroneutralização, principalmente no caso da hemopressina, são explicadas pela presença de diferentes enzimas aminopeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases no veneno total, as quais devem possuir diferentes afinidades pelos anticorpos presentes nos antídotos comerciais. Neste caso, o SAAr apresenta melhor poder de inibição do que o SAE também para a hidrólise de substratos biologicamente ativos.

Por fim, a diferença de efeito bloqueador dos dois antivenenos sobre as peptidases provavelmente é devido à concentração de veneno do escorpião amarelo utilizado na imunização dos cavalos para a preparação dos soros: SAE é composto pelos venenos de *T. serrulatus* (100%) e SAAr por *T. serrulatus* (57%), *Phoneutria nigriventer* (21,5%) e *Loxosceles gaucho* (21,5%). Por outro lado, em termos de reconhecimento antígeno-anticorpo, nosso grupo demonstrou em trabalho anterior que o soro antiescorpiônico apresenta melhor título e melhor reconhecimento em análises de western blot em relação ao soro antiaracnídeo para veneno total de *Tityus serrulatus* (VENANCIO et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde e o Ministério da Saúde preconizam que o uso de antivenenos é, indiscutivelmente, o tratamento mais apropriado para acidentes com animais peçonhentos. Porém, apesar de trabalhos com antivenenos brasileiros comprovarem a eficácia de soros antiescorpiônicos/aracnídeos (DE REZENDE et al.,

1996), outros países continuam avaliando os benefícios de seu uso para o tratamento de ferroadas de escorpião. Em estudos clínicos no Egito e na Tunísia, por exemplo, diferenças significativas não foram observadas no prognóstico de pacientes que receberam antiveneno com aqueles não foram tratados por soroterapia (ABROUG et al., 1999; SOFER et al., 1994). Foi demonstrado também que a dose de antiveneno deve ser muito superior as do veneno injetado pelo animal em pacientes envenenados por escorpiões na Arábia Saudita (ISMAIL, 1995). Tal fato pode estar atrelado ao método de produção do antiveneno, o que pode requerer uma maior dose necessária para a inibição da soroneutralização, acarretando em uma maior probabilidade do desenvolvimento de reações adversas aos pacientes, que podem causar urticária, calafrios, tosse, náusea e, nos casos mais severos, reações anafiláticas. Por fim, é interessante pensar que a potência do veneno varia entre as espécies de escorpiões e, como o escorpião brasileiro apresenta alta toxicidade, o uso do antiveneno é indispensável.

5.2 Purificação da Enzima Conversora de Angiotensina I do veneno de *Tityus serrulatus*

A purificação das peptidases iniciou-se pela busca da molécula responsável pela atividade similar a ACE humana. A primeira etapa escolhida foi a troca aniônica e dentre as onze frações obtidas, a fração F1 foi a única capaz de formar o fragmento PVNFKFL e Angiotensina II, os quais são descritos como produtos de hidrólise da ACE humana (BLAIS et al., 2005). Por conta disso, a fração F1 foi selecionada para a etapa seguinte de purificação, a gel-filtração, a qual foi capaz de separar as moléculas de baixa massa do VTs entre outros contaminantes presentes na F1. Na etapa seguinte de purificação, foi levado em conta que a fração F1 era composta por moléculas que não interagiram com a coluna aniônica e, por conta disso, a fração ativa proveniente da gel-filtração foi fracionada em coluna de troca catiônica, obtendo-se uma subfração com atividade sobre Abz-FRK(Dnp)P-OH e novamente capaz formar de angiotensina II a partir de angiotensina I. O perfil eletroforético demonstrou uma banda única próxima a 70 kDa, a qual foi analisada em espectrometria de massas, comprovando a purificação da peptidase.

Uma sequência transcrita de ACE foi encontrada na glândula de veneno de *T. bahiensis* (DE OLIVEIRA et al., 2015) e, mais recentemente, nas glândulas de *T. serrulatus* e *T. obscurus* (de Oliveira, comunicação pessoal), este último com duas sequências. Sendo assim, essas quatro sequências foram adicionadas ao banco de dados

obtido no UNIPROT/Swissprot para a análise dos resultados obtidos por espectrometria de massas. Os peptídeos provenientes da digestão trípica da banda de 70 kDa foram identificados como provenientes da enzima conversora de angiotensina I de *Tityus serrulatus*, sendo detectados dois peptídeos únicos.

Funcionalmente, peptidases com atividade ACE-like foram descritas no veneno de alguns animais como em *Conus* (SAFAVI-HEMAMI et al., 2013), na vespa endoparasita (DANI et al., 2003) e no peixe brasileiro Niquim (TENÓRIO et al., 2015) sendo demonstrado o processamento de angiotensina I em angiotensina II por essas moléculas e suas inibições pelo captopril. Apesar de até o presente momento estas peptidases não terem sido isoladas, no caso de *Conus*, a sequência primária foi obtida por análise transcriptômica e indicam similaridade com a ACE humana, com tamanho de aproximadamente 170 kDa (SAFAVI-HEMAMI et al., 2013). Sendo assim, esta é a primeira vez que uma ACE é purificada a partir de um veneno animal e, por conta disso, foi denominada como serACE-like.

A partir do alinhamento das sequências de ACEs preditas do gênero *Tityus* e a ACE testicular de *Homo sapiens*, é possível notar a conservação de várias regiões, em especial, cisteínas localizadas na mesma posição e o sítio catalítico com aminoácidos idênticos (HEMGH), o que é um forte indício para uma atividade similar. Além disso, essas proteínas apresentam massas moleculares preditas aproximadas (BLAIS et al., 2005; LEMEIRE et al., 2008) e que corroboram com a banda de aproximadamente 70 kDa da peptidase purificada obtida no presente trabalho. Curiosamente, é descrito na literatura que todas as enzimas conversoras de angiotensina I em invertebrados são mais aproximadas com a ACE testicular humana por possuírem apenas um sítio de ligação com o zinco, diferentemente do observado na ACE somática, a qual apresenta dois sítios (N e C) e, conseqüentemente, maior massa molecular, de 170 kDa (BERNSTEIN et al., 2013).

A função da serACE-like no VTs é incerta. Devido a sua seletividade, a atividade desta peptidase pode estar atrelada ao processamento de peptídeos da peçonha, tendo em vista que já foi demonstrada a importância de enzimas na composição peptídica endógena em venenos animais (TASHIMA et al., 2012; VERANO-BRAGA et al., 2013). A segunda hipótese baseia-se na função do veneno para a captura e paralização da presa, considerando a presença recorrente de ACEs em invertebrados, especialmente em insetos, estando relacionadas com processos fisiológicos como reprodução, função cardíaca e processamento de neuropeptídeos (HARRISON;

ACHARYA, 2014; ISAAC et al., 1998; LEMEIRE et al., 2008). Apesar do fato destas enzimas serem capazes de clivar angiotensina I e bradicinina, é pertinente lembrar que esses peptídeos não estão presentes em insetos, e provavelmente os alvos moleculares nas presas são diferentes (ISAAC et al., 1998).

Por fim, o envolvimento desta carboxipeptidase durante o envenenamento não pode ser excluído, principalmente pelo fato da hipertensão ser frequentemente observada em envenenados por *Tityus* spp (BUCARETCHI et al., 2014). A formação de Ang II e Ang III, juntamente com as catecolaminas podem contribuir para esse sintoma. Além disso, trabalhos demonstram que envenenados por escorpiões da família Buthidae apresentam aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona provavelmente por elevações de Ang II (BAWASKAR; BAWASKAR, 2012; MURTHY; VAKIL, 1988), sendo que esse peptídeo é capaz de estimular a liberação de catecolaminas (DIZ, 2014). Em estudo com crianças envenenadas por escorpiões no Egito, foi mostrada correlação entre a severidade de pacientes com quadro hipertensivo com o aumento dos níveis de angiotensina II, atividade de ACE, catecolaminas e NO (EL-DEEK et al., 2017). Ainda, em ratos envenenados pelo escorpião *Androctonus australis hector*, também da família Buthidae, foi observada a influência da elevação de níveis de angiotensina II na inflamação cardíaca induzida pelo veneno, sendo que este sintoma é atenuado pelo uso de captopril (SIFI et al., 2017). Por conta do exposto, existem indícios de que provavelmente a serACE-like pode estar contribuindo sinergicamente com outras toxinas na hipertensão desenvolvida durante o envenenamento em humanos. Por último, é interessante pensar que a serACE-like possivelmente tenha ação tanto em insetos quanto em mamíferos. Isso se deve provavelmente por conta de certos alvos moleculares presentes em ambos os animais terem sido preservados durante evolução, mesmo que possuam funções diferentes nesses animais. Tal fato pode explicar alta toxicidade da peçonha de *T.serrulatus* em mamíferos, mesmo que estes não sejam fonte de alimento dos escorpiões.

A serACE-like teve seus parâmetros cinéticos e bioquímicos determinados. O K_m estabelecido para a hidrólise de Abz-FRK(Dnp)P-OH para serACE-like ($K_m = 20 \mu\text{M}$) foi cerca de cinco vezes superior ao obtido para a enzima conversora de angiotensina I humana somática ($4 \mu\text{M}$) (ARAUJO et al., 2000), e ACE purificada de brânquias de caranguejo ($5,5 \mu\text{M}$) (BERSANETTI et al., 2015) utilizando o mesmo substrato. Por outro lado, no trabalho de Araujo e colaboradores (2000) foram determinados valores cinéticos para os sítios de ACE isolados (N e C). Embora seja

descrito que as ACEs de artrópodes se assemelham mais ao sítio C da enzima somática devido ao peso molecular, a comparação dos resultados com ambos os sítios também é válida. Em termos de k_{cat} , o valor obtido no presente trabalho ($76,9 \text{ s}^{-1}$) foi superior ao estabelecido para o sítio C (69 s^{-1}) e para o sítio N ($59,9 \text{ s}^{-1}$) na hidrólise de Abz-FRK(Dnp)P-OH (ARAUJO et al., 2000). Apesar da constante de especificidade da ACE somática natural ($52,5 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$) sobre este FRET ser em torno de 13 vezes superior ao obtido para a serACE-like ($3,8 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$), a peptidase isolada neste trabalho apresenta maior proximidade com o valor obtido para o sítio N ($17 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$) da ACE somática, pois sua eficiência catalítica é duas vezes mais baixa do que a natural e um pouco inferior ao determinado para o sítio C ($25 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$). Por fim, essa divergência de valores pode, em parte, ser explicada pelas características individuais de cada enzima, e pela distância evolutiva destes animais, sendo que seria muito mais interessante a comparação de valores cinéticos com outras enzimas purificadas a partir de outros aracnídeos.

Com relação ao pH, o valor ótimo de atividade foi obtido em pH 8,0, se aproximado aos valores ideais para as medidas de atividade das metaloserrulases 3 e 4, indicando ser uma tendência para a atividade catalítica de metalopeptidases do VTs em meios alcalinos. É significativo apontar que este dado assemelha-se ao ótimo de pH obtido para a ACE somática (ARAUJO et al., 2000) durante a clivagem de Abz-FRK(Dnp)P-OH, e também para a ACE testicular de rato, onde seu pico de atividade foi obtido em pH 8,0 na clivagem de Z-Phe-His-Leu (HOHLBRUGGER et al., 1982), corroborando assim com os dados obtidos.

A atividade de serACE-like também foi avaliada em diferentes temperaturas no intervalo entre 22°C e 42°C , sendo que não foi observado um pico ótimo pois as velocidades obtidas se mantiveram constantes. Não foram encontrados estudos de temperatura e atividade hidrolítica com ACEs purificadas de artrópodes, contudo as ACE-like de vertebrados são ativas na faixa testada, sendo que os picos ótimos de atividade encontram-se geralmente em 37°C (BERSANETTI et al., 2015; HOHLBRUGGER et al., 1982). Por fim, essa estabilidade térmica pode sugerir uma importância desta molécula para o veneno, pois sua atividade peptidásica não seria afetada pela temperatura, permitindo sua funcionalidade na glândula, durante sua alimentação ou ainda no envenenamento.

5.3 Purificação das metalloserrulases: diferenciação funcional e estrutural

Dando prosseguimento à purificação das endopeptidases do veneno de *Tityus serrulatus*, a cromatografia de troca iônica seguida de gel-filtração permitiu a obtenção de duas peptidases com diferentes ações sobre dinorfina 1-13 e de seu análogo fluorescente (Abz-GFLRRV-EDDnp) específico, utilizadas para o *screening* de atividade. O sequenciamento de peptídeos trípticos forneceu uma grande cobertura destas moléculas, sendo identificadas como metalloserrulase 3 e 4.

As metalloserrulases foram descritas em 2014 por Carmo e colegas, sendo detectadas em estudos de transcriptoma da glândula do escorpião *Tityus serrulatus*. Foram encontrados dez clones, sendo que a metalloserrulase 3 apresentou uma das maiores porcentagens de similaridade com a antarease (cerca de 47%). A maioria das cisteínas encontradas nas sequências estava localizada de forma conservada, contudo as metalloserrulases 1, 2, 3, 6, 7, e 9 possuem um par de cisteína extra, o que os autores acreditam não afetar a conformação estrutural. Além disso, na árvore filogenética, as metalloserrulases 3 e 4 apresentam certa distância, sendo grupos parafiléticos (CARMO et al., 2014). Segundo os autores, os tamanhos preditos na forma ativa para a metalloserrulases 3 e 4 são 22 kDa e 26 kDa, respectivamente.

A purificação de duas metalloserrulases no veneno de *T. serrulatus* que se diferenciam por atividade enzimática é inédita na literatura. Até o presente momento, somente a metalopeptidase denominada antarease foi purificada em venenos de *Tityus*, a qual foi relacionada com a pancreatite em pacientes envenenados por clivar proteínas que participam do transporte de vesículas, as VAMP (FLETCHER et al., 2010). Diferentemente do observado por Fletcher et al (2010), recentemente Zornetta e colaboradores demonstraram que a antarease recombinante não foi capaz de clivar as VAMPs em condições fisiológicas de pH e temperatura (ZORNETTA et al., 2017). Por outro lado, a antarease recombinante ativa causou neuroparalisia na junção neuromuscular de ratos e de mosca (*D. melanogaster*) por clivagem de proteínas na superfície da membrana pré-sináptica, impedindo a neuroexocitose, sendo que a mutante inativa não obteve o mesmo efeito (ZORNETTA et al., 2017). Sendo assim, como as metalloserrulases apresentam certa identidade com a antarease (40% para ms4 e 47% para ms3), e foi demonstrada neste trabalho a preferência destas enzimas por neuropeptídios, sugere-se que as metalloserrulases possam ter função semelhante à antarease.

