

CRISTIANE CASTILHO FERNANDES DA SILVA

**Estudo das metalopeptidases presentes no veneno
do escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*:
busca de novos substratos**

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

São Paulo

2022

CRISTIANE CASTILHO FERNANDES DA SILVA

**Estudo das metalopeptidases presentes no veneno
do escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*:
busca de novos substratos**

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

Área de concentração: 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

2022

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)

Silva, Cristiane Castilho Fernandes da
Estudo das metalopeptidases presentes no veneno
do escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*: busca de
novos substratos / Cristiane Castilho Fernandes da
Silva; orientador Fernanda Calheta Vieira
Portaro. -- São Paulo, 2022.
107 p.

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

1. Escorpião amarelo. 2. *Tityus serrulatus*. 3.
Veneno. 4. Peptidases. 5. Metalloserrulases. I.
Portaro, Fernanda Calheta Vieira, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Cristiane Castilho Fernandes da Silva.

Título da Tese: Estudo das metalopeptidases presentes no veneno do escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*: busca de novos substratos

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro.

Adiciono a assinada?

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado** () **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos imunomoduladores de proteases e peptídeos do veneno de *Tityus serrulatus*", protocolada sob o CEUA nº 7272080318 (ID 001109), sob a responsabilidade de **Fernanda Cv Portaro e equipe; Carla Cristina Squaiella Baptistão; Cristiane Castilho; Bruno Duzzi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 21/03/2018.

We certify that the proposal "Immunomodulatory effects of proteases and peptides from the venom of *Tityus serrulatus*", utilizing 54 Isogenics mice (54 males), protocol number CEUA 7272080318 (ID 001109), under the responsibility of **Fernanda Cv Portaro and team; Carla Cristina Squaiella Baptistão; Cristiane Castilho; Bruno Duzzi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 03/21/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **04/2019**

Área: **Imunoquímica**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **54**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **20 a 22 g**

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

São Paulo, 16 de março de 2021

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



**GOVERNO DO ESTADO
DE SÃO PAULO**

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e
Insumos Estratégicos de Saúde

Instituto Butantan



São Paulo, 9 de maio de 2022

Ofício CEUAIB n.º 08/2022

Ref: Protocolo CEUAIB 7272080318 – “Efeitos imunomoduladores de proteases e peptídeos do veneno de *Tityus serrulatus*”

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) declara que o projeto de doutorado "Estudo das metalopeptidases presentes no veneno do escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*: busca de novos substratos" desenvolvido pela aluna Cristiane Castilho Fernandes da Silva, sob orientação da Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro, é parte do projeto “Efeitos imunomoduladores de proteases e peptídeos do veneno de *Tityus serrulatus*”, aprovado por esta comissão, sob o número 7272080318. O projeto conta com a colaboração da Dra. Carla Cristina Squaiella Baptistão.

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenadora CEUAIB

À minha vó Ana

À minha vó Maria (in memoriam)

Por todo cuidado, carinho e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a orientação da Dra. Fernanda Portaro, pelo apoio e parceria desde 2015. Por fornecer a segurança e confiança necessárias para o desenvolvimento do projeto, mesmo com todos os contratemplos. Por todos os ensinamentos, pela amizade e principalmente por oferecer essa incrível oportunidade.

Aos meus amigos do laboratório. À velha guarda, Alexandre Kuniyoshi, Bruno Duzzi, Daniela Cajado e Roberto Kodama. Obrigada por terem me recebido tão bem no lab, por todo apoio, por nossas viagens a congressos inesquecíveis, nossas saídas gastronômicas, nossas discussões e principalmente pela amizade. E à nova geração, Priscila Coutinho, Lais Gomes e Lucas Saladini, foi um prazer trabalhar com vocês, que esse senso de colaboração e amizade se mantenha. Desejo toda sorte e espero que aproveitem essa oportunidade da melhor forma que puderem.

Ao Prof. Wilmar Dias da Silva, nossa liderança científica frente ao Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular (CeTICS), por todo apoio.

Agradeço aos funcionários, alunos e pesquisadores do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, por todo auxílio sempre que precisei. Muito obrigada ao Guilherme, Elaine, Lia, Fábio Magnoli, Ana Freire, Marcinha, Rosana, Ana Cláudia, Alécio, Osmair, Priscila, Gisele, Marcos, Felipe, Ângela, Carol e Ramos.

À Dra. Carla Squaiella-Baptistão do Laboratório de Imunoquímica, por toda colaboração nos ensaios celulares, pelos ensinamentos e pela ajuda sempre que necessário.

Ao Dr. Benedito Prezoto do Laboratório de Farmacologia, pelas sugestões e experimento piloto.

À Dra. Daniela Cajado-Carvalho e Dr. Leo Kei Iwai do Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA), e à Dra. Dilza Trevisan-Silva do Centro de Excelência para Descoberta de Alvos Moleculares (CENTD), pelas análises de espectrometria de massas para a identificação das proteínas.

Ao Dr. Daniel Pimenta do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, pelas análises de espectrometria de massas para a determinação dos sítios de clivagem dos substratos.

Aos funcionários, estudantes e diretores do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Laboratório de Imunologia Viral e Laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, por todo auxílio na utilização de equipamentos durante a estruturação do nosso novo laboratório. Em especial à Carol, Alison, Leme, Silvana, Bruna, Débora, Luís, Leandro, Dra. Giovana e Dra. Ana Lucia.

Aos amigos que chegaram com o novo laboratório, Denise Verreschi, Soni Almeida e Luís Andrade, muito obrigada pelas conversas, pelo apoio e por organizarem todo o Laboratório de Estrutura e Função de Biomoléculas.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e em especial, à Eliane e Fábria, por todo o suporte e esclarecimento prestados na secretaria.