Por outro lado, a atribuição fisiológica destas enzimas pode também estar relacionada ao metabolismo de peptídeos humanos, principalmente de neuropeptídeos, como os membros da família do neuropeptídeo Y e a dinorfina 1-13, tanto em sua inativação quanto na formação de fragmentos bioativos. A dinorfina 1-13 é um exemplo especialmente interessante, pois a ação do veneno *in vitro* promove a liberação da Leu-enkefalina e, como já dito, este peptídeo pode causar estimulação de canais de potássio (INYUSHKIN, 2007) sendo, portanto, uma ação neurotóxica indireta promovida por peptidases do VTs. Vale ressaltar que apenas a metalloserrulase 3 foi capaz de gerar Leu-enkefalina a partir da dinorfina 1-13.

No caso da família do NPY, foi observado que as endopeptidases purificadas são capazes de realizar a inativação destes peptídeos bioativos por produzirem somente fragmentos sem o C-terminal amidado, assim como observado no veneno total (CAJADO CARVALHO et al., 2014). Alguns dos produtos de hidrólise obtidos para as metalloserrulases também foram encontrados no estudo com o veneno total. Por exemplo, para o neuropeptídeo Y, substrato que gerou maior número de fragmentos pela ação de ambas as metalloserrulases, sete dos produtos de hidrólise foram similares ao obtido com o veneno total, sendo dois encontrados exclusivamente na hidrólise por ms4 (NPY₁₋₇, YPSKPDN, e NPY₁₋₂₀, YPSKPDNPGEDAPAEDMARY), dois somente obtidos com ms3 (NPY₁₋₆, YPSKPD, e NPY₂₅₋₃₄, RHYINLITRQ) e três fragmentos formados por ambas metalloserrulases (NPY₂₆₋₃₄ HYINLITRQ, NPY₂₇₋₃₄ YINLITRQ e NPY₂₈₋₃₄ INLITRQ). Para o polipeptídeo pancreático, somente a ms3 formou fragmentos similares ao veneno total (PP₁₋₁₉ APLEPMYPGDYATHEQRAQ e PP₁₋₁₅ APLEPMYPGDYATHE), e na hidrólise do peptídeo YY, tanto a ms3 (PYY₂₅₋₃₂ RHYLNLT) quanto a ms4 (PYY₁₋₁₂ YPIKPEAPGEDA) formaram somente um fragmento em comum com o veneno total. Contudo, tendo em vista que outros fragmentos foram obtidos pelo veneno total, é possível prever que outras peptidases presentes em VTs e que não foram isoladas nesse trabalho contribuíram para a hidrólise destes substratos. Em adendo, produtos de hidrólise não observados anteriormente com o veneno total foram obtidos com as metalloserrulases. Tal fenômeno pode ser explicado por conta da purificação das mesmas, permitindo a hidrólise preferencial destas enzimas pela ausência de competição por sítios de clivagem com outras peptidases do veneno. De qualquer forma, tal atividade é um indicativo de que estas peptidases se comportam *in vitro* como verdadeiras toxinas do VTs e que são componentes do veneno com potencial atividade durante o envenenamento. Tendo em vista que estes peptídeos têm reconhecida importância biológica, já descrita

anteriormente, é possível estipular que ambas as metalloserrulases possam afetar funções pancreáticas ou até mesmo contribuir para as alterações neurológicas que ocorrem durante o envenenamento por *T. serrulatus*.

Foi possível observar que a metalloserrulase 4 apresenta um motivo estendido HEXXHXXGXXH característico da família denominada “metzincinas” (que agrupam enzimas como as ADAMs, adamlisina, astacinina, entre outras). As metzincinas apresentam também um resíduo de metionina conservado, que está presente tanto na ms3 quanto na ms4. Contudo, a estrutura primária da metalloserrulase 3 revela uma mutação, apresentando uma alanina no motivo HEXXHXXGXXH ao invés da glicina. Assim, os estudos sobre modelagem teórica foram realizados, uma vez que diferenças estruturais consideráveis seriam observadas entre as ms3 e ms4. Inesperadamente, a modelagem teórica revelou ao menos pequenas similaridades com ADAMs, o que novamente reforça a hipótese de atividade biológica durante o envenenamento destas peptidases. Contudo, é importante lembrar que esta modelagem é teórica e foi construída com base em *templates* de bancos de dados e, portanto, seria necessária a confirmação de tal conformação por cristalografia.

As ADAMS são peptidases importantes e conhecidas por clivarem componentes da matriz extracelular, sendo que ao menos 30 membros dessa família já foram descritas em mamíferos (GIEBELER; ZIGRINO, 2016). A ADAM-22 é membro particular desta família de enzimas, pois é exclusivamente expressa no sistema nervoso (SAGANE et al., 2005), diferentemente das outras que apresentam ampla distribuição no organismo. Estudos demonstram que a ADAM-22 é um fator crucial para o desenvolvimento do sistema nervoso periférico, sendo que camundongos com gene *knockout* desta peptidase têm morte prematura. Além disso, a deficiência de ADAM-22 é associada com quadros de epilepsia (SAGANE et al., 2005), indicando participação no controle motor cerebral. Sendo assim, como a ADAM-22 foi o melhor modelo teórico para a estrutura tridimensional da metalloserrulase 4, é possível hipotetizar que esta peptidase do veneno de escorpião possa ter ação no sistema nervoso periférico, com manifestações ainda não conhecidas. Além disso, o fato da antarease recombinante ter também demonstrado interação com o sistema nervoso periférico (ZORNETTA et al., 2017), acreditamos que a ms4 possa ter alguma função neurotóxica.

No caso da metalloserrulase 3, o *template* teórico foi a enzima conversora de TNF-alfa. Esta peptidase é também conhecida por ADAM-17, estando envolvida em doenças inflamatórias, como na esclerose múltipla e na doença autoimune síndrome de

Guillain-Barré (GIEBELER et al., 2016). De fato, recentemente foi demonstrada a capacidade do veneno de *T. serrulatus* em induzir o “inflamassoma” (ZOCCAL et al., 2016), e que pacientes envenenamentos apresentam níveis elevados de TNF-alfa, além de outras citocinas pró-inflamatórias (FUKUHARA et al., 2003). Sendo assim, futuramente pretendemos verificar se a metalloserrulase 3 é capaz de fazer a liberação de TNF-alfa a partir do seu precursor, contribuindo para a inflamação associada ao envenenamento.

Após a purificação, foram realizados ensaios de caracterizações físico-químicas (influência de temperatura, cátions e pH) para ambas as metalloserrulases, e análises cinéticas (determinação de K_m , k_{cat} e eficiência catalítica) para a metalloserrulase 4 para a hidrólise de substratos fluorescentes análogos à dinorfina 1-13. A avaliação de tais parâmetros físico-químicos é interessante no estudo da estabilidade da enzima, além de ser possível estimar se estariam ativas durante o envenenamento, dependendo de seu comportamento nos ensaios.

Assim como anteriormente determinado para o veneno total de *T. serrulatus* (VENANCIO et al., 2013), o pH 8,5 foi definido como ótimo para a metalloserrulase 4. No caso de ms3, apesar do pH 8,5 ter uma influência positiva na atividade desta enzima, foi determinado o pH 8,0 como ideal para esta peptidase. Os valores de pHs obtidos encontram-se de acordo com o pH ótimo determinado para outras metalopeptidases (3.4.24.*) de artrópodes, entre pH 7,0 – 9,0, segundo o banco de dados BRENDA (CHANG et al., 2015). Em adendo, estudos demonstraram que apesar dos venenos tornarem-se mais tóxicos em meios neutro-alcálinos (MARETIC; STANIC, 1954), o lúmen das glândulas de peçonhas geralmente apresentam meio mais ácido, o que provavelmente previne a degradação exacerbada de proteínas por conta das peptidases não estarem em condições ótimas para sua atividade catalítica até a injeção do veneno na presa ou acidentado (FOX; SERRANO, 2008).

A influência da temperatura da atividade catalítica das metalloserrulases indicou funcionamento destas peptidases no intervalo testado (22 °C a 42 °C), assim como observado com a serACE-like. Contudo, em termos de estabilidade, o declínio de atividade das metalloserrulases em temperaturas mais elevadas provavelmente indica a desestabilização da estrutura tridimensional das enzimas. Por outro lado, esse intervalo relativamente abrangente pode ter relação com a alimentação e captura do alimento pelos escorpiões. É possível extrapolar que as peptidases estariam com atividade proteolítica estável durante o envenenamento de sua presa, como uma barata ou grilo,

levando em conta que esses animais são pecilotérmicos, o que possibilita a atuação destas moléculas em diversas temperaturas. Por fim, em termos de envenenamento humano, os estudos de caracterização bioquímica indicam que tanto as metalloserrulases quanto a ACE-like apresentam-se ativas em condições fisiológicas de temperatura e pH (37 °C, pH 7,4).

Outro fator que comumente interfere na atividade catalítica é a presença de cátions. Com base na série de Hofmeister, certos íons podem ser classificados como cosmotrópicos, que seriam íons fortemente hidratados, estáveis, mantendo as ligações de hidrogênio e contribuindo para a estabilidade tridimensional das proteínas, ou como caotrópicos, os quais afetam negativamente as ligações de hidrogênio por gerar baixa densidade de cargas, promovendo um efeito desestabilizante em proteínas. Segundo esta série, o magnésio e o cálcio seriam classificados como cátions caotrópicos ($Mg^{+2} > Ca^{+2}$), e potássio, sódio e lítio como cosmotrópicos ($K^+ > Na^+ > Li$). Sendo assim, a influência sobre a atividade das metalloserrulases está de acordo com o predito pela série de Hofmeister quanto a cátions que contribuem para uma melhor estabilidade, como o K^+ e o Na^+ , ou para a desestabilização, como o Mg^{+2} , muito embora as concentrações de sais testadas não sejam elevadas.

Por outro lado, a inibição pela presença dos cátions bivalentes também pode estar relacionada ao íon de zinco que se encontra tetracoordenado no sítio catalítico de metalopeptidases. O átomo de zinco confere flexibilidade e dureza intermediárias necessárias para a estabilidade do sítio ativo destas enzimas. Assim, a presença de excesso de íons de Ca^{+2} e Mg^{+2} no tampão pode atuar como competidores do zinco pelo sítio ativo, provocando sua substituição, e assim desestabilizando a enzima (DUDEV; LIM, 2001).

Outro aspecto importante na caracterização de peptidases são as preferências de pontos de clivagem nos substratos, ou seja, o estudo da especificidade primária destas enzimas para a escolha e clivagem de seus substratos. Apesar de ser ideal e importante a utilização de um número maior de substratos para um estudo de especificidade mais preciso, os resultados obtidos forneceram algumas informações relevantes. Com auxílio dos substratos naturais, para ambas as peptidases observou-se uma grande preferência pelos resíduos de arginina e tirosina, independente de sua posição entre P2 e P2'. Contudo, a arginina é encontrada com maior frequência em P1 para ms4 e em P1' para ms3. Tal fato pode explicar, ao menos em parte, a liberação exclusiva de Leu-encefalina

por ms3 a partir da dinorfina ($Y^1G^2G^3F^4L^5R^6R^7I^8R^9P^{10}K^{11}L^{12}K^{13}$) com hidrólises entre as duas argininas Arg^6Arg^7 (P1-P1') e entre Leu^5Arg^6 (P1-P1').

Por outro lado, não observamos hidrólise da Arg^9 , tanto na posição P1 quanto na posição P1'. Possivelmente isso ocorreu devido a presença de algum aminoácido específico em outra posição que impede a clivagem tanto por ms3 quanto por ms4. É interessante apontar que o resíduo de lisina não foi detectado em nenhum fragmento entre P2 e P3' mostrando que a preferência por resíduos básicos, como no caso da arginina, não extensível à lisina. Por fim, é relevante pensar que o reconhecimento do sítio entre resíduos básicos de arginina é típico de protease de processamento para a ativação de moléculas precursoras (WISE et al., 1990). Sendo assim, essas peptidases podem participar tanto da maturação de peptídeos endógenos (VERANO-BRAGA et al., 2013) quanto da formação de moléculas bioativas durante o envenenamento (CAJADO CARVALHO et al., 2014).

Levando em conta que foi observado apenas um ponto de clivagem nos substratos fluorescentes análogos da dinorfina 1-13, foi possível a realização de um estudo de especificidade mais aprofundado para a ms4. Infelizmente o mesmo não pode ser realizado com a ms3, uma vez que a enzima hidrolisou estes substratos em dois pontos de clivagem, assim como observado no peptídeo natural, a dinorfina 1-13. O substrato Abz-FLRRV-EDDnp foi definido como o melhor para a metalloserrulase 4 e, para este, a melhor constante de especificidade foi obtida em meio alcalino, provavelmente por influência do pH sobre a estrutura tridimensional da ms4 e não do substrato, uma vez que os aminoácidos do substrato encontram-se igualmente protonados em ambas as condições de pH. Por outro lado, a remoção da valina do C-terminal afetou significativamente a eficiência de hidrólise provavelmente por conta dos resíduos em P2' serem importantes para o reconhecimento e/ou encaixe da ms4 e seu substrato, e sua ausência dificulta a conversão do substrato em produto. Por fim, apesar da glicina em N-terminal ter afetado moderadamente o k_{cat}/K_m , pode-se dizer que sua presença dificulta um pouco a velocidade de formação do produto, levando em conta que houve uma redução de 50% do k_{cat} em relação ao substrato sem glicina.

O teste de inibição por neutralização das atividades das metallopeptidases isoladas demonstrou uma boa inibição pelos dois antivenenos comerciais em doses menores do que o observado com o veneno total. Ainda, foi possível observar o reconhecimento por ambos os soros comerciais de banda na altura correspondente às

metalloserrulases (22-25 kDa) por western blot em trabalho anteriormente publicado por nosso grupo (VENANCIO et al., 2013).

A fim de facilitar a comparação, os graus de neutralização obtidos para ms3, ms4 e VTs encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparativos de inibição entre veneno total de *Tityus serrulatus* (VTs), metalloserrulase 3 e metalloserrulase 4 frente ao soro antiescorpiônico (SAE) e soro antiaracnídico (SAAr).

	AV	1:10	1: 25	1: 50	1: 100	1:200	1: 500	1:1000
VTs	SAAr	44%	48%	67%	82%	89%	91%	100%
	SAE	0%	0%	23%	54%	74%	77%	100%
ms3	SAAr	59%	67%	68%	88%	95%	100%	100%
	SAE	0%	65%	61%	75%	71%	91%	100%
ms4	SAAr	50%	77%	90%	94%	94%	100%	100%
	SAE	69%	72%	69%	60%	100%	100%	100%

Com auxílio deste resumo, é possível observar que o perfil de neutralização da metalloserrulase 3 se assemelha ao observado com o veneno total, com melhor inibição na presença do soro antiaracnídico nas menores doses. Por outro lado, a ms4 apresentou graus similares de neutralização tanto para SAE quanto para SAAr, sendo que seu bloqueio total foi atingido em doses moderadas. Sendo assim, pode-se dizer que o soro antiaracnídico, no geral, é capaz de neutralizar mais eficientemente ambas as metalloserrulases isoladas. Contudo, o soro escorpiônico foi especificamente melhor para neutralizar a atividade de ms4 e ser-ACE-like, corroborando com os dados já descritos por nosso grupo de que melhores títulos e melhor reconhecimento do veneno total são obtidos para SAE (VENANCIO et al., 2013).

Por fim, é interessante estabelecer um paralelo entre o envenenamento e os ensaios *in vitro* descritos nesse trabalho. Apesar das quantidades de veneno injetadas no paciente não serem conhecidas, segundo Pucca e colaboradores (2014), a média de proteínas totais de um veneno recém-extraído de um escorpião amarelo pode variar entre 96,4 µg e 225,2 µg, dependendo de sua dieta e do tempo que o animal ficou em jejum (PUCCA et al., 2014). Levando esses valores em conta, e com base nas dosagens obtidas para SAE (84 mg/mL) e SAAr (122,4 mg/mL), pode-se dizer que uma ampola de antiveneno seria capaz de neutralizar tanto as metalloserrulases quanto a atividade serACE-like do veneno, pois corresponderia a uma dose igual ou acima de 1:2000 para peçonhas com altas concentrações proteicas. Por outro lado, tendo em vista que a ação

das peptidases é geralmente rápida, e que a clivagem dos substratos foi atingida em menos de 2 horas com pequenas concentrações de veneno (1 µg) , é interessante levar em conta que o tempo de início do tratamento é crucial para que haja neutralização efetiva dessas moléculas, caso contrário a clivagem de peptídeos bioativos já terá sido iniciada e seus efeitos fisiológicos desencadeados.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, a atividade proteolítica do veneno do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* foi estudada por meio da seleção de substratos e de inibidores e pela purificação e sequenciamento de três peptidases. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- 1) Diversas peptidases estão presentes no VTs, dentre elas endopeptidases, carboxipeptidases e aminopeptidases. Para os substratos testados, foram somente detectadas metalopeptidases.
- 2) Essas peptidases são capazes de clivar peptídeos de mamíferos que são chave para alguns processos fisiológicos, como a família do neuropeptídeo Y, a dinorfina 1-13, hemopressina, angiotensina I e bradicinina.
- 3) A atividade proteolítica do veneno total, tanto endopeptidásica quanto carboxipeptidásica, é parcialmente inibida pelos soros comerciais do Instituto Butantan.
- 4) Existem evidências transcriptômicas da presença de uma enzima conversora de angiotensina I no veneno de *Tityus serrulatus* e, pela primeira vez, esta molécula foi purificada.
- 5) A sequência de ACE-Ike é também encontrada no transcriptoma de outros escorpiões do gênero *Tityus* e provavelmente pode estar contribuindo para o efeito de hipertensão apresentado pelas vítimas de envenenamento pela formação de Ang II e Ang III.
- 6) Pela primeira vez as metalloserrulases 3 e 4 foram isoladas a partir do veneno total e seus parâmetros bioquímicos determinados. Estas enzimas diferenciam-se não só pela sequência primária, mas também pela formação de diferentes produtos na clivagem de mesmos substratos como, por exemplo, a dinorfina 1-13.
- 7) Na análise de especificidade, foi possível observar a grande afinidade das metalloserrulases pelos resíduos de tirosina e arginina em P1 e/ou em P1'. Contudo, a arginina foi mais frequente na posição P1 para metalloserrulase 4 e P1' para metalloserrulase 3, o que pode explicar a liberação exclusiva de Leu-encefalina a partir de dinorfina 1-13 por ms3.
- 8) As metalloserrulases 3 e 4 são capazes de hidrolisar neuropeptídeos da família do neuropeptídeo Y;

9) Tanto as metalloserrulases quanto a ACE-like apresentam pico ótimo de atividade em meio alcalino (pH 8-8,5). No entanto, a ACE-like apresenta maior estabilidade frente a mudanças de temperatura do que as metalloserrulases.

10) Os antivenenos comerciais apresentam bom reconhecimento das metalloserrulases, no entanto, a ms4 é melhor inibida do que ms3 e o veneno total. Para a atividade serACE-like do veneno, a neutralização total não foi atingida na maior dose. Contudo, estima-se que estas peptidases sejam neutralizadas *in vivo*.

11) No geral, soro antiaracnídico apresentou melhores níveis de neutralização do que o soro antiescorpiônico.

12) Por fim, os testes realizados neste trabalho podem auxiliar para uma melhor compreensão dos mecanismos de envenenamento, bem como para o desenvolvimento de técnicas *in vitro* para o estudo do veneno de *Tityus serrulatus*.

REFERÊNCIAS*

- ABROUG, F., et al. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 354, n. 9182, p. 906-909, 1999.
- ALMEIDA, D. D., et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Gen.**, v. 13, p. 362, 2012.
- ALVARENGA, É. R., et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open. J. Genet.**, v.2, p 210-220, 2012.
- ARAÚJO, M. C., et al. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8519-8525, 2000.
- BAWASKAR, H. S.; BAWASKAR, P. H. Scorpion sting: update. **J. Assoc. Phys. India.**, v. 60, p. 46-55, 2012.
- BERNSTEIN, K. E., et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. **Pharmacol. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 1-46, 2013.
- BERSANETTI, P. A., et al. Characterization of angiotensin I-converting enzyme from anterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 74, p. 304-309, 2015.
- BLAIS, P.-A., et al. Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice: a comparative study. **Peptides**, v. 26, n. 8, p. 1317-1322, 2005.
- BORTOLUZZI, L. R., et al. Notes on the occurrence of *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) in the Western areas of Rio Grande do Sul, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 357-359, 2007.
- BOYER, L. V., et al. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. **N. Engl. J. Med.**, v. 360, n. 20, p. 2090-2098, 2009.
- BOYER, L. V., et al. Safety of intravenous equine F(ab')₂: insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. **Toxicon**, v. 76, p. 386-393, 2013.
- BRAZÓN, J., et al. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 168, p. 62-69, 2014.
- BUCARETCHI, F., et al. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon**, v. 89, p. 17-25, 2014.

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

CAJADO CARVALHO, D., et al. Neuropeptide Y family-degrading metallopeptidases in the *Tityus serrulatus* venom partially blocked by commercial antivenoms. **Toxicol. Sci.**, v. 142, n. 2, p. 418-426, 2014.

CALISKAN, F., et al. A preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkish Black Scorpion) venom. **Turk. J. Biochem.**, v. 34, n. 3, p. 148-153, 2009.

CAMARGO, A. C., et al. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516-523, 2012.

CANDIANO, G., et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CARMO, A. O., et al. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon**, v. 90, p. 45-55, 2014.

CASEWELL, N. R., et al. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends Ecol. Evol.**, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013.

CHANG, A., et al. BRENDA in 2015: exciting developments in its 25th year of existence. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 43, p. 439-446, 2015.

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

CHIPPAUX, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 6, n., p. 165-173, 2012.

COLAERT, N., et al. Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. **Nat. Methods.**, v. 6, n. 11, p. 786-787, 2009.

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

CONLON, J. M. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). **Peptides**, v. 23, n. 2, p. 269-278, 2002.

CORDEIRO, F. A., et al. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 21, n., p. 24, 2015.

DALE, C. S., et al. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 431-436, 2005.

DANI, M. P., et al. Antibacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **J. Insect Physiol.**, v. 49, n. 10, p. 945-954, 2003.

DE OLIVEIRA, U. C., et al. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. **Toxicon**, v. 95, p. 52-61, 2015.

- DE REZENDE, N. A., et al. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? **Toxicon**, v. 34, n. 7, p. 820-823, 1996.
- DEQUATTRO, V.; CHAN, S. Raised plasma-catecholamines in some patients with primary hypertension. **Lancet**, v. 1, n. 7755, p. 806-809, 1972.
- DÍAZ-GARCÍA, A., et al. Enzymatic analysis of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. **J. Venom Res.**, v. 6, p. 11-18, 2015.
- DIZ, D. I. Another chapter in the understanding of angiotensin-catecholamine interactions relevant to blood pressure control. **Exp. Physiol.**, v. 99, n. 12, p. 1595-1596, 2014.
- DUDEV, T.; LIM, C. Metal selectivity in metalloproteins: Zn^{2+} vs Mg^{2+} . **J. Phys. Chem. B.**, v. 105, n. 19, p. 4446-4452, 2001.
- DUZZI, B., et al. [des-Arg(1)]-Proctolin: A novel NEP-like enzyme inhibitor identified in *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 18-24, 2016.
- EL-DEEK, S. E., et al. Role of some vasoactive mediators in scorpion envenomed children: Possible relation to envenoming outcome. **Toxicon**, v. 127, p. 77-84, 2017.
- ESTRADA-GÓMEZ, S., et al. Venom from *Opisthacanthus elatus* scorpion of Colombia, could be more hemolytic and less neurotoxic than thought. **Acta. Trop.**, v. 153, p. 70-78, 2016.
- FERRARIO, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 515-521, 2006.
- FERREIRA, M. G., et al. Toxicity of crude and detoxified *Tityus serrulatus* venom in anti-venom-producing sheep. **J. Vet. Sci.**, v. 17, n. 4, p. 467-477, 2016.
- FLETCHER, M. D., et al. Morphological studies by light and electron microscopy of pancreatic acinar cells under the effect of *Tityus serrulatus* venom. **Cell Tissue Res.**, v. 278, n. 2, p. 255-264, 1994.
- FLETCHER, P. L., et al. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 10, p. 7405-7416, 2010.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 909-920, 2008.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.
- FOX, R. C.; SCOTT, C. S. First evidence of a venom delivery apparatus in extinct mammals. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1091-1093, 2005.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: Ownby, C. e Odell, G. (Ed.). **Natural toxins, characterization, pharmacology and therapeutics**. Oxford: Pergamon Press, 1989, p.139-159.

FUKUHARA, Y. D., et al. Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 49-55, 2003.

GIEBELER, N.; ZIGRINO, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 122, 2016.

GONG, E., et al. The birdlike raptor Sinornithosaurus was venomous. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 2, p. 766-768, 2010.

GRUNDEMAR, L.; HÅKANSON, R. Effects of various neuropeptide Y/peptide YY fragments on electrically-evoked contractions of the rat vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, v. 100, n. 1, p. 190-192, 1990.

GUERRA, C. M., et al. Analysis of variables related to fatal outcomes of scorpion envenomation in children and adolescents in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2001 to 2005. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 84, n. 6, p. 509-515, 2008.

GUIDINE, P. A., et al. Brainstem structures are primarily affected in an experimental model of severe scorpion envenomation. **Toxicol. Sci.**, v. 137, n. 1, p. 147-157, 2014.

HAGAMAN, J. R., et al. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, n. 5, p. 2552-2557, 1998.

HANNA, S. L., et al. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v. 146 (Pt 10), n., p. 2495-2508, 2000.

HARRISON, C.; ACHARYA, K. R. ACE for all - a molecular perspective. **J. Cell. Commun. Signal.**, v. 8, n. 3, p. 195-210, 2014.

HIGA, A., et al. Degradation of A α and B β chains from bovine fibrinogen by serine proteases of the Amazonian scorpion *Brotheas amazonicus*. **BMC Proc.**, p. P12, 2014

HIRATA, I. Y., et al. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Lett. Pep. Sci.**, v. 1, p. 299-308, 1994.

HOHLBRUGGER, G., et al. Angiotensin I converting enzyme in rat testis, epididymis and vas deferens under different conditions. **J. Reprod. Fertil.**, v. 65, n. 1, p. 97-103, 1982.

HORTA, C. C., et al. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 2, p. e2693, 2014.

INYUSHKIN, A. N. Effects of leucine-enkephalin on potassium currents in neurons in the rat respiratory center *in vitro*. **Neurosci. Behav. Physiol.**, v. 37, n. 7, p. 739-746, 2007.

ISAAC, R., et al. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. **Biochem. J.**, v. 330, n. 1, p. 61-65, 1998.

ISBISTER, G. K., et al. Antivenom treatment in arachnidism. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 41, n. 3, p. 291-300, 2003.

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

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat. Protoc.**, v. 4, n. 3, p. 363-371, 2009.

KUKKOLA, P. J., et al. Differential structure-activity relationships of phosphoramidon analogues for inhibition of three metalloproteases: endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase, and angiotensin-converting enzyme. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 26 Suppl 3, p. S65-68, 1995.

KUMAR, S., et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEMEIRE, E., et al. Angiotensin-converting enzyme in *Spodoptera littoralis*: molecular characterization, expression and activity profile during development. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, n. 2, p. 166-175, 2008.

LOURENÇO, W. R. What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. **J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 21, p. 20, 2015.

MA, B., et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, n. 20, p. 2337-2342, 2003.

MANZOLI-PALMA, M., et al. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 174-185, 2003.

MARC, Y.; LLORENS-CORTES, C. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. **Prog. Neurobiol.**, v. 95, n. 2, p. 89-103, 2011.

MARETIC, Z.; STANIC, M. The health problem of arachnidism. **Bull World Health Organ.** v. 11, n. 6, p. 1007-1022, 1954.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de controle de escorpiões**, 2009.

MORGENSTERN, D., et al. The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 695-703, 2011.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal Biochem**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.

MURTHY, K. R. K.; VAKIL, A. E. Elevation of plasma angiotensin levels in dogs by Indian red scorpion (*Buthus tamulus*) venom & its reversal by administration of insulin+tolazoline. **Indian J Med Res**, v. 88, p. 376-379, 1988.

MURTHY, K. R. K. Hypertension, Autonomic Storm, Increased Counter Regulatory Hormones and Suppressed Insulin in Acute Myocarditis in Scorpion Envenoming Syndrome. **World J Cardiovasc Dis.**, v. 4, p. 189-210, 2014.