Aos funcionários dos setores de TI, manutenção, limpeza e do refeitório do Instituto Butantan, por resolverem nossos problemas de última hora e fornecerem as condições necessárias para que possamos trabalhar.

À minha família; aos meus pais, Cida e João, ao meu irmão Neto e às minhas avós, Ana e Maria, amo vocês. Palavras não são suficientes para demonstrar a gratidão que sinto.

Aos meus irmãos/irmãs de coração, amigos com quem dividi casa e muitos momentos felizes nestes anos. Que agora, para muitos, terei que viajar mais de 1.800 km para visitar. Claudia, Andrea, Kamilla Ana, Simone, Mauricio, Lida e Corina, sou muito sortuda por ter conhecido cada um(a) de vocês e poder ter acompanhado os primeiros anos da Alice.

Aos amigos de longa data, pela alegria que é os encontrar.

E finalmente às agências financiadoras que tornaram possível a realização deste trabalho:

À Fundação Butantan.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

À FAPESP.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios à pesquisa, processo número 2019/20832-7, 2016/06026-0, 2013/07467-1 e 2020/13139-0.

“Cada descoberta, cada progresso, cada aumento da riqueza da humanidade, tem o seu princípio no conjunto do trabalho manual e cerebral do passado e do presente. Logo, com que direito poderia alguém apossar-se da menor parcela desse imenso patrimônio e dizer: ‘Isto é meu, não é vosso’?” Piotr Kropotkin

RESUMO

SILVA, CCF. **Estudo das metalopeptidases presentes no veneno do escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*: busca de novos substratos.** 2022. 107 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O escorpionismo tem crescido de maneira vertiginosa no Brasil nos últimos anos. A ocorrência desses acidentes é associada à adaptação e proliferação dos escorpiões em áreas urbanas, onde encontram abrigo, alimento e ausência de predadores naturais. Aliado a isso, o escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*), espécie responsável pelo maior número de acidentes graves, reproduz-se por partenogênese. O envenenamento por *T. serrulatus* causa dor local podendo acarretar manifestações sistêmicas intensas e, em casos graves, ocasionar insuficiência cardíaca e edema pulmonar que podem ser fatais, sobretudo em crianças. Muitos desses sintomas são atribuídos às neurotoxinas que são peptídeos atuantes em canais iônicos. Abordagens ômicas recentes revelam que mais de 30% do veneno de *T. serrulatus* é composto por enzimas, majoritariamente metalopeptidases, entretanto, pouco se sabe sobre as funções dessas peptidases no envenenamento. Nosso grupo isolou e caracterizou bioquimicamente duas metalopeptidases do veneno de *Tityus serrulatus*, as metalloserrulases 3 e 4 (TsMS 3 e TsMS 4) e, neste trabalho, o efeito destas peptidases sobre macrófagos murinos foi analisado. Ambas não apresentaram citotoxicidade nas concentrações utilizadas (1 e 5 µg/mL), e foram capazes de ativar os macrófagos estimulando a produção de TNF, MCP-1, IL-6 e IL-10. Estes resultados são condizentes com o aumento de mediadores inflamatórios observados em trabalhos utilizando o veneno e na observação clínica de pacientes envenenados. Com as mesmas etapas cromatográficas para o isolamento da TsMS 3 e TsMS 4, foi purificada a antarease, a primeira peptidase estudada do veneno e relacionada a pancreatite, um dos possíveis sintomas do envenenamento. Foram determinadas as condições ótimas de atividade da antarease, assim como conhecidos novos substratos em que ela atua. A atividade *in vitro* da antarease foi parcialmente inibida pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico. Utilizando o mesmo substrato derivado da dinorfina (Abz-FLRRV-EDDnp) e de monitoramento da atividade das TsMS 3, TsMS 4 e antarease, uma nova metalopeptidase foi encontrada na fração F15.2. Esta se diferencia das demais por apresentar condições ótimas de atividade em pH 9,0 e a 37 °C. Assim como a antarease, a F15.2 atua sobre a dinorfina A e peptídeo YY, contudo, tem a atividade totalmente neutralizada pelos antivenenos produzidos pelo Instituto Butantan. Análises por espectrometria de massas verificaram os sítios de clivagem preferenciais da antarease e F15.2, que foram identificados como R↓(R/H). Este resultado contribui com a hipótese de que as metalopeptidases do veneno poderiam participar do processo de maturação de biomoléculas, atuando como convertases. Ainda foi verificada a ação do veneno sobre dois novos substratos, um derivado do TNF-α, indicando haver uma TACE-like que pode ter participação no quadro inflamatório presente no envenenamento por *T. serrulatus*. E o segundo, com o substrato Z-FR-MCA, foi verificada a ação de ao menos uma cisteína peptidase que não foi neutralizada pelos antivenenos testados. Deste modo o presente trabalho apresenta novos dados sobre as peptidases presentes no veneno de *Tityus serrulatus* e a capacidade neutralizante dos antivenenos sobre a ação destas, contribuindo para o melhor entendimento dos componentes do veneno e seus possíveis papéis durante o envenenamento.

Palavras-chave: Escorpião amarelo. *Tityus serrulatus*. Veneno. Peptidases. Metalloserrulases.