NUNAN, E. A., et al. 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.

NUNAN, E. A., et al. Age effects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, n. 3, p. 385-390, 2004.

ORTIZ, E., et al. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1840, n. 6, p. 1738-1746, 2014.

PIERAMICO, O., et al. Interdigestive cycling in chronic pancreatitis: altered coordination among pancreatic secretion, motility, and hormones. **Gastroenterology**, v. 109, n. 1, p. 224-230, 1995.

PUCCA, M. B., et al. Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. **J. Immunotoxicol.**, v. 9, n. 2, p. 173-183, 2012.

PUCCA, M. B., et al. Serrumab: a novel human single chain-fragment antibody with multiple scorpion toxin-neutralizing capacities. **J. Immunotoxicol.**, v. 11, n. 2, p. 133-140, 2014.

PUCCA, M. B., et al. 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, 2014.

RAWLINGS, N. D., et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic. Acids Res.**, v. 38, p. D227-D233, 2010.

RAWLINGS, N. D., et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic. Acids Res.**, v. 42, p. D503-509, 2014.

REAUX, A., et al. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 12, n. 4, p. 157-162, 2001.

- RIOLI, V., et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol Chem.**, v. 278, n. 10, p. 8547-8555, 2003.
- SAFAVI-HEMAMI, H., et al. High molecular weight components of the injected venom of fish-hunting cone snails target the vascular system. **J. Proteomics.**, v. 91, p. 97-105, 2013.
- SAGANE, K., et al. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. **BMC Neurosci.**, v. 6, p. 33, 2005.
- SALZET, M. Neuroimmunology of opioids from invertebrates to human. **Neuro. Endocrinol. Lett.**, v. 22, n. 6, p. 467-474, 2001.
- SANTOS, R. M. M. D. Contribuição da FUNED para a produção de soros antivenenos e antitóxicos no Brasil. **Rev. Min. Saúde Pub.**, v. 5, n. 6, p. 13-19, 2005.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.
- SERAFINI, G., et al. The role of neuropeptides in suicidal behavior: a systematic review. **Biomed. Res Int.**, v. 2013, p. 687575, 2013.
- SEWALD, N.; JAKUBKE, H. D. Biologically Active Peptides. In: Sewald, N., Jakubke, H.D. (Ed.). **Peptides: Chemistry and Biology**. UK: Wiley, 2003. v.1, p.61-134.
- SIFI, A., et al. Role of angiotensin II and angiotensin type-1 receptor in scorpion venom-induced cardiac and aortic tissue inflammation. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 102, n. 1, p. 32-40, 2017.
- SILVA, S., et al. Escorpiões, Aranhas e Serpentes: aspectos gerais e espécies de interesse médico no estado de Alagoas. **Maceió: Eufal.[livro online]**. 2005.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO DE ANIMAIS PEÇONHENTOS (SINAN). **Acidente Por Animais Peçonhentos - Notificações Registradas No Sistema De Informação De Agravos De Notificação - Brasil**, 2017.
- SOARES, M. R., et al. [Scorpionism in Belo Horizonte, MG: a retrospective study]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 359-363, 2002.
- SOFER, S., et al. Scorpion envenomation and antivenom therapy. **J. Pediatr.**, v. 124, n. 6, p. 973-978, 1994.
- STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. S. Buffers: principles and practice. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 24-38, 1990.
- TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 103, n. 2, p. 299-302, 1992.
- TASHIMA, A. K., et al. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Mol. Cell. Proteomics.**, v. 11, n. 11, p. 1245-1262, 2012.

TEIXEIRA, A. L., et al. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 703-709, 2001.

TENÓRIO, H. E. A., et al. Angiotensin processing activities in the venom of *Thalassophryne nattereri*. **Toxicon**, v. 98, p. 49-53, 2015.

TISCORNIA, O. M., et al. Pancreatic polypeptide: a review of its involvement in neuro-endocrine reflexes, islet-acinar interactions and ethanol-evoked physiopatologic pancreatic gland changes. **Acta Gastroenterol. Latinoam.**, v. 45, n. 2, p. 155-164, 2015.

VENANCIO, E. J., et al. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, v. 69, p. 180-190, 2013.

VERANO-BRAGA, T., et al. From bradykinin-potentiating peptides to hypotensins: more than four decades of research. In: UFMG (Ed.). **Animal toxins: state of the art. Perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte, 2009, p.235-247.

VERANO-BRAGA, T., et al. Moving pieces in a venomous puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. **J. Proteome Res.**, v. 12, n. 7, p. 3460-3470, 2013.

WILLIAMS, S. C. Scorpion bionomics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 275-295, 1987.

WISE, R. J., et al. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 23, p. 9378-9382, 1990.

YATES, C. J., et al. Molecular and thermodynamic mechanisms of the chloride-dependent human angiotensin-I-converting enzyme (ACE). **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 3, p. 1798-1814, 2014.

ZHANG, J., et al. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. **Mol. Cell. Proteomics.**, v. 11, n. 4, p. M111.010587, 2012.

ZOCCAL, K. F., et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nat. Commun.**, v. 7, p. 10760, 2016.

ZORNETTA, I., et al. Electrophysiological Characterization of the Antarease Metalloprotease from *Tityus serrulatus* Venom. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 3, p., 2017.

ANEXO A

Lista de produções bibliográficas

Relacionados aos resultados do doutorado

1 - CAJADO CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A.K.; KODAMA, R.T.; OLIVEIRA, A.K.; SERRANO, S.M.; TAMBOURGI, D.V.; PORTARO, F. V. Neuropeptide Y family-degrading metallopeptidases in the *Tityus serrulatus* venom partially blocked by commercial antivenoms. **Toxicol Sci.** 2014 Dec;142(2):418-26. doi: 10.1093/toxsci/kfu193. Epub 2014 Sep 19.

2- CAJADO CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A.K.; DUZZI, B.; IWAI, L.K.; OLIVEIRA, U.C.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; 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** (Basel). 2016 Nov 24;8(12). pii: E348.

Manuscrito em redação

A) CAJADO-CARVALHO, D.; OLIVEIRA, I.C.S.; SILVA, C.C.F., KODAMA, R.T., DUZZI, B., KUNIYOSHI, A.K.; PORTARO, F.V. A proteolytic outlook of scorpion venoms: isolation and biochemical characterization of metalloserrulase 3 and 4 from *Tityus serrulatus* venom.

Colaborações

3- RODRIGUEZ, R.V.; DORCE, V.A.; DE FREITAS, L.A.; DORCE, A.L.; LEBRUN, I.; SOBRAL, A.C.; PORTARO, F.C.; KUNIYOSHI, A.K.; CARVALHO, D.C.; NENCIONI, A.L. Intrahippocampal injection of TsTX-I increases the levels of INF- γ in the cerebral tissue but not the levels of glutamate. **Toxicon.** 2015 Sep;103:155-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.07.006. Epub 2015 Jul 7.

4- 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-Arg(1)]-Proctolin: A novel NEP-like enzyme inhibitor identified in *Tityus serrulatus* venom. **Peptides.** 2016 Jun;80:18-24. doi: 10.1016/j.peptides.2015.05.013. Epub 2015 Jun 6

5- KODAMA, R.T.; CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A.K.; KITANO, E.S.; TASHIMA, A.K.; BARNA, B.F.; TAKAKURA, A.C.; SERRANO, S.M.; DIAS-DA-SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V.; PORTARO, F.V. New proline-rich oligopeptides from the venom of African adders: Insights into the hypotensive effect of the venoms. **Biochim Biophys Acta**. 2015 Jun;1850(6):1180-7. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.02.005. Epub 2015 Feb 14.

6- KUNIYOSHI, A.K.; KODAMA, R.T.; MORAES, L.H.F.; DUZZI, B.; IWAI, L.K.; LIMA, I.F.; CAJADO-CARVALHO, D.; PORTARO, F.V. *In vitro* cleavage of bioactive peptides by peptidases from *Bothrops jararaca* venom and its neutralization by bothropic antivenom produced by Butantan Institute: major contribution of serine peptidases. **Toxicon** – aceito em 21 de julho de 2017.

Manuscrito submetido a Toxins

B- CAJADO CARVALHO, D.; SILVA, J.G.; KUNIYOSHI, A.K.; CARNEIRO, P.S.; PAES LEME, A.F.; PAULETTI, B.A.; MARENGO, E.B.; PORTARO, F.V. *Tityus serrulatus* scorpion venom: *In vitro* tests and its correlation with *in vivo* lethal dose assay

Article

Insights into the Hypertensive Effects of *Tityus serrulatus* Scorpion Venom: Purification of an Angiotensin-Converting Enzyme-Like Peptidase

Daniela Cajado-Carvalho ¹, Alexandre Kazuo Kuniyoshi ¹, Bruno Duzzi ¹, Leo Kei Iwai ², Úrsula Castro de Oliveira ², Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo ², Roberto Tadashi Kodama ¹ and Fernanda Vieira Portaro ^{1,*}

¹ Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo CEP 05503-900, SP, Brazil; daniela.carvalho@butantan.gov.br (D.C.-C.); alexandre.kuniyoshi@butantan.gov.br (A.K.K.); bruno.duzzi@butantan.gov.br (B.D.); pararoberval@gmail.com (R.T.K.)

² Special Laboratory for Applied Toxinology, Butantan Institute/ Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), São Paulo CEP 05503-900, SP, Brazil; leo.iwai@butantan.gov.br (L.K.I.); ursula.oliveira@butantan.gov.br (Ú.C.d.O.); inacio.azevedo@butantan.gov.br (I.d.L.M.J.d.A.)

* Correspondence: fernanda.portaro@butantan.gov.br; Tel.: +55-11-2627-9716

Academic Editor: Ronald A. Jenner

Received: 7 October 2016; Accepted: 16 November 2016; Published: 24 November 2016

Abstract: The number of cases of envenomation by scorpions has grown significantly in Brazil since 2007, with the most severe cases being caused by the *Tityus serrulatus* scorpion. Although envenomed patients mostly suffer neurotoxic manifestations, other symptoms, such as hypertension, cannot be exclusively attributed to neurotoxins. Omics analyses have detected plentiful amounts of metalloproteases in *T. serrulatus* venom. However, the roles played by these enzymes in envenomation are still unclear. Endeavoring to investigate the functions of scorpion venom proteases, we describe here for the first time an Angiotensin I-Converting Enzyme-like peptidase (ACE-like) purified from *T. serrulatus* venom. The crude venom cleaved natural and fluorescent substrates and these activities were inhibited by captopril. Regarding the serum neutralization, the scorpion antivenom was more effective at blocking the ACE-like activity than arachnid antivenom, although neither completely inhibited the venom cleavage action, even at higher doses. ACE-like was purified from the venom after three chromatographic steps and its identity was confirmed by mass spectrometric and transcriptomic analyses. Bioinformatics analysis showed homology between the ACE-like transcript sequences from *Tityus* spp. and human testis ACE. These findings advance our understanding of *T. serrulatus* venom components and may improve treatment of envenomation victims, as ACE-like may contribute to envenomation symptoms, especially the resulting hypertension.

Keywords: ACE-like; *Tityus serrulatus* venom; proteases; antivenom; hypertension

1. Introduction

According to Brazil's Ministry of Health, since 2007 scorpion stings have been the main form of envenomation by animals in this country. An epidemiological survey conducted by the Ministry of Health shows that, between 2010 and 2013, cases of scorpion envenomation represent 49% of poisonings by venomous animals in Brazil, surpassing those by snakes (17%) and spiders (18.5%). This scenario is mainly attributed to the proliferation of *Tityus serrulatus* scorpions, synanthropic animals that reproduce by parthenogenesis [1] and whose potent venom contributes to the occurrence of critical clinical envenomation. Thus, *T. serrulatus* venom (Tsv) is one of the most studied Brazilian scorpion venoms [2].

Neurotoxins in *Tsv* cause most of the envenomation symptoms by promoting neurotransmitter release from the autonomic nervous system and the adrenal medulla onto several organs [3]. These events result in clinical manifestations such as restlessness, excessive salivation, lacrimation, hypertension followed by hypotension, heart failure, and cardiogenic shock, among others. Not all symptoms, however, are attributed to a direct action of specific neurotoxins on organs [4], and recent studies suggest that other molecules may contribute to these effects [5–7]. Metallopeptidases, hyaluronidase, biogenic amines, antimicrobial peptides (AMP), and other oligopeptides are also present in *Tsv* [7–9]; however, the role of these molecules in envenomation is still unclear.

Peptidases present in animal venoms often play an important role in the envenomation syndrome, as they can cleave proteins and peptides that are key factors for physiological systems. For instance, in snake venoms, serine peptidases can affect the coagulation cascade and kallikrein–kinin system, while metallopeptidases target components of blood coagulation and platelet aggregation, both resulting in an imbalance of the hemostatic system [10,11]. Although snake venom peptidases are the most studied, due to their abundance, proteolytic activity has recently been described in jellyfish [12], cone snail [13], wasp [14], spider [15], and scorpion [16] venoms.

Thus far, metallopeptidases and hyaluronidases comprise the only classes of enzymes purified and with their functional activities determined in *Tityus* spp. venoms [6,9], although transcriptomic studies have identified other classes of enzymes as well [8,17]. Studies from our group have shown that *Tsv* proteases cleave mammal peptides in vitro, and that this activity is inhibited by high concentrations of commercially available antivenoms used in the treatment of envenomed patients in Brazil [16,18]. Moreover, endopeptidases, aminopeptidases, and carboxypeptidases that cleave endogenous peptides from the *Tsv* and inactivate human bioactive peptides have been detected [18,19]. One of these, antarease, is a metallopeptidase ubiquitous in the venom of scorpions of family Buthidae [20], to whose action the pancreatitis observed in mice after venom injection is attributed [21].

The human somatic angiotensin-I converting enzyme (sACE, EC 3.4.15.1) is a dipeptidyl carboxypeptidase that plays a crucial role in blood pressure regulation through the renin–angiotensin (RAS) and kallikrein–kinin (KKS) systems. sACE converts angiotensin I into angiotensin II in RAS, and inactivates bradykinin in KKS, leading to blood pressure increase. sACE has two highly similar, independent catalytic domains, the N- and C-terminal domains. Although both have proteolytic activity, regulation of blood pressure mostly depends on the C-terminal domain, as it is responsible for producing angiotensin II [22]. A smaller isoform of sACE is also present in mammals: known as testicular ACE (tACE), it contains only the C-terminal domain [23,24]. The same gene encodes both somatic and testicular ACE [23,25] but tACE is only found after puberty in male germinal cells, where it participates in sperm maturation, in contrast with the constant and wide expression of sACE that acts all over the body [26].