ABSTRACT

SILVA, CCF. **Study of the metallopeptidases from the venom of the yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Search for new substrates.** 2022. 107 p. Thesis (Ph. D. in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Scorpionism has grown rapidly in Brazil in recent years. The occurrence of these accidents is associated with the adaptation and proliferation of scorpions in urban areas, where they find shelter, food and the absence of natural predators. Allied to this, the yellow scorpion (*Tityus serrulatus*), the species responsible for the largest number of serious accidents, reproduces by parthenogenesis. Envenomation by *T. serrulatus* causes local pain and can lead to intense systemic manifestations and, in severe cases, heart failure and pulmonary edema that can be fatal, especially in children. Many of these symptoms are attributed to neurotoxins, which are peptides that act on ion channels. Recent omics approaches revealed that more than 30% of the *T. serrulatus* venom is composed of enzymes, mostly metallopeptidases, however little is known about the functions of these peptidases in envenomation. Our group isolated and biochemically characterized two metallopeptidases from the *Tityus serrulatus* venom, metalloserrulases 3 and 4 (TsMS 3 and TsMS 4) and, in the present work, the effect of those peptidases on murine macrophages was analyzed. It was verified that both peptidases were not cytotoxic at the concentrations used (1 and 5 µg/mL), and they were able to activate macrophages stimulating the production of TNF, MCP-1, IL-6 and IL-10. This is consistent with the increase of inflammatory mediators observed in studies using the venom, and in the clinical observation of envenomed patients. Following the same chromatographic steps for the isolation of TsMS 3 and TsMS 4, antarease was purified, which is the first peptidase studied from the *T. serrulatus*, and is related to pancreatitis, one of the possible symptoms of envenomation. The optimal conditions for antarease activity were determined, as well as new substrates. The *in vitro* activity of antarease was partially inhibited by antiscorpion and antiarachnidic sera. Using the same dynorphin analogue substrate (Abz-FLRRV-EDDnp) to monitor the activity of TsMS 3, TsMS 4 and antarease, a new metallopeptidase was found in the F15.2 fraction. This one differs from the others metallopeptidases for presenting optimal conditions of activity at pH 9.0 and at 37 °C. Like antarease, F15.2 acts on dynorphin A and peptide YY, however, its activity is totally neutralized by the antivenoms produced by the Butantan Institute. The preferred cleavage sites of antarease and F15.2 were identified as R↓(R/H) and this result contributes to the hypothesis that the metallopeptidases could participate in the maturation process of biomolecules, acting as convertases. The action of the venom on two new substrates was also verified, one of these is derived from TNF-α, indicating that there is a TACE-like that may play a role in the inflammatory condition present in *T. serrulatus* envenomation. The second, using the substrate Z-FR-MCA, the presence of at least one cysteine peptidase that was not neutralized by the tested antivenoms was observed. Thus, the present work shows new data on the peptidases present in the *T. serrulatus* venom and the neutralizing capacity of antivenoms on their action, contributing to a better understanding of the venom components and their possible roles during envenomation.

Keywords: Yellow scorpion. *Tityus serrulatus*. Venom. Peptidases. Metalloserrulases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia geral externa dos escorpiões	22
Figura 2 - Escorpionismo no Brasil. Dados SINAM 2008 a 2021	23
Figura 3 - O escorpião amarelo, <i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Mello, 1922	25
Figura 4 - Componentes do veneno de <i>T. serrulatus</i>	27
Figura 5 - Perfil cromatográfico da porção acima de 10 kDa do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> em cromatografia por troca aniônica.....	46
Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% das frações do VTs provenientes da cromatografia de troca aniônica.....	48
Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração F4 em coluna de gel filtração	48
Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração F6 em coluna de gel filtração	49
Figura 9 - Atividade enzimática e SDS-PAGE das frações F4.3 e F6.1	50
Figura 10 - Identificação da banda 4.3c (TsMS 3) por espectrometria de massas.....	51
Figura 11 - Identificação da banda 6.1c (TsMS 4) por espectrometria de massas.....	52
Figura 12 - Recromatografia por gel filtração da fração F4.3	53
Figura 13 - Recromatografia por gel filtração da fração F6.1	53
Figura 14 - SDS-PAGE das frações F4.3.3 e F6.1.1	54
Figura 15 - Efeito da TsMS 3 e TsMS 4 sobre a viabilidade de macrófagos.....	55
Figura 16 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados <i>in vitro</i> com a TsMS 3.....	56
Figura 17 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados <i>in vitro</i> com a TsMS 4.....	57
Figura 18 - Atividade da TsMS 3 e VTs sobre o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH ₂	58
Figura 19 - Alinhamento das sequências da TsMS 3 e ADAM 17 humana.....	59
Figura 20 - Perfil cromatográfico da porção acima de 10 kDa do veneno de <i>T. serrulatus</i> em cromatografia de troca aniônica	60

Figura 21 - Atividade hidrolítica das frações do VTs sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp	61
Figura 22 - Perfil cromatográfico das frações F4 - F9 em coluna de gel filtração.....	62
Figura 23 - SDS-PAGE do VTs e das frações F4.3, F5.3, F6.1, F7.1, F8.2 e F9.2	63
Figura 24 - Identificação da banda 8.2 por espectrometria de massas	64
Figura 25 - Alinhamento das sequências da TsMS 1 e antarease.....	65
Figura 26 - Efeito do pH e influência de cátions sobre a atividade da antarease	66
Figura 27 - Efeito da temperatura e de inibidores sítio específicos	67
Figura 28 - Perfil cromatográfico após a incubação da dinorfina A com a antarease.....	68
Figura 29 - Perfil cromatográfico após a incubação do peptídeo YY com a antarease.....	69
Figura 30 - Constantes cinéticas da atividade da antarease sobre Abz-FLRRV-EDDnp.....	70
Figura 31 - Soroneutralização da atividade da antarease <i>in vitro</i>	71
Figura 32 - Perfil cromatográfico da porção maior que 10 kDa do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	72
Figura 33 - Perfil cromatográfico da fração F15 em coluna de gel-filtração e SDS-PAGE de F15.2	73
Figura 34 - Identificação da banda da fração F15.2 por espectrometria de massas	74
Figura 35 - Modelo tridimensional da acutolisina A.....	74
Figura 36 - Efeito do pH e influência de cátions sobre a atividade da fração F15.2.....	75
Figura 37 - Efeito da temperatura e dos inibidores sítio específicos sobre a atividade de F15.2	76
Figura 38 - Perfil cromatográfico após a incubação da dinorfina A com a fração F15.2	77
Figura 39 - Perfil cromatográfico após a incubação do peptídeo YY com a fração F15.2	78
Figura 40 - Soroneutralização da atividade da fração F15.2 <i>in vitro</i>	79
Figura 41 - Alinhamento das metalopeptidases TsMS 3, TsMS 4, antarease e F15.2	79
Figura 42 - Atividade do VTs sobre o substrato Abz-RGFK(Dnp)-OH	81
Figura 43 - Atividade do VTs sobre o substrato Z-FR-MCA	82