ACE-like enzymes are highly conserved, having also been detected in insects, where they play a role in feeding, reproduction, and the production of peptide hormones and neurotransmitters [27]. Also, functional ACE-like activity was detected in animal venoms of the fish-hunting cone snail [13], vampire snail [28], and solitary endoparasitic wasp [14]. In scorpions, ACE-like peptidases were detected by transcriptome analysis in *Hottentotta judaicus* [29], *Tityus stigmurus* [30], and *Tityus bahiensis* [17] venoms.

Here we describe and characterize for the first time an Angiotensin I-Converting Enzyme-like peptidase activity in *Tityus serrulatus* venom and the evaluation of commercially available antivenoms to neutralize it. We used proteolytic activity assays to detect an ACE-like peptidase, then purified and confirmed its identity by tryptic digestion/mass spectrometric and transcriptomic analysis.

This report may contribute to our understanding of the role of proteases from scorpion venoms in the envenomation process, as an ACE-like peptidase may contribute to the hypertension observed in human victims.

1. Results

1.1. FRET Substrates Specific for Carboxy- and Endopeptidases on Tsv

We first evaluated *Tsv* activity with peptidase inhibitors, using two fluorescent substrates: Abz-FRK(Dnp)P-OH, which was designed for ACE studies [31], and Abz-GGFLRRV-EDDnp, homologous to the dynorphin 1–13 sequence and previously determined as substrate for *Tsv* endopeptidases [18]. Results are presented in Figure 1.

Figure 1. Fluorimetric assays for carboxy- and endopeptidases activities on *Tsv* using peptidase inhibitors. Captopril (100 nM), BPP 10c (16 μ M), EDTA (50 mM), 1,10-phenanthroline (2 mM), PMSF (2 mM) were tested on the whole *Tityus serrulatus* venom (1 μ g) in a fluorimetric assay with Abz-FRK(Dnp)P-OH (dark grey) and Abz-GGFLRRV-EDDnp (light grey). The reactions occurred in 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂ buffer, pH 7.0 at 37 °C. Experiments were done in duplicate. The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained.

Although only metallopeptidases were detected in *Tsv* (due to inhibition of EDTA and 1,10-phenanthroline), we observed that different proteases act on each substrate. For Abz-FRK(Dnp)P-OH, the two classical ACE inhibitors, captopril (100 nM) and BPP 10c (16 μ M), significantly inhibited *Tsv* activity (98% and 90%, respectively), while Abz-GGFLRRV-EDDnp hydrolysis was not affected by these inhibitors at the same concentrations. However, PMSF (2 mM) had no effect on the activity of the venom on any fluorescent substrates tested. Thus, it seems that Abz-GGFLRRV-EDDnp is cleaved mainly by metalloendopeptidases and Abz-FRK(Dnp)P-OH by metallo dipeptidyl carboxypeptidases.

1.2. In Vitro Serum Neutralization Assays Using Abz-FRK(Dnp)P-OH as Substrate

We tested nine different concentrations of arachnid (AAV) and scorpion (SAV) antivenoms to determine their efficacy in neutralizing *Tsv* hydrolysis of Abz-FRK(Dnp)P-OH (Figure 2).

SAV partially inhibited the activity even at low venom:antivenom ratios, whereas AAV started inhibiting *Tsv* at a higher dose, after 25 μ g of antivenom (1:25), but also reached higher levels of inhibition than SAV at concentrations of 1:500 μ g. Neither antivenom fully neutralized *Tsv* activity at the highest dose tested (1:1000), with inhibition reaching 94% for SAV and 98% for AAV.

Figure 2. In vitro serum neutralization of Abz-FRK(Dnp)P-OH hydrolysis by *Tsv* using scorpion (SAV) and arachnid (AAV) commercial antivenoms. The venom was incubated for 30 min at room temperature with nine concentrations of antivenom (weight ratio of venom:antivenom)—1:1; 1:2; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:250; 1:500, and 1:1000—and then the fluorescent substrate was added. The result is expressed as % inhibition of peptidase activity in the venom (%). The result represents the mean of two independent experiments. The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained.

1.1. Effect of Chloride Ion Concentration on *Tsv* and *sACE*

As chloride ions are known to affect ACE activity [32], we compared *Tsv* and ACE hydrolysis of the Abz-FRK(Dnp)P-OH substrate in the presence of different Cl^- concentrations (Figure 3).

As showed in Figure 3, both enzymes were already active in the absence of NaCl, with higher proteolytic activities observed as NaCl concentrations increased. At 10 mM NaCl, *Tsv* and ACE activities increased by 15% and 25%, respectively, and, at the highest NaCl concentration tested (50 mM) hydrolysis of Abz-FRK(Dnp)P-OH by *Tsv* increased by more than 35%, and around 46% by ACE.

Figure 3. Effect of chloride ions concentration on (A) angiotensin-converting enzyme (ACE) and (B) *Tityus serrulatus* venom. For both, Abz-FRK(Dnp)P-OH hydrolysis was determined in Tris 100 mM, ZnCl_2 10 μM buffer, with four different concentrations of NaCl: 0, 10 mM, 20 mM, and 50 mM. The result represents the mean of two independent experiments. The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained.

1.1. Hydrolysis of ACE Natural Substrates by Tsv

Angiotensin I and bradykinin were incubated with *Tsv* in the classical ACE working buffer, 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, pH 7.0. After verifying, with reserve phase chromatography, that both peptides were substrates for *Tsv*, we manually collected the products of hydrolysis and analyzed them by mass spectrometry. Additionally, we determined the specific activity of the venom on each peptide, including hemopressin, and determined the cleavage sites (Table 1).

Table 1. Hydrolysis of biologically active peptides by *Tityus serrulatus* venom and released fragments.

Peptide	Fragment Sequence	Fragment Identification	MW	Venom Specific Activity (μ M/ μ g/min)
Angiotensin I	DRVY	Ang ₍₁₋₄₎	551.2	0.050
	IHPFHL	Ang ₍₅₋₁₀₎	762.4	
	HPFHL	Ang ₍₆₋₁₀₎	649.3	
	DRVYIHP	Ang ₍₁₋₇₎	898.4	
	DRVYIHPF	Ang II	1045.4	
	RVYIHPF	Ang III	930.5	
	FHL	Ang ₍₈₋₁₀₎	415.2	
Bradykinin	RPPGF	BK ₍₁₋₅₎	572.3	0.045
	RPPGFSP	BK ₍₁₋₇₎	756.3	
	PGFSPFR	BK ₍₃₋₉₎	806.4	
Hemopressin	PVNFKFL	Hemo ₍₁₋₇₎	863.4	0.400
	PVNFKF	Hemo ₍₁₋₆₎	750.4	
	PVNFK	Hemo ₍₁₋₅₎	603.3	
	KFLSH	Hemo ₍₅₋₉₎	630.35	
	FLSH	Hemo ₍₆₋₉₎	502.25	

Assays were carried out in 100 mM Tris buffer containing 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, pH 7.0, at 37 °C, in a final volume of 100 μ L. The results are shown as the mean of three independent experiments. The SD of kinetic was never greater than 5% of the value obtained.

Hemopressin was the best substrate for the whole venom (0.40 μ M/ μ g/min), followed by angiotensin I (0.05 μ M/ μ g/min) and bradykinin (0.045 μ M/ μ g/min). One of the fragments collected from angiotensin I corresponded to angiotensin II, due to the removal of His⁹-Leu¹⁰. Other fragments were also formed from angiotensin I hydrolysis, such as Ang₍₁₋₄₎, Ang₍₅₋₁₀₎, Ang₍₁₋₇₎, and Ang₍₈₋₁₀₎, probably due to endopeptidase activity; and Ang III and Ang₍₆₋₁₀₎, probably due to aminopeptidase activity. Bradykinin hydrolysis by the venom formed the fragments BK₍₁₋₇₎, BK₍₁₋₅₎, the expected products of ACE-like activity, and BK₍₃₋₇₎. Hemopressin cleavage sites were determined previously [18], but the hydrolysis rate increased 5.6 times when the buffer containing 10 μ M ZnCl₂ was used.

1.2. Inhibition Assay on Reverse Phase Chromatography

As new substrates and hydrolysis rates were observed for *Tsv* when using the ACE buffer, we evaluated inhibition by captopril, a potent and specific human ACE inhibitor, and by EDTA (Table 2).

Table 2. Inhibition of *Tsv* activity on bioactive peptides by captopril and EDTA.

Peptide	Inhibitory Activity (%)		
	EDTA	Captopril 100 nM	Captopril 1 μ M
Angiotensin-I	100	8.2	48.6
Bradykinin	100	36.3	60.0
Dynorphin A	100	0.0	1.8
Hemopressin	100	37.8	8.9

Experiments were made using 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂ buffer, pH 7.0 at 37 °C with *Tsv* (1 μ g), at 37 °C, using 30 μ M of each biologically active peptide substrate. The incubations varied according to the particularity of each substrate, as described in Section 4.6. The results shown are the mean of three independent experiments. The SD of kinetic was never greater than 5% of the value obtained.

EDTA fully inhibited the activity of *Tsv* on all substrates. Captopril, in either of the two concentrations tested, failed to inhibit the cleavage of dynorphin 1–13 in any concentration, which was expected, as a similar result was observed with the analog fluorescent substrate, Abz-GGFLRRV-EDDnp (Figure 1). On the other hand, captopril inhibited bradykinin and angiotensin I hydrolyses in a dose-dependent manner (Table 2). Hydrolysis of hemopressin was also strongly inhibited (37.8%) by 100 nM captopril, but less so with a higher dose (1 μ M) of this inhibitor. The RP-HPLC profile of hemopressin hydrolysis by *Tsv* (Figure 4), shows that, when captopril was present (in both doses), one of the products (PVNFKFL) was not formed, indicating that the dipeptidyl carboxypeptidase activity of the whole venom was abolished. Nevertheless, the other products (PVNFK and FLSH) were not affected by this inhibitor.

Figure 4. Hemopressin hydrolysis by *Tityus serrulatus* venom on RP-HPLC. (A) Hemopressin, 30 μ M, without venom; (B) hemopressin after 2 h incubation with *Tsv* (1 μ g), and its fragments; (C,D) hemopressin hydrolyzed by *Tsv* in presence of 100 nM and 1 μ M of captopril, respectively, showing that the product (PVNFKFL) is not formed. Experiments were done in duplicate.

1.1. Purification of ACE-Like Peptidase from *T. serrulatus* Venom

In order to purify the ACE-like peptidase present in *Tsv*, we performed three chromatographic steps to obtain a homogeneous and active enzyme. First, the whole *Tsv* was applied to an HPLC-DEAE column, and the ACE-like activity was identified (77 UF/ μ g/min) in fraction 1, which did not interact with the column (data not show). Then, fraction 1 was loaded onto a Diol-300 column, from which fractions were collected (Figure 5, panel A) and screened by Abz-FRK(Dnp)P-OH hydrolysis. Since fraction F1-2 showed the best hydrolysis rates (88 UF/ μ g/min), it was further fractionated with PA-CM ion exchange chromatography. After this last step, we observed one active fraction, presenting a single band of 70 kDa (Figure 5, panel B), with a specific activity of 220 UF/ μ g/min on the FRET substrate. In the final chromatography step, the purification factor obtained was 22.9 with a yield of 1% (Table S1).

The protein content from the SDS-PAGE band was extracted and subjected to MS/MS for peptide fingerprint analysis. Using a database that combined sequences restricted to *Tityus* genus from UNIPROT and the transcript sequences of ACE-like peptidase from *Tityus* scorpion venom glands, PeaksDB was able to identify, with high confidence ($\text{FDR} \leq 1\%$), two unique ACE-like peptides from *Tityus serrulatus* (TserSP00939) (Figure 6). Additionally, the pure enzyme was able to convert angiotensin I into angiotensin II, in addition to Abz-FRK(Dnp)P-OH, with specific activity of 0.01 μ M/ μ g/min (Figure 5, panel C).

Figure 5. Purification of ACE-like enzyme from *Tityus serrulatus* venom. **(A)** Fraction 1 was fragmented in gel filtration Diol-300 column, and F1-2 was the only fraction able to cleave the FRET substrate. SDS-PAGE showed a separation of low molecular weight bands. **(B)** Profile of the fraction F1-2 on a cation exchange column (black line), with F1-2.7 being the fraction with the highest peptidase activity, and resulting in a single protein band in 13% SDS-PAGE. In order to maintain the activity, after each step the buffer was immediately changed to 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂ buffer, pH 7.0, using a 10 kDa molecular weight cutoff membrane. The grey line represents the NaCl gradient. **(C)** Conversion of angiotensin I into angiotensin II by the purified ACE-like enzyme. The details of the experiments are described in Section 4.8.

1 MLHAFIILYS SINCKHSAL QEHFAHFVR HANEVNEKQC NLFQTAYWNY DTNITIFNKN KMIQQMIAS NVSKKIWGLV
81 TKFPWKKFSD PQLRRQFYQL SFLGDSALSD DKLRRKSSLE ADMTKIYSTT TICDFTNKNK CNLSLDPDLS NILANSNNYY
161 ELLYVWKEWR NKGVRKIKPL YWFEVHLKNE AARLNGFKNA GEFQREKYES PTLIQDLEDL WQIRPLYQQ LHAYVRRRLI
241 EKYGNDKISA DGPIPAHLG NMWSQEWQNI INITIPYRNK PSLDVTQMK AKGMKPVQIA KLAERFFVSL GLKPMTEFW
321 SNSLLEKPKD RKKVCHASAW DLCKNRDFRI KCMETTMDF LITTHHEMGG VQYMQYANQ PHVFRKGANP GFHEAIGDVM
401 SLSVYTPNHL QSIGLMNYTV SDREGDINFL LQMAKKIAF LPYGYLDKW RWGVYSGEVE LDEWNTKWE MRKYQGVCP
481 PVRTEIDFD PGAKFHVPAF TPYIRYFISF IIQFQFHEAL CRVTGFGGPL HKCDIYNSKE AGKLISEMMQ MGSSRPWPEA
561 FEKITGTRKM NANSLEYFK PLYEWLKEAN KNETIGWNTI DPTVCP

■ Acetylation (N-term) (+42.01)
■ Desamidation (NQ) (+0.98), Acetylation (N-term) (+42.01)

Figure 6. Tryptic peptides from fraction F1-2.7 that matched with the predicted ACE-like from *T. serrulatus* (GenBank TserSP00939) obtained from transcriptomic analysis. The peptides were found using Peaks DB with FDR $\leq 1\%$.

1.1. Sequence Analysis

We aligned the amino acid sequences of ACE-like peptidases obtained from transcriptomics data analysis from *Tityus serrulatus*, *T. obscurus* and *T. bahiensis* with each other and with human testicular ACE (Table 3).

Table 3. Identity (white) and similarity (grey) between ACE-like from the venom of Brazilian *Tityus* sp. scorpions and *Homo sapiens* testicular ACE (AAA60611.1).

Proteins	TesticularACE <i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)
testicularACE <i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)		39.18%	23.12%	39.18%
<i>T. serrulatus</i> (TserSP00939)	46.39%		67.21%	90.34%
<i>T. bahiensis</i> (JAG85170)	28.16%	67.34%		61.22%
<i>T. obscurus</i> (Tobs01141)	46.53%	92.51%	62.31%	

The identity with human tACE varied from 23% to 39%; however, the metallopeptidase motif was highly conserved throughout the species (Figure S1). The ACE-like sequences of *Tityus serrulatus* (TserSP00939) and *Tityus obscurus* (Tobs01141) had 92.51% of similarity, while the *tbah*ACE-like sequence shared 62.31% and 67.34% similarity with *T. obscurus* and *T. serrulatus*, respectively.

2. Discussion

Using enzymatic assays, protein purification, mass spectrometry analysis, and comparative studies of the transcript sequences in the venom glands of *Tityus* spp. scorpions, we show for the first time the presence of an ACE-like peptidase in the venom of *Tityus serrulatus*.

The venom cleaves physiologically important ACE substrates, such as angiotensin I, bradykinin, and hemopressin, and captopril inhibits this activity. Expected products from these hydrolyses were observed, such as hemopressin 1–7, angiotensin II, BK_{1–5}, and BK_{1–7}, consistent with the ACE specificity for these substrates [33,34]. However, the presence of other fragments indicates the participation of more venom proteases in the cleavage of these substrates. In addition, Abz-FRK(Dnp)P-OH, a substrate specifically designed for ACE [31], was an important tool to identify and purify the ACE-like peptidase on *T. serrulatus* venom, along with the successful ACE inhibition by captopril and BPP 10c [31,35].

At the end of the third chromatography step, we observed a single protein band in the silver-stained gel with molecular mass around 70 kDa that converts angiotensin I into angiotensin II. Thus, the ACE-like enzyme present in *Tsv* has a molecular mass similar to tACE. Besides the precursor of ACE-like peptidase being sequenced by RNA sequencing (GenBank TserSP00939) and the identification of the ACE-like peptidase from *T. serrulatus* through mass spectrometric analysis, the isoform sequences are also present in transcripts from the venom gland of *T. bahiensis* (GenBank JAG85170.1), *T. stigmurus* [30], and *T. obscurus* (GenBank Tobs01141 and GenBank Tobs00978) [36]. Thus, these sequences helped to validate the purification of this enzyme, achieving two unique peptides

from *T. serrulatus*'s ACE-like sequence. Moreover, the alignment indicated high homology between the ACE sequences from Brazilian *Tityus* species and a conserved metallopeptidase motif HHEMGHV with human tACE.

The expressive number of ACE-like enzymes described in invertebrates indicates that this metallopeptidase is conserved throughout evolution [27]. Also, in accordance with our results, the ACE-like enzymes in invertebrates include only a C-domain, similar to the human testicular form of the enzyme. Despite the many studies with ACE in invertebrates, natural substrates for these enzymes are yet to be described [27], and, therefore, their physiological role still needs clarification. In general, ACE-like peptidases show broad substrate specificity, cleaving a large number of peptides in vitro [33]. The exceptions are peptides with proline residues at the penultimate position, such as BPPs [37].

Studies have shown that male fruit flies with mutations in the ACE gene are sterile [38]. Other studies suggest a possible physiological role of ACE-like peptidases in the midgut of invertebrates, but solely based on their presence in this region [39,40]. Also, the presence of ACE-like enzymes in the neuropil area of insect brains, and the ability of the enzyme to cleave insect tachykinin (Lom TK-1) in vitro, may indicate that this enzyme participates in the processing of neuropeptides [41,42]. In this scenario, we hypothesize that the ACE-like peptidase present in *T. serrulatus* venom contributes to the ability to capture or kill prey.

Moreover, the presence of this enzyme in the venom may be related to forming endogenous peptides in *Tsv*, since a proteomic study identified post-translational modifications of toxins in this venom and showed that about 80% of the venom molecules are degraded by endogenous peptidases, particularly amino and carboxypeptidases [19]. Also, a recent report from our group showed that metallocarboxypeptidases contribute to inactivate a series of human bioactive peptides [18].

Lastly, we cannot exclude the involvement of this carboxypeptidase in the envenomation. According to Safavi-Hemami and collaborators (2013), who described an angiotensin I-converting enzyme in the venom of cone snails, this enzyme may promote vasoconstriction of blood vessels at the sting site by angiotensin II, along with catecholamine [13]. In fact, animals and patients envenomed by scorpions from the Buthidae family present elevation of plasma renin-angiotensin activity and, consequently, an increase of angiotensin II [43,44]. This observation might, at least in part, be explained by the action of the venom ACE-like enzyme, as we showed here that it is capable of releasing angiotensin II, and victims of *Tityus serrulatus* sting present transient hypertension [45,46]. Until now, neurotoxins were considered the main cause of hypertension in stung patients, due to catecholamine release [7]. However, as Ang II can also stimulate the release of catecholamines, this may contribute synergistically to the hypertension observed in human victims [47,48].

Besides Ang II formation by the whole venom and the purified peptidase, we also observed that *Tsv* acts on Ang I, releasing Ang III, a hypertensive peptide with activity comparable to Ang II [49]. Differently, Ang 1-7, another product of the action of *Tsv*, promotes vasodilation, which would seem to be a contradictory action of the venom. However, envenomed patients commonly present persistent hypotension after the transient hypertension [7]. Heretofore, hypotension could be explained by the presence of hypotensins, which are bradykinin-potentiating peptides that do not inhibit human ACE activity [50]. Our results suggest yet another factor that can contribute to this effect. In addition, and since animal venoms aim to destabilize homeostasis in the prey, the joint action of multiple molecules in the venom (neurotoxins, proteases, among others) is important to cause the envenomation syndrome.

Furthermore, taking into account the possible involvement of ACE-like during the envenomation, especially on hypertension, the in vitro serum neutralization of *Tsv* is an important assay. The antivenom sera represent the only specific therapy available and recommended by the World Health Organization (WHO) to treat incidents involving animal venoms. In case of scorpion envenomation, the administration of either scorpion (SAV) or arachnid (AAV) antivenoms is prescribed; in the most severe cases, it is recommended to use 4–6 ampoules. Our results show that SAV and AAV

produced different levels of neutralization: while SAV caused partial inhibition at lower doses, AAV was slightly more efficient at the highest doses. The effect of the lower SAV concentration is probably due to ACE-like peptidase being present in both scorpion venoms used for the SAV immunization pool (*T. serrulatus*, 50% and *T. bahiensis*, 50%), as is shown in Figure S1, while the venoms used to obtain arachnid antivenom include only one scorpion species (*T. serrulatus*, 57%), together with two spider species (*Phoneutria nigriventer* and *Loxosceles gaucho*). The inhibition observed using high doses of both antivenoms could be a result of some sort of interaction impairment between the ACE-like and the FRET substrate due to the high number of non-specific antibodies, and that might not represent a real neutralization by the antivenom. However, the use of higher doses of antivenom may be injurious to patients, as it can cause adverse reactions known as “serum sickness” [51].

In summary, here we describe, for the first time, the purification and characterization of ACE-like enzyme in *Tityus serrulatus* venom, as well as two fluorescent substrates specific for endo- and carboxypeptidases in this venom. Also, since we observed formation of Ang II in vitro, we hypothesize that this enzyme may also contribute to the hypertension observed in the envenomation syndrome, along with other molecules. Considering that scorpion bites are a critical public health problem in Brazil, this study demonstrates the importance of characterizing new molecules related to envenomation processes as well as evaluating antivenom therapies. The high concentrations of commercially available antivenoms necessary to partially block the ACE-like activity in Tsv may be harmful to victims.

1. Materials and Methods

1.1. Reagents

Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline, dynorphin 1–13 (Dyn 1–13), hemopressin (hemo), angiotensin I (Ang I), bradykinin (BK), captopril, and rabbit lung somatic angiotensin I-converting enzyme (ACE) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were acquired from J.T. Baker. The fluorescent resonance energy transfer (FRET) substrates Abz-GGFLRRV-EDDnp and Abz-FRK(Dnp)P-OH, synthesized with automated solid-phase synthesis [52], were kindly provided by Dr. Adriana Carmona, from the Department of Biophysics of UNIFESP-EPM, São Paulo, Brazil.

1.2. Venoms and Antivenoms

The lyophilized venom of *Tityus serrulatus* (Batch No. 2146 and batch No. 744) were provided by the Venom Section of Instituto Butantan, SP, Brazil. The venoms were submitted to a 10 kDa molecular weight cutoff (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) and stock solution was prepared in 50 mM sodium phosphate and 50 mM NaCl, pH 6.0. The scorpion and arachnid antivenoms (SAV and AAV, respectively) were from the Hyperimmune Plasmas Processing Section, Instituto Butantan, SP, Brazil. The SAV (batch No. 0905104/A) and the AAV (batch No. 0706121) protein concentrations were 8.43 g/dL and 15.4 g/dL, respectively. The antivenoms from Instituto Butantan are produced through hyperimmunization of horses, with a pool of *T. serrulatus* (50%) and *T. bahienses* (50%) venoms for SAV, and *T. serrulatus* (57%), *Phoneutria nigriventer* (21.5%) and *Loxosceles gaucho* (21.5%) venoms for AAV.

1.3. Fluorescent Substrate-Specific for Carboxy- and Endopeptidases, and Peptidase Inhibitors

The substrate-specific assay was carried out using 1 µg *Tityus serrulatus* venom (Tsv) and the fluorescent substrates Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 µM) [18] and Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 µM), in 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 µM ZnCl₂ buffer, pH 7.0. All reactions were monitored by measuring hydrolyses using a fluorimeter (Victor 3™, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA; λ_{em} 420 nm and λ_{ex} 320 nm), at a stable temperature of 37 °C. The measurements of peptidase activity were made for 15 min continuously (one read per minute). The fluorometric assays were analyzed using Grafit 5.0 from

Erithacus Software (version 5.0.6, 1989–2003, Erithacus Software, West Sussex, UK), and the hydrolysis rates (UF/min) were determined. All fluorometric measurements were made in duplicate, and the results are shown as the mean with SD.

For the inhibition of *Tsv*, we used the serine peptidase inhibitor PMSF (2 mM), the metallopeptidase inhibitors 1,10-phenantroline (2 mM) and EDTA (50 mM), and the peptidase-specific inhibitors captopril (100 nM) and BPP 10c (Bradykinin Potentiating Peptide, <ENWPHPQIPP, 16 µM). Control samples included a volume of ethanol equal to that used in the PMSF and 1,10-phenantroline stock solutions. PMSF and 1,10-phenantroline were pre-incubated for 30 min at room temperature before the test.

1.1. Effect of Chloride Ion Concentration on *Tsv* and ACE Activities

The effects of ion chloride on *Tsv* were evaluated in parallel with angiotensin I-converting enzyme (ACE) on fluorometric experiments. For this, *Tsv* and ACE were added to 96-well plates at concentrations of 1 µg and 50 ng, respectively, in 100 mM Tris, 10 µM ZnCl₂, pH 7.0 buffer, at a final volume of 100 µL, with 4 µM Abz-FRK(Dnp)P-OH. Four concentrations of NaCl were tested on *Tsv* and ACE: 0 (control), 10 mM, 20 mM, and 50 mM. All the assays were performed in triplicate, and the specific venom peptidase activities were expressed as units of free fluorescence of the cleaved substrate per µg of venom per min (UF/µg/min).

1.2. In Vitro Serum Neutralization Assays Using Abz-FRK(Dnp)P-OH

The serum neutralization assay of *Tsv* activity upon the Abz-FRK(Dnp)P-OH substrate was performed using different doses of the antivenoms. The *Tsv* (1 µg) was incubated at room temperature with the antivenoms for 30 min in the following concentrations (weight ratio of venom and antivenom, respectively): 0 (control), 1:1; 1:2; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:250; 1:500, and 1:1000. After incubation, the FRET substrate was added, and the residual peptidase activity of the venom measured, in duplicate, as described (Section 4.3).

1.3. Cleavage of Biologically Active Peptides and Inhibition by Captopril

Tsv (0.5 µg) was incubated in 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 µM ZnCl₂ buffer, pH 7.0, at 37 °C with dynorphin 1–13 (30 µM), for 70 min; hemopressin (30 µM) for 2 h; angiotensin I (30 µM) for 4 h; and bradykinin (30 µM) for 6 h. Captopril was used at 100 nM and 1 µM final concentrations. EDTA was also used at 100 mM final concentration. All experiments were performed in duplicate, and the results are shown as the mean with SD. Hydrolyses were analyzed by reverse-phase HPLC (Prominence, Shimadzu, Japan), with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, as solvent A, and acetonitrile and solvent A (9:1), as solvent B. Separations were performed at a flow rate of 1 mL/min, using a Restek Ultra C-18 column (4.6 mm × 250 mm) and a 20%–60% gradient of solvent B over 30 min. In all cases, elution was followed by measurement of ultraviolet absorption (214 nm). The specific activities were expressed in µM of hydrolyzed substrate per µg of venom per minute (µM/µg/min) and the inhibition of venom peptidase activity was calculated by comparing the peptide areas.