Figura 44 - Inibição da atividade do VTs sobre o substrato Z-FR-MCA.....	83
Figura 45 - Modelagem molecular teórica preliminar da TsMS 3 ou ADAM-17.....	88
Figura 46 - Sítios de clivagem preferenciais da antarease	92
Figura 47 - Estrutura predita da antarease pelo AlphaFold.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substratos testados, ajustes de leitura e tampões utilizados no <i>screening</i> de atividade enzimática das frações.	36
Tabela 2 - Atividade hidrolítica sobre Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 das frações do VTs provenientes da cromatografia por troca aniônica (DEAE).	47
Tabela 3 - Identificação das proteínas a partir dos espectros de massas obtidos pelo LTQ-Orbitrap Velos, analisados no programa Peaks Studio 8.5 e confrontados com o banco de dados do Uniprot	50
Tabela 4 - Atividade específica sobre Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 das frações do VTs provenientes da cromatografia por troca aniônica (DEAE).	61
Tabela 5 - Atividade específica das amostras provenientes da cromatografia por gel filtração sobre Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2.	63
Tabela 6 - Resumo das etapas de purificação da antarease.	65
Tabela 7 - Porcentual de identidade e similaridade entre as metalopeptidases encontradas no veneno de <i>T. serrulatus</i> : TsMS 3, TsMS 4, antarease e F15.2.....	80
Tabela 8 - Atividade hidrolítica do VTs > 10 kDa sobre o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH ₂	81
Tabela 9 - Substratos conhecidos da antarease.....	91

ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz	Ácido <i>orto</i> -aminobenzóico
ACE	Enzima conversora de angiotensina-1
ADAM	Desintegrina e metaloprotease
C-terminal	Carboxi-terminal
CRISP	Proteína secretada rica em cisteínas
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dnp	2,4 dinitrofenil
DTT	Ditiotreitol
ECE	Enzima conversora de endotelina
EDDnp	N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System- Bioinformatics Resource Portal</i>
FRET	Substratos com supressão intramolecular de fluorescência
GF	Gel filtração
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
k_{cat}	Constante catalítica
kDa	Quilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LPS	Lipopolissacarídeo
MCA	7-amino-4 metil-cumarina
MCP-1	Proteína 1 quimioatraente de monócitos

MMP	Metaloprotease de matriz
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
N-terminal	Amino-terminal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEP	Neprilisina, também conhecida como endopeptidase neutra
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RP-HPLC	Cromatografia líquida de fase reversa
SAAr	Soro antiaracnídico
SAE	Soro antiescorpiônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TACE	Enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa, também conhecida como ADAM17
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
TsMS	Metallosserrulase
UF	Unidade de fluorescência
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
VTs	Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Escorpionismo	22
1.2 <i>Tityus serrulatus</i>, o escorpião amarelo	24
1.3 Veneno de <i>T. serrulatus</i>	26
1.3.1 <i>Metalopeptidases</i>	27
1.3.2 <i>Outras proteínas ou componentes de maior massa molecular do VTs</i>	29
1.4 Resposta inflamatória induzida pelo veneno de <i>T. serrulatus</i>	30
1.5 Tratamento do envenenamento	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos específicos	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Veneno e antivenenos	34
3.2 Substratos, inibidores de peptidases e demais reagentes utilizados	34
3.3 Quantificação proteica	35
3.4 Avaliação da atividade enzimática sobre substratos peptídicos fluorescentes	36
3.5 Cromatografia de troca aniônica	37
3.6 Cromatografia de exclusão molecular (gel-filtração)	37
3.7 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	38
3.8 Digestão tríplica <i>in gel</i> e identificação por espectrometria de massas	38
3.9 Avaliação da citotoxicidade das metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4	39
3.10 Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias em resposta às metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4	40
3.11 Análises <i>in silico</i>	41
3.11.1 <i>Alinhamento de sequências</i>	41
3.11.2 <i>Identificação dos pontos de clivagem preferenciais pela antarease</i>	41
3.11.3 <i>Predição das regiões do peptídeo sinal e propeptídeo</i>	41
3.11.4 <i>Predição de estrutura terciária da metalopeptidase F15.2</i>	41
3.12 Determinação das condições ótimas para as atividades da antarease e F15.2	41
3.13 Determinação dos pontos de clivagem dos substratos FRET e substratos naturais pela antarease e F15.2	42
3.14 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da constante catalítica (k_{cat}) para a hidrólise de Abz-FLRRV-EDDnp pela antarease	43
3.15 Ensaio de soroneutralização da atividade catalítica da antarease e F15.2	44