1.4. Mass Spectrometry Analysis of Ang-I and BK Fragments Produced by *Tsv*

The products of the hydrolysis of angiotensin-I and bradykinin, catalyzed by *Tsv*, were manually collected and subjected to mass spectrometry analysis. The reverse phase chromatography fractions were resuspended in 0.1% formic acid and analyzed by online liquid chromatography in an Easy-nLC Proxeon nanoHPLC system coupled to an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) through a nanoelectrospray ion source. Separation was carried out in a 10-cm column (75 µm i.d. × 350 µm e.d.) packed in-house with 5-µm Jupiter® C-18 beads (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Peptides were eluted with a linear gradient of 5%–30% acetonitrile, in 0.1% formic acid, in 45 min at 300 nL/min. The spectrometer was operated in data-dependent mode and the 10 most intense peaks were selected for CID fragmentation after acquiring each full scan. The settings for

the spectrometer were defined as: high-resolution full MS parameters (1 μ scan; full MS mass range m/z of 200–2000 with an $R = 30,000$ and a target value of 1×10^4 ions; max injection time = 10 ms). For fragment scans the settings were: an isolation window of 2 Da, a max list size of 500, a time window of 30 s, a minimum signal of 5000, activation time = 10 ms and normalized collision energy = 35%.

1.1. Data Analysis

The raw data files were submitted to searches against the angiotensin I and bradykinin sequences using PEAKS Studio (version 8, Bioinformatics Solution, Waterloo, ON, Canada) [53,54]. A decoy database was also searched to calculate False Discovery Rate (FDR) using the decoy-fusion method [53,54]. The search parameters were: no enzyme specificity; precursor mass tolerance set to ± 10 ppm and a fragment ion mass tolerance of ± 0.5 Da; oxidized methionine ($M + 15.994915$ Da) was set as variable modification. The identified peptides were then sorted by their Average of Local Confidence (ALC) to select the best spectra to annotate, and were filtered by $FDR \leq 1\%$.

1.2. Purification of ACE-Like Peptidase from *Tityus serrulatus* Venom

All purification steps were followed by buffer exchange to 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 μ M $ZnCl_2$ pH 7.0, using a 10 kDa molecular weight cut off (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices), taking into account that ACE activity is sensitive to chloride concentrations [32]. Moreover, the protein content of all samples was quantified with the commercial kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA). In order to screen for ACE-like activity, each collected fraction was tested with a fluorometric assay (5% of final volume) using the fluorescent substrate Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 μ M), as described in Section 4.3.

The lyophilized *Tityus serrulatus* venom was dissolved in 5 mL of 20 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 8.2 buffer (final concentration 10 mg/mL). Tsv was first submitted to anion exchange chromatography in an HPLC system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) using a Shim-Pack PA-DEAE column (20 mm $\times$ 100 mm) at 5 mL/min flow. The gradient used was 0%–40% B for 40 min (buffer A containing 20 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 8.2 and buffer B composed of buffer A containing 500 mM NaCl, pH 8.2). Next, fraction 1 was applied to a Shim-pack Diol-300 (7.9 mm $\times$ 50 cm) gel filtration column coupled to an HPLC system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) and was eluted with 200 mM sodium sulfate, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer at 0.5 mL/min flow rate. Then, F1-2, which is the active fraction upon the FRET substrate, was injected into a cation exchange Shim-Pack PA-CM column (20 mm $\times$ 100 mm) in an HPLC system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) at a flow rate of 5 mL/min. The gradient used was 0%–40% B in 40 min, with buffer A containing 20 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7.0 and buffer B the same as buffer A but with 500 mM NaCl, pH 7.0. For all chromatographic steps, UV detection was at 280 nm. Lastly, the homogeneous ACE-like peptidase (100 ng) was incubated with angiotensin I (30 μ M) overnight, in 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 μ M $ZnCl_2$ buffer, pH 7.0 and the hydrolysis was verified by HPLC, as described in Section 4.6.

1.3. Purified Protein Characterization

1.3.1. SDS-PAGE – In-Gel Digestion and Mass Spectrometry

The active fractions of each purification step were analyzed by 13% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as previously described [55]. Samples were solubilized in non-reducing sample buffers, and protein profiles were visualized by silver stain.

The 70-kDa protein band corresponding to ACE-like peptidase, obtained after the last purification step, was subjected to an in-gel digestion with trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [56]. The mixture was then desalted, concentrated, and resuspended in 0.1% formic acid. Mass spectrometric analysis was performed by online liquid chromatography in an Easy-nLC Proxeon nanoHPLC system coupled with an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) through a nanoelectrospray ion source. Raw data files were analyzed on PEAKS Studio (version 8.0, Bioinformatics Solution, Waterloo, ON, Canada) [53,54] against the library constructed with sequences

deposited on UNIPROT with restriction to *Tityus* genus with addition of the ACE-like peptidase transcripts sequences from genus *Tityus* [17,30] (GenBank JAG85170.1, Tobs01141, TserSP00939), with a total of 383 sequences. A decoy database was also searched to calculate the false discovery rate (FDR) using the decoy-fusion method [53,54]. The search parameters were: trypsin cleavage specificity (max 1 missed cleavages); precursor mass tolerance set to 0.5 Da; and a fragment ion mass tolerance of 0.1 Da. Regarding Post Translational Modifications (PTM), we set carbamidomethylation as fixed modification and oxidized methionine, deamidation of asparagine and glutamine (NQ), and acetylation of *N*-term as the variable modifications. The peptide sequences that resulted from MS/MS were analyzed in Peaks DB and the matched peptides were filtered by $FDR \leq 1\%$, and protein confidence score $-10\lg P \geq 62$.

1.1.1. Bioinformatic Analysis

The deduced sequences of ACE-like peptidase transcripts from the gland of *T. serrulatus* (GenBank TserSP00939), *T. bahiensis* (JAG85170.1) [17], and *T. obscurus* (GenBank Tobs01141) were aligned with human testicular ACE sequence (SwissProt) using MEGA 6 software (Arizona State University, Phoenix, AZ, USA, 2014). Identities and similarities were calculated using the SIAS server, aligned by “Length of Multiple Sequence Alignment” using the BLOSUM62 matrix.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2072-6651/8/12/348/s1, Table S1: Summary of the purification protocol of Angiotensin-converting enzyme-like from *Tityus serrulatus* venom; Figure S1: Sequence alignment of testicular ACE from *Homo sapiens* (AAA60611.1) with venom ACE-like from the scorpions *Tityus serrulatus* (TserSP00939), *T. bahiensis* (JAG85170), and *Tityus obscurus* (Tobs01141). The metallopeptidase motif HEXXH is marked in black, peptides found by mass spectrometry are underlined, and conserved regions are highlighted in gray.

Acknowledgments: This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo [Project 2015/15364-3 and Project 2013/15343-0] and INCTTOX-CNPq. We would like to express our sincere gratitude to Ismael Feitosa Lima for assistance with mass spectrometry.

Author Contributions: D.C.-C. planned and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; A.K.K. performed and planned experiments, analyzed data, and wrote the paper; B.D. planned experiments, analyzed data, and wrote the paper; L.K.I. contributed reagents and analysis tools; Ú.C.d.O. planned and performed experiments, and analyzed data; I.d.L.M.J.d.A. planned experiments and contributed reagents; R.T.K. planned and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; F.V.P. planned experiments, analyzed data, contributed reagents, and wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lourenço, W.; Cuellar, O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. *J. Venom. Anim. Toxins* **1995**, *1*, 51–62. [[CrossRef](#)]
2. Pimenta, A.M.; De Marco Almeida, F.; de Lima, M.E.; Martin-Eauclaire, M.F.; Bougis, P.E. Individual variability in *Tityus serrulatus* (scorpiones, buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 413–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cupo, P.; Jurca, M.; Azeedo-Marques, M.M.; Oliveira, J.S.; Hering, S.E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1994**, *36*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Henriques, M.C.; Gazzinelli, G.; Diniz, C.R.; Gomez, M.V. Effect of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. *Toxicon* **1968**, *5*, 175–179. [[CrossRef](#)]
5. 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. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *141*, 85–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. 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*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7405–7416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Cologna, C.T.; Marcussi, S.; Giglio, J.R.; Soares, A.M.; Arantes, E.C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: An overview. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 920–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Alvarenga, É.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 J. Genet.* **2012**, *2*. [[CrossRef](#)]
9. Horta, C.C.; de Freitas Magalhães, B.; Oliveira-Mendes, B.B.; do Carmo, A.O.; Duarte, C.G.; Felicori, L.F.; Machado-de-Ávila, R.A.; Chávez-Olortegui, C.; Kalapothakis, E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: New insights into its role in envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Serrano, S.M. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* **2013**, *62*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Markland, F.S.; Swenson, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* **2013**, *62*, 3–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Weston, A.J.; Chung, R.; Dunlap, W.C.; Morandini, A.C.; Marques, A.C.; Moura-da-Silva, A.M.; Ward, M.; Padilla, G.; da Silva, L.F.; Andreakis, N.; et al. Proteomic characterisation of toxins isolated from nematocysts of the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis*. *Toxicon* **2013**, *71*, 11–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Safavi-Hemami, H.; Möller, C.; Mari, F.; Purcell, A.W. High molecular weight components of the injected venom of fish-hunting cone snails target the vascular system. *J. Proteom.* **2013**, *91*, 97–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dani, M.P.; Richards, E.H.; Isaac, R.E.; Edwards, J.P. Antibacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Insect Physiol.* **2003**, *49*, 945–954. [[CrossRef](#)]
15. De F Fernandes-Pedrosa, M.; de L. M. Junqueira-de-Azevedo, I.; Gonçalves-de-Andrade, R.M.; Kobashi, L.S.; Almeida, D.D.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (araneae, sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genom.* **2008**, *9*. [[CrossRef](#)]
16. Venancio, E.J.; Portaro, F.C.; Kuniyoshi, A.K.; Carvalho, D.C.; Pidde-Queiroz, G.; Tambourgi, D.V. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon* **2013**, *69*, 180–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Oliveira, U.C.; Candido, D.M.; Dorce, V.A.; De L. M. Junqueira-de-Azevedo, I. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. *Toxicon* **2015**, *95*, 52–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cajado Carvalho, D.; Kuniyoshi, A.K.; Kodama, R.T.; Oliveira, A.K.; Serrano, S.M.; Tambourgi, D.V.; Portaro, F.V. Neuropeptide Y family-degrading metalloproteinases in the *Tityus serrulatus* venom partially blocked by commercial antivenoms. *Toxicol. Sci.* **2014**, *142*, 418–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Verano-Braga, T.; Dutra, A.A.; León, I.R.; Melo-Braga, M.N.; Roepstorff, P.; Pimenta, A.M.; Kjeldsen, F. Moving pieces in a venom puzzle: Unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 3460–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ortiz, E.; Rendón-Anaya, M.; Rego, S.C.; Schwartz, E.F.; Possani, L.D. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 1738–1746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. 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 Tissue Res.* **1994**, *278*, 255–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Acharya, K.R.; Sturrock, E.D.; Riordan, J.F.; Ehlers, M.R. ACE revisited: A new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 891–902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hagaman, J.R.; Moyer, J.S.; Bachman, E.S.; Sibony, M.; Magyar, P.L.; Welch, J.E.; Smithies, O.; Krege, J.H.; O'Brien, D.A. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2552–2557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Coates, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 769–773. [[CrossRef](#)]
25. Fourati Ben Mustapha, S.; Coulet, F.; Eyries, M.; De Larouziere, V.; Ravel, C.; Berthaut, I.; Antoine, J.M.; Soubrier, F.; Mandelbaum, J. In vitro fertilization failure of normozoospermic men: Search for a lack of testicular isozyme of angiotensin-converting enzyme. *Basic Clin. Androl.* **2013**, *23*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pan, P.P.; Zhan, Q.T.; Le, F.; Zheng, Y.M.; Jin, F. Angiotensin-converting enzymes play a dominant role in fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21071–21086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Macours, N.; Hens, K. Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 501–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Modica, M.V.; Lombardo, F.; Franchini, P.; Oliverio, M. The venomous cocktail of the vampire snail *Colubraria reticulata* (mollusca, gastropoda). *BMC Genom.* **2015**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Morgenstern, D.; Rohde, B.H.; King, G.F.; Tal, T.; Sher, D.; Zlotkin, E. The tale of a resting gland: Transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon* **2011**, *57*, 695–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Almeida, D.D.; Scortecchi, K.C.; Kobashi, L.S.; Agnez-Lima, L.F.; Medeiros, S.R.; Silva-Junior, A.A.; De L. M. Junqueira-de-Azevedo, I.; de F Fernandes-Pedrosa, M. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC Genom.* **2012**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Araujo, M.C.; Melo, R.L.; Cesari, M.H.; Juliano, M.A.; Juliano, L.; Carmona, A.K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8519–8525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yates, C.J.; Masuyer, G.; Schwager, S.L.; Akif, M.; Sturrock, E.D.; Acharya, K.R. Molecular and thermodynamic mechanisms of the chloride-dependent human angiotensin-I-converting enzyme (ACE). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 1798–1814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bernstein, K.E.; Ong, F.S.; Blackwell, W.L.; Shah, K.H.; Giani, J.F.; Gonzalez-Villalobos, R.A.; Shen, X.Z.; Fuchs, S.; Touyz, R.M. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 1–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Blais, P.-A.; Côté, J.; Morin, J.; Larouche, A.; Gendron, G.; Fortier, A.; Regoli, D.; Neugebauer, W.; Gobeil, F. Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice: A comparative study. *Peptides* **2005**, *26*, 1317–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Camargo, A.C.; Fernandes, B.L.; Cruz, L.; Ferro, E.S. Bioactive peptides produced by limited proteolysis. In *Colloquium Series on Neuropeptides*; Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael, CA, USA, 2012; pp. 1–92.
36. Oliveira, U.C.; Nishiyama, M.Y., Jr.; Santos, M.B.V.; Silva, A.P.S.; Chalkidis, H.M.; Imberg, A.S.; Candido, D.M.; Yamanouye, N.; Dorce, V.A.C.; de Azevedo L. M. Junqueira, I. Proteomics endorsed transcriptomics profile of the venom gland from *Tityus* scorpions. Unpublished work; manuscript in preparation.
37. Cheung, H.S.; Wang, F.L.; Ondetti, M.A.; Sabo, E.F.; Cushman, D.W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 401–407. [[PubMed](#)]
38. Tatei, K.; Cai, H.; Ip, Y.T.; Levine, M. Race: A drosophila homologue of the angiotensin converting enzyme. *Mech. Dev.* **1995**, *51*, 157–168. [[CrossRef](#)]
39. Isaac, R.E. Neuropeptide-degrading endopeptidase activity of locust (*Schistocerca gregaria*) synaptic membranes. *Biochem. J.* **1988**, *255*, 843–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wijffels, G.; Fitzgerald, C.; Gough, J.; Riding, G.; Elvin, C.; Kemp, D.; Willadsen, P. Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237*, 414–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Schoofs, L.; Veelaert, D.; De Loof, A.; Huybrechts, R.; Isaac, E. Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. *Brain Res.* **1998**, *785*, 215–227. [[CrossRef](#)]
42. Isaac, R.E.; Bland, N.D.; Shirras, A.D. Neuropeptidases and the metabolic inactivation of insect neuropeptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2009**, *162*, 8–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Murthy, K.R.; Vakil, A.E. Elevation of plasma angiotensin levels in dogs by indian red scorpion (*Buthus tamulus*) venom & its reversal by administration of insulin+tolazoline. *Indian J. Med. Res.* **1988**, *88*, 376–379. [[PubMed](#)]
44. Bawaskar, H.S.; Bawaskar, P.H. Scorpion sting: Update. *J. Assoc. Physicians India* **2012**, *60*, 46–55. [[CrossRef](#)]
45. Sofer, S.; Shahak, E.; Gueron, M. Scorpion envenomation and antivenom therapy. *J. Pediatr.* **1994**, *124*, 973–978. [[CrossRef](#)]
46. Bucarety, F.; Fernandes, L.C.; 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* **2014**, *89*, 17–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Peach, M.J.; Cline, W.H.; Watts, D.T. Release of adrenal catecholamines by angiotensin. II. *Circ Res* **1966**, *19*, 571–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Diz, D.I. Another chapter in the understanding of angiotensin-catecholamine interactions relevant to blood pressure control. *Exp. Physiol.* **2014**, *99*, 1595–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Reaux, A.; Fournie-Zaluski, M.C.; Llorens-Cortes, C. Angiotensin III: A central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol. Metab.* **2001**, *12*, 157–162. [[CrossRef](#)]
50. Verano-Braga, T.; Figueiredo-Rezende, F.; Melo, M.N.; Lautner, R.Q.; Gomes, E.R.; Mata-Machado, L.T.; Murari, A.; Rocha-Resende, C.; Elena de Lima, M.; Guatimosim, S.; et al. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* hypotensin-I (TsHpt-i): A new agonist of b(2) kinin receptor. *Toxicon* **2010**, *56*, 1162–1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bahloul, M.; Chabchoub, I.; Chaari, A.; Chtara, K.; Kallel, H.; Dammak, H.; Ksibi, H.; Chelly, H.; Rekik, N.; Ben Hamida, C.; et al. Scorpion envenomation among children: Clinical manifestations and outcome (analysis of 685 cases). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83*, 1084–1092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hirata, I.Y.; Cezari, M.H.S.; Nakaie, C.R.; Boschcov, P.; Ito, A.S.; Juliano, M.; Juliano, L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 299–308. [[CrossRef](#)]
53. Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G. Peaks: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2337–2342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, J.; Xin, L.; Shan, B.; Chen, W.; Xie, M.; Yuen, D.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Lajoie, G.A.; Ma, B. PEAKS DB: De novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol. Cell. Proteom.* **2012**, *11*, M111.010587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J.V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856–2860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Purification and characterization of Angiotensin-Converting Enzyme-like peptidase from *Tityus serrulatus* venom