3.16 Avaliação da atividade do VTs sobre o substrato Z-FR-MCA	44
3.17 Teste de inibição e soroneutralização da atividade do VTs sobre Z-FR-MCA	44
4 RESULTADOS	46
4.1 Obtenção da TsMS 3 e TsMS 4	46
4.2 Efeito da TsMS 3 e TsMS 4 na viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos.....	54
4.3 Produção de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais murinos estimulados <i>in vitro</i> com as TsMS 3 e TsMS 4	55
4.3.1 Atividade de TsMS 3 sobre MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH ₂	57
4.4 Novas etapas de purificação: Fracionamento do VTs e análise da atividade enzimática.....	60
4.5 Identificação da fração F8.2 – antarease.....	64
4.5.1 Parâmetros bioquímicos da atividade hidrolítica da antarease: influência do pH, presença de sais, temperatura e inibidores classe específicos.....	66
4.5.2 Especificidade da antarease: ponto de clivagem em substrato FRET e substratos naturais.....	67
4.5.3 Parâmetros cinéticos da antarease: determinação K_m e k_{cat}	69
4.5.4 Inibição da atividade da antarease frente aos soros antiaracnídico e antiescorpiônico produzidos pelo Instituto Butantan.....	70
4.6 Atividade e identificação da fração F15.2	71
4.6.1 Parâmetros bioquímicos da atividade hidrolítica de F15.2: influência do pH, presença de sais, temperatura e inibidores classe específicos.....	75
4.6.2 Especificidade da fração F15.2: ponto de clivagem em substrato FRET e substratos naturais	76
4.6.3 Inibição da atividade de F15.2 frente aos soros antiaracnídico e antiescorpiônico produzidos pelo Instituto Butantan	78
4.7 Análise da similaridade entre as metalopeptidases	79
4.8 Ação do VTs sobre o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH ₂	80
4.9 Atividade hidrolítica do VTs sobre o substrato Abz-RGFK(Dnp)-OH.....	81
4.10 Atividade hidrolítica de cisteíno peptidases presentes no VTs.....	82
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS	99

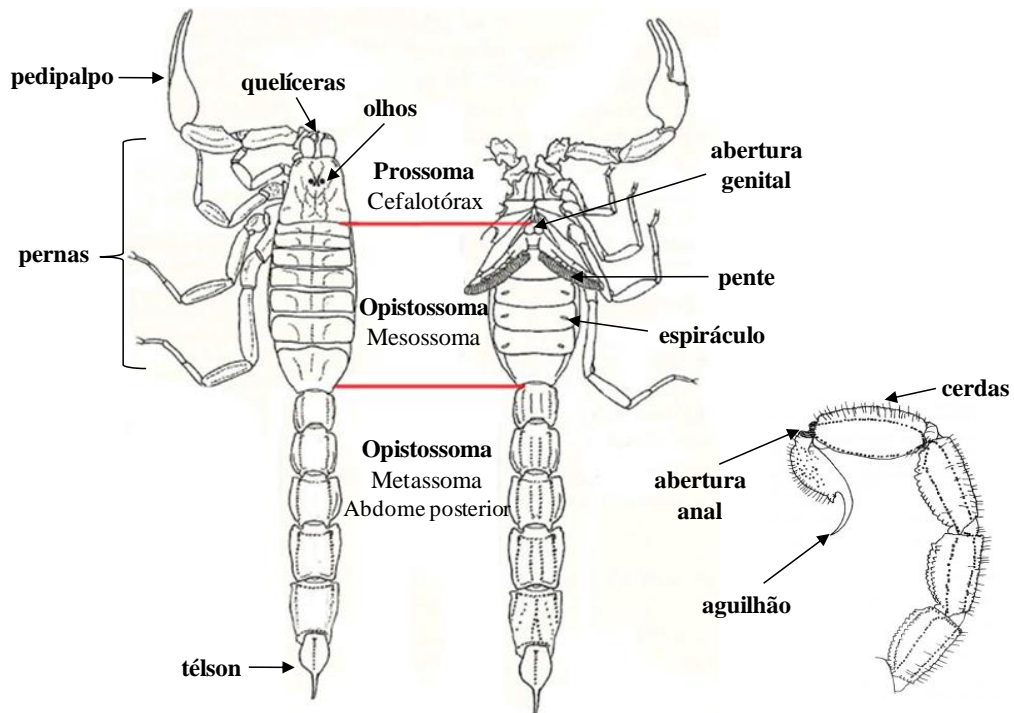
1 INTRODUÇÃO

Os escorpiões estão entre os mais antigos animais terrestres, e seus registros fósseis mais remotos datam do período Siluriano, há mais de 430 milhões de anos (WENDRUFF et al., 2020). Distribuídas por todos os continentes, exceto a Antártica, atualmente estão descritas 2.594 espécies de escorpiões (REIN, 2021). Contudo, a estimativa da diversidade total chega a 7.000 (CODDINGTON; COLWELL, 2001). Estes aracnídeos conservam a morfologia externa bastante similar à de seus longínquos ancestrais, possuindo o corpo dividido em prossoma, região que abrange o cefalotórax e de onde partem os quatro pares de pernas e um par de pedipalpos, e em opistossoma, região do abdome, que é subdividido em mesossoma e opistossoma (Figura 1) (HJELLE, 1990). No final dos segmentos do opistossoma é encontrado o aguilhão ou télson, que abriga o par de glândulas de veneno (MARCUSSEI et al., 2011). Animais de hábitos predominantemente noturnos, com seus olhos medianos e laterais captam a luminosidade e seus vários receptores sensoriais distribuídos pelo corpo, como as cerdas e pentes, detectam vibrações no ar e no solo, estímulos químicos, como feromônios, estímulos térmicos e variação de umidade (MARCUSSEI et al., 2011).

Apesar de serem morfologicamente conservados, apresentam alta plasticidade e adaptação em termos comportamentais, fisiológicos e ecológicos, sendo encontrados nos mais diversos habitats, como em desertos, florestas tropicais, litoral, em altitudes acima de 4.000 metros (Andes e Himalaia) e também em áreas rurais e urbanas (POLIS, 1990; MARCUSSEI et al., 2011).

A vasta maioria das espécies de escorpiões são dióicas, possuindo um complexo comportamento de corte e acasalamento. Após o reconhecimento, o casal realiza uma espécie de dança, "*promenade à deux*", segurando-se pelos pedipalpos a fim de o macho depositar o espermatóforo em um lugar adequado no substrato e juntos se posicionarem para o encaixe na abertura genital, ocorrendo assim a fecundação (POLIS; SISSOM, 1990; MARCUSSEI et al., 2011). Outro fenômeno possível é a reprodução assexuada, com o desenvolvimento do óvulo sem a fecundação. Entre os escorpiões conhecidos, aproximadamente 15 espécies são relatadas como partenogênicas (LOURENÇO, 2018).

Figura 1 - Morfologia geral externa dos escorpiões



Fonte: Adaptado de Almeida, R.B. (2010).

Morfologia geral externa de escorpiões em vista dorsal e ventral, e em detalhe os últimos segmentos do metassoma.

Durante o dia, os escorpiões costumam permanecer em frestas de rochas, cascas de árvores, no interior de tocas, escondendo-se de possíveis predadores como macacos, quatis, aves, sapos e lagartos (PORTO; BRAZIL, 2010). Tem como alimento principalmente insetos e aracnídeos, no entanto algumas espécies de escorpiões podem se alimentar de pequenos vertebrados (MC CORMICK; POLIS, 1990; MARCUSSI et al., 2011). O canibalismo também pode ocorrer entre os escorpiões. Outro fator que contribui para o seu sucesso evolutivo é que assim como algumas aranhas, os escorpiões possuem a taxa metabólica extremamente baixa, conseguindo sobreviver por meses em épocas em que o alimento é escasso (MC CORMICK; POLIS, 1990).

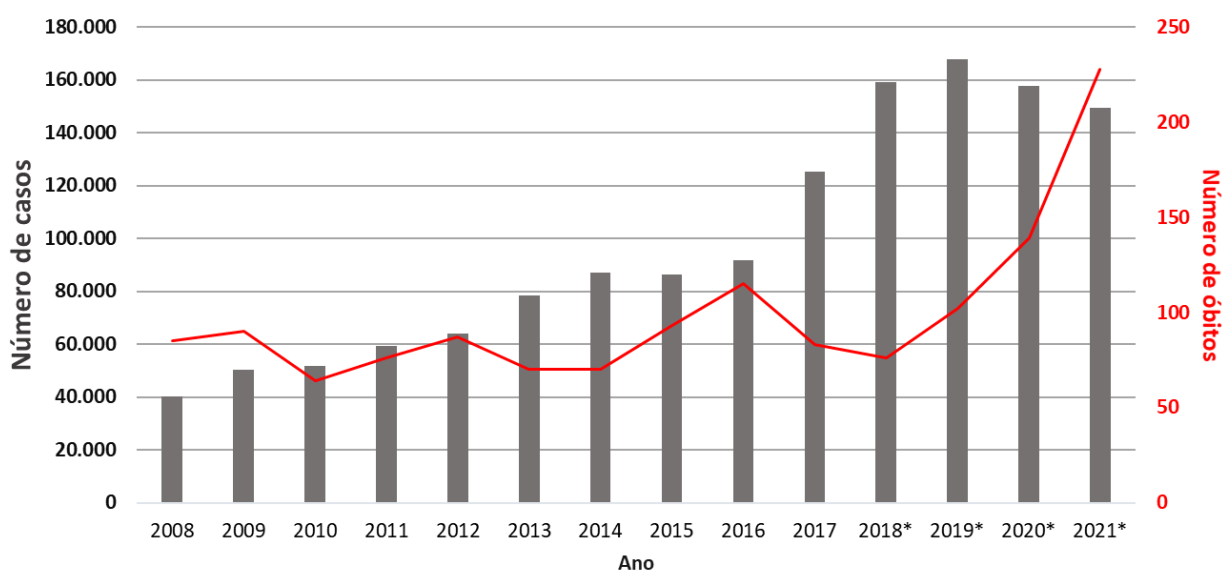
1.1 Escorpionismo

Cerca de 30 espécies de escorpiões são potencialmente perigosas aos humanos. Entre estas constam representantes da família Hemiscorpiidae (*Hemiscorpius* spp.) e Diplocentridae

(*Nebo hierichonticus*) presentes no Oriente Médio (DEHGHANI et al., 2018; AMR et al., 2021). Contudo a vasta maioria pertence à família Buthidae, com os gêneros *Androctonus*, *Hottenta*, *Buthus*, *Leiurus*, *Parabuthus* e *Mesobuthus* presentes na África, Oriente Médio e Índia, *Centruroides* nos Estados Unidos e México, e *Tityus* encontrado na América do Sul (CHIPPAUX; GOUFFON, 2008). Mundialmente é estimada a ocorrência anual de mais de 1.500.000 acidentes e 2.600 mortes decorrentes do escorpionismo (CHIPPAUX, 2012), o que o torna um problema de saúde pública negligenciado que afeta principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

No Brasil, entre os anos de 2008 e 2021, as notificações de acidentes envolvendo escorpiões aumentaram de 40 mil para 149 mil casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) (Figura 2). Sendo o número de acidentes por escorpião superior à soma de casos registrados envolvendo outros animais peçonhentos (serpentes, aranhas, lagartas e abelhas).