Daniela Cajado-Carvalho, Roberto Tadashi Kodama, Alexandre Kazuo Kuniyoshi, Bruno Duzzi, Úrsula Castro de Oliveira, Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo, Fernanda Vieira Portaro*.

Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil;

Special Laboratory for Applied Toxinology, Butantan Institute/ Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), São Paulo, SP, Brazil;

*Correspondence address for Fernanda Portaro: Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Av. Prof. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel 55-11-2627-9716
E-mail: fernanda.portaro@butantan.gov.br

Supplementary Information

Supplementary material 1. Summary of the purification protocol of Angiotensin-converting enzyme-like from *Tityus serrulatus* venom

Steps	Fraction	Volume (μL)	Protein (μg)	Activity (UF/min)	Total activity (units* μL)	Specific Activity (units/μg)	Purification factor	Yield (%)
Crude venom	Whole venom	2000	25000	1801	3602000	144,1	1,00	1
DEAE	F1	500	778	1800	900000	1156,8	8,03	100
Gel Filtration	F1-2	500	61	161	80500	1319,7	9,16	1119
PA-CM	F1-2.7	1500	10	22	33000	3300,0	22,90	8186

Supplementary material 2. Sequence alignment of testicular ACE from *Homo sapiens*

(AAA60611.1) with venom ACEs from the scorpions *T. bahiensis* (JAG85170), *Tityus obscurus*

(Tobs01141) and *Tityus serrulatus* (Tser01365). The metallopeptidase motif HEXXH is marked

in black, peptides found by mass spectrometry are underlined and conserved regions

highlighted in grey

Homo sapiens (AAA60611.1) MGQGWATAGLPSLLFLLLCYGHPLLLVPSQEASQQVTVTHGTSSQATTSSSQTTTHQATAHQTSQAQSPNLVTD EAEASKFVE [80]
Tityus bahiensis (JAG85170) - - - - - LLKYVSCYFNVLLEALEML- QAFIIYLS- - - - - SI- - - - - NCCNHSAFQEHFAAHFIR [80]
Tityus obscurus (TobS01141) - - - - - - - - - - - ML- PAFLLYL C- - - - - SI- - - - - SCKYLALEHFAAHFIR [80]
Tityus serrulatus (Tser01365) - - - - - - - - - - - ML- HAFIIYLS- - - - - SI- - - - - NCKKHALQEHFAAHFIR [80]

Homo sapiens (AAA60611.1) E Y D R T S Q V V W N E Y A E A N W N Y N T N I T T E T S K I L L Q K N M Q I A N H T L K Y G T Q A R K F D V N Q L Q N T T I K R I I K K V Q D L E R A A L P A [160]
Tityus bahiensis (JAG85170) H A N E V N E K Q C N L F Q T A S W N Y D T D I T I L N K N K M I Q Q Q M I A S N V S K K I W G V L T K F P W K F S D P Q L R R Q F Y Q L S F L G D S A L S D [160]
Tityus obscurus (Tobs0134) H V N E V N E K Q C N L F Q T A S W N Y D T N I T I P N K N K M I Q Q Q M I A S N S K E M W K V L T K F Q W K K F D P Q L R R Q F Y H L S F L G D S A L P S [160]
Tityus serrulatus (Tser01365) H A N E V N E K Q C N L F Q T A Y W N Y D T N I T I F N K N K M I E Q Q M I A S N V S K K I W G V L T K F P W K F S D P Q L R R Q F Y Q L S F L G D S A L S D [160]

<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	Q	E	L	E	E	Y	N	K	I	L	D	M	E	T	T	Y	S	V	A	T	Y	C	H	P	-	-	N	G	S	C	L	Q	L	E	P	D	L	T	N	V	M	A	T	S	R	K	Y	E	D	L	L	W	A	W	E	G	W	R	D	K	A	G	R	A	I	L	Q	F	Y	P	K	Y	V	E	L	I	N	Q	[240]
<i>Tityus bahiensis</i> (JAG85170)	D	K	L	R	K	K	S	S	L	E	A	D	M	T	K	I	Y	S	T	T	T	I	C	D	F	T	N	K	N	K	N	L	S	L	E	P	D	L	S	N	I	L	A	N	S	N	Y	Y	E	L	L	V	W	K	E	W	R	N	K	V	G	R	K	I	K	P	L	Y	W	E	F	V	H	L	K	N	E	[240]	
<i>Tityus obscurus</i> (Tob01141)	D	K	I	R	K	T	S	L	E	A	D	M	T	K	I	Y	S	T	T	T	I	C	D	F	N	K	N	K	N	L	S	L	E	P	D	L	S	N	I	L	A	N	S	N	D	Y	E	L	L	V	W	K	E	W	R	N	K	V	G	R	K	I	R	P	L	Y	W	E	F	V	D	L	K	N	E	[240]			
<i>Tityus serrulatus</i> (Tser01365)	D	K	L	R	K	K	S	L	E	A	D	M	T	K	I	Y	S	T	T	T	I	C	D	F	T	N	K	N	K	N	L	S	L	E	P	D	L	S	N	I	L	A	N	S	N	Y	Y	E	L	L	V	W	K	E	W	R	N	K	V	G	R	K	I	K	P	L	Y	W	E	F	V	H	L	K	N	E	[240]		

<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	A A R L N G Y V D A G D S W R S M Y E T P S L E Q D L E R L F Q E L Q P L Y L N L H A Y V R R A L L H R H Y G A Q H I N L E G P I P A H L L G N M W A Q T W S N I	[320]
<i>Tityus bahiensis</i> (JAG85170)	A A R L N G F K N A G E F Q R E K Y E S P T L I Q D L E D L W Q Q I R P L Y Q Q L H A Y V R R R L I E K Y G N D K I S A H G P I P A H L L G N M W S Q E W Q N I	[320]
<i>Tityus serrulatus</i> (Tos01146)	A A R L N G F N D A G E F Q R E K Y E S P T L I Q D L E K L W H Q I R P L Y Q Q L H A Y V R R R K L I E M Y G S D K I V K D G P I P A H L L G N M W S Q E W Q N I	[320]
<i>Tityus serrulatus</i> (Tob01335)	A A R L N G F N D A G E F Q R E K Y E S P T L I Q D L E D L W Q Q I R P L Y Q Q L H A Y V R R R L I E K Y G N D K I S A D G P I P A H L L G N M W S Q E W Q N I	[320]

<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	Y	D	L	V	V	P	F	P	S	A	P	S	M	D	T	T	E	A	M	L	K	Q	G	W	T	P	R	R	M	F	K	E	A	D	D	F	F	T	S	L	G	L	L	P	V	P	P	E	F	W	N	K	S	M	L	E	K	P	T	D	G	R	E	V	V	C	H	A	S	A	W	D	F	Y	N	G	K	D	F	R	[400]
<i>Titius bahiensis</i> (JAG85170)	I	N	I	T	I	P	Y	R	N	K	P	S	L	D	V	T	P	Q	M	K	A	K	G	M	K	P	V	Q	I	A	K	L	A	E	Q	F	F	V	S	L	G	L	K	P	M	T	K	E	F	W	S	N	S	L	L	E	K	P	K	D	R	K	V	V	C	H	A	S	A	W	D	L	C	N	K	R	D	F	R	[400]	
<i>Titius obscurus</i> (Tobs01134)	I	N	I	T	M	P	Y	R	N	K	P	S	L	D	V	T	P	Q	M	K	A	K	G	M	T	P	V	Q	I	A	K	L	A	E	Q	F	F	V	S	L	G	L	K	P	M	T	K	E	F	W	S	N	S	L	L	E	K	P	K	D	R	K	V	V	C	H	A	S	A	W	D	L	C	D	K	R	D	F	R	[400]	
<i>Titius serrulus</i> (Tser01365)	I	N	I	T	I	P	Y	R	N	K	P	S	L	D	V	T	P	Q	M	K	A	K	G	M	K	P	V	Q	I	A	K	L	A	E	Q	F	F	V	S	L	G	L	K	P	M	T	K	E	F	W	S	N	S	L	L	E	K	P	K	D	R	K	V	V	C	H	A	S	A	W	D	L	C	N	K	R	D	F	R	[400]	

Homo sapiens (AAA60611.1) I K Q C T V N L E D L V V A H H E M G H Q Y F M Q Y K D L P V A L R E G A N P G F H E A I G D V L A L S V S T P K H L H S L N L L S S E G G S D E H D I N F [480]
Titius bahiensis (JAG85170) I K M C M E T T M D F L I T T H H E M G H V Q Y Y M Q Y A D Q P H V F R K G A N P G K F * - - - - - [480]
Titius obscurus (Tob01141) I K M C M E C T M D F L I T T H H E M G H V Q Y Y M Q Y A N Q P H V F R K G A N P G F H E A I G D V M S L S V Y T P N H L Q S I G L L N D I V S D R E A D I N F [480]
Titius serrulatus (Tsers01365) I K M C M E T T M D F L I T T H H E M G H V Q Y Y M Q Y A N Q P H V F R K G A N P G F H E A I G D V M S L S V Y T P N H L Q S I G L M N Y T V S D R E G D I N F [480]

Homo sapiens (AAA60611.1) L M K M A L D K I A F I P F S Y L V D Q W R W R V F D G S I T K E N Y N Q E W W S L R L K Y Q G L C P P V P R T Q G D F D P G A K F H I P S S V P Y I R Y F V S [560]
Tityus bahiensis (JAG85170) L M K M A L D K I A F I P F S Y L V D Q W R W R V F D G S I T K E N Y N Q E W W S L R L K Y Q G L C P P V P R T Q G D F D P G A K F H I P S S V P Y I R Y F V S [560]
Tityus obscurus (Tobs01141) L L Q M A L K K I A F L P F G Y I L D K W R W E V Y S G E I F E E W N R R W W E M R F K Y Q G V C P P I R R T E I D F D P G A K F H V P A D T P Y I R Y F I S [560]
Tityus serrulatus (Tser01365) L L Q M A L K K I A F L P Y G Y I L D K W R W G V Y S G E V L D E W N T K W W E M R F K Y Q G V C P P V R R T E I D F D P G A K F H V P A D T P Y I R Y F I S [560]

Homo sapiens (AAA60611.1) F I I Q F Q F H E A L C Q A A G H T G P L H K C D I Y S K E A G Q R L A T A M K L G F S R P W P E A M Q L I T G Q P N M S A S A M L S Y F K P L L D W L R T E [640
Tityus bahiensis (JAG85170) F I I Q F Q F H E A L C R V S G F Q G P L H K C D I Y N S K E A G K L I S G M M Q M G S S R P W P E A F E K I T G S R K M N A D S L L E Y F K P L Y E W L K E A [640
Tityus obscurus (Tob01141) F I I Q F Q F H E A L C R V S G F Q G P L H K C D I Y N S K E A G K L I S G M M Q M G S S R P W P E A F E K I T G S R K M N A D S L L E Y F K P L Y E W L K E A [640
Tityus serrulatus (Tser01365) F I I Q F Q F H E A L C R V T G F Q G P L H K C D I Y N S K E A G K L I S E M M Q M G S S R P W P E A F E K I T G T R K M N A N S L L E Y F K P L Y E W L K E A [640

[illegible]

<i>Homo sapiens</i> (AAA60611.1)	S H G P Q F G S E V E L R H S	[735]
<i>Tityus bahiensis</i> (JAG85170)	- - - - - - - - - - - - -	[735]
<i>Tityus obscurus</i> (Tob01141)	- - - - - - - - - - - - -	[735]
<i>Tityus serrulatus</i> (Tser01365)	- - - - - - - - - - - - -	[735]