Figura 2 - Escorpionismo no Brasil. Dados SINAM 2008 a 2021



Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2022).

* dados de 2018 a 2021 sujeitos à revisão.

Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Pernambuco lideram o número de ocorrências registradas. De forma alarmante, Minas Gerais e Bahia concentram juntos 50% dos óbitos decorrentes do escorpionismo notificados nos últimos dez anos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Por não ser um animal agressivo, os acidentes com humanos ocorrem principalmente por picadas nas mãos e nos pés, como mecanismo de defesa dos escorpiões

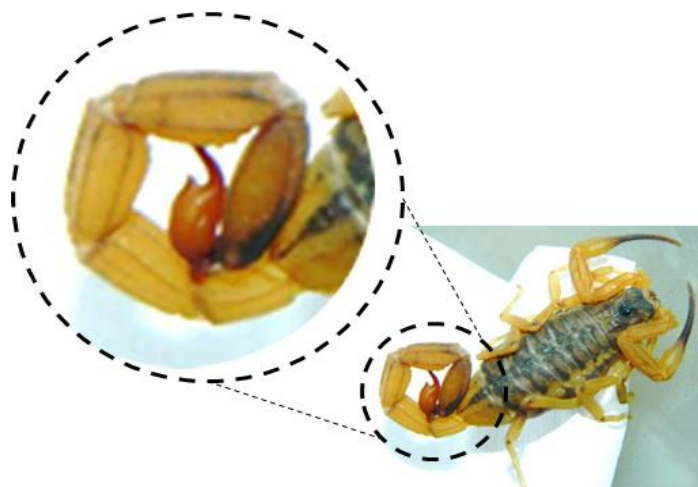
quando pressionados (BÜCHERL, 1969). A gravidade ocasionada pelo acidente escorpiônico varia de acordo com a quantidade de veneno inoculada, a toxicidade, a espécie e tamanho do escorpião, o local da picada, a idade e o estado de saúde do acidentado, o tempo do diagnóstico e do recebimento da soroterapia (BRAZIL; PORTO, 2010).

Desde o início do século XX, o envenenamento humano pela peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*, a fabricação do soro antiescorpiônico e tentativas de combate a proliferação desses animais são motivos de preocupação pública e pesquisa (BRAZIL, V. 1909; DIAS, E.C; LIBANIO, S; LISBOA, H, 1924). O escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*, é considerada a espécie mais perigosa da América do Sul, devido a sua rápida proliferação e expansão em centros urbanos, aliada a alta toxicidade de sua peçonha, e juntamente com outras espécies do gênero *Tityus* (*T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. obscurus*) constituem uma relevante preocupação em saúde pública no Brasil.

1.2 *Tityus serrulatus*, o escorpião amarelo

Descrita em 1922 por Adolpho Lutz e Oswaldo de Mello Campo, a espécie *T. serrulatus* (Figura 3) é endêmica do Brasil. Encontrado principalmente nos estados da região Sudeste, no Paraná, Goiás, Distrito Federal e Bahia e, por ser facilmente transportado por ação humana, teve sua distribuição ampliada para outros estados da região Nordeste, Centro-oeste e Sul do país (BORTOLUZZI et al., 2007; BRASIL, 2009; LOURENÇO, 2015). Em 2019 foi reportada a primeira ocorrência de *T. serrulatus* na região Norte do Brasil, o acidente aconteceu em Belém do Pará com um trabalhador durante o descarregamento de bananas provenientes da Bahia; o quadro clínico do rapaz foi leve (COSTA et al., 2020).

Figura 3 - O escorpião amarelo, *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922



Fonte: Foto por Thiago de Jesus Oliveira, Bruno Duzzi e Daniela Cajado-Carvalho.

O escorpião amarelo adulto pode atingir até 7 cm de comprimento. Possui as pernas e o metassoma amarelos, com uma mancha escura no último segmento do metassoma, próximo ao télson. O prossoma e mesossoma apresentam pigmentação escura. Em destaque, as serrilhas presentes no terceiro e quarto segmento do metassoma.

Em áreas urbanas, o escorpião amarelo pode ser encontrado associado ao lixo e descarte de materiais em terrenos baldios, em cemitérios, em domicílios, nas frestas de paredes, em pilhas de tijolos e materiais de construção, por exemplo (BRASIL, 2009). Nesses locais encontra farta oferta de alimento, como baratas e outros insetos, abrigo e ausência de predadores naturais.

Outro fator que favorece a proliferação do *T. serrulatus* é sua reprodução assexuada, por partenogênese, onde o óvulo se desenvolve sem fecundação por um macho (MATTHIESEN, 1962). A gestação geralmente tem duração de três meses e aproximadamente 20 fêmeas filhotes nascem por ninhada (MARCUSSE et al., 2011). Raros indivíduos machos de *T. serrulatus* foram encontrados em populações de ambientes naturais em Minas Gerais e na Bahia (SOUZA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2014; LIMA et al., 2020). Recentemente o estudo de Braga-Pereira e Santos (2021) sobre o comportamento reprodutivo do escorpião amarelo, sugere que a partenogênese é facultativa na espécie, devido a observação de reprodução assexuada de uma fêmea de *T. serrulatus* proveniente de uma população sexuada e isolada de uma ninhada com machos e fêmeas.

Em relação a sobrevivência de *T. serrulatus*, foi observado que em condições adversas o escorpião amarelo é capaz de suportar mais de um ano sem comida, mas o acesso a água indica ser fator determinante para a sobrevivência (PIMENTA et al., 2019).

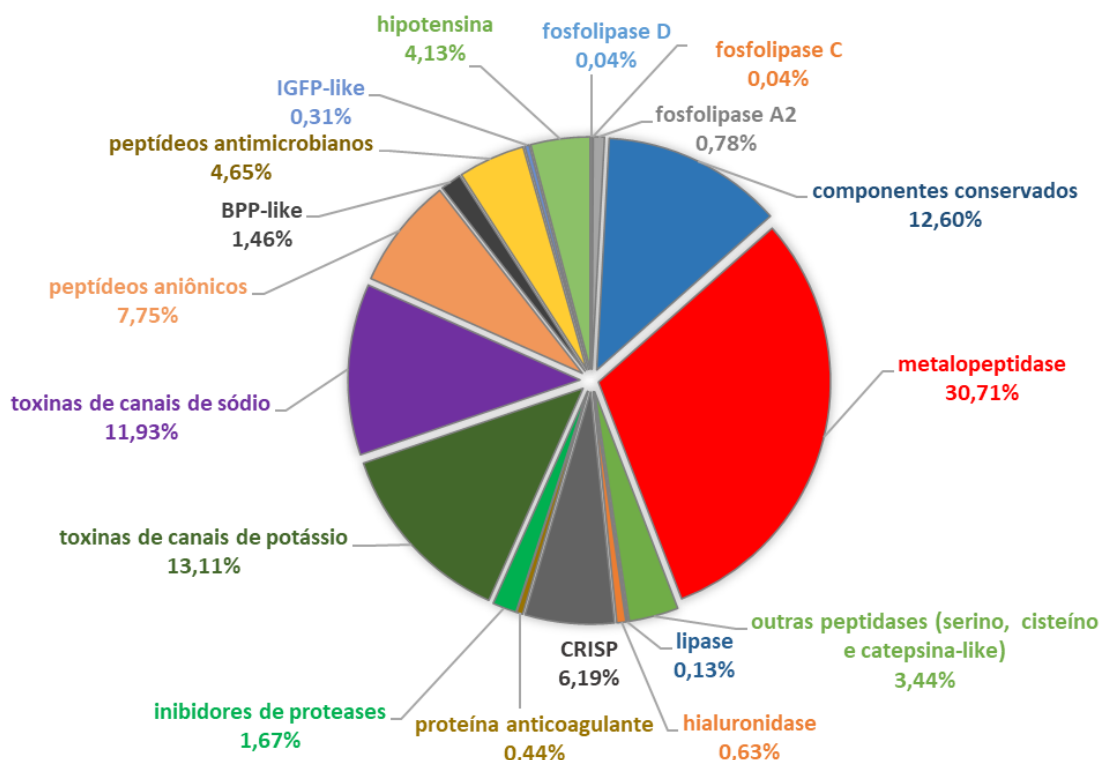
1.3 Veneno de *T. serrulatus*

O acidente ocasionado por *T. serrulatus* é classificado em três níveis, de acordo com as manifestações clínicas observadas; leve, quando há dor e parestesia local; moderado, quando ocorre dor intensa e associada à náusea, vômito, sudorese, sialorreia, agitação, taquipneia e taquicardia, que pode evoluir, principalmente em crianças e idosos, para o terceiro nível de classificação, considerado grave, com manifestações de vômito, sudorese e sialorreia intensas, prostração, convulsão, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e coma (FUNASA, 2001; COLOGNA et al., 2009).

Muitos dos sintomas observados no envenenamento são atribuídos à ação das neurotoxinas presentes no veneno de *T. serrulatus* (VTs) que interagem com canais iônicos, de sódio e potássio, liberando os neurotransmissores catecolamina e acetilcolina. Estes, por sua vez, estimulam o sistema nervoso autônomo, ao passo que direta ou indiretamente afetam os sistemas muscular, endócrino, imune, respiratório, cardiovascular, digestório e excretor (COLOGNA et al., 2009; PUCCA et al., 2015).

Além das neurotoxinas, o veneno de *T. serrulatus* é composto por nucleotídeos, mucosais, aminoácidos livres, lipídeos, inibidores de serino e metalopeptidases, peptídeos potenciadores de bradicinina, hipotensinas e peptídeos antimicrobianos (COLOGNA et al., 2009; PUCCA et al., 2015; DUZZI et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018) (Figura 4). Entre os componentes de maior massa molecular encontram-se proteínas como fatores de crescimento semelhantes à insulina, proteínas secretadas ricas em cisteína e enzimas (lipases, fosfolipases, hialuronidases, serino peptidases, cisteíno peptidases e metalopeptidases) (CAJADO-CARVALHO et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018; AMORIM et al., 2019; CAJADO-CARVALHO et al., 2019).

Figura 4 - Componentes do veneno de *T. serrulatus*



Fonte: Adaptado de De Oliveira et al., (2018).

Análise dos componentes do veneno de *T. serrulatus* por abordagem transcriptômica. BPP, peptídeos potenciadores de bradicinina; IGFP-like, fator de crescimento semelhante à insulina; CRISP, proteína secretada rica em cisteína; Componentes conservados do veneno tais como ACE, enzima conversora de angiotensina e ECE, enzima conversora de endotelina.

1.3.1 Metalopeptidases

As metalopeptidases representam mais de 30% dos componentes do veneno do *T. serrulatus*. Metalopeptidases são hidrolases dependentes de íon metálico, geralmente zinco, podendo ser também cobalto, manganês, níquel ou cobre, para ativação da molécula de água que medeia o ataque nucleofílico à ligação peptídica, realizando a catálise. São divididas em 14 clãs (MA - MT) que comportam aproximadamente 90 famílias (M1 - M82) (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). A antarease foi a primeira metalopeptidase do VTs a ser estudada (FLETCHER et al., 2010). Esta molécula é encontrada de forma conservada entre diferentes espécies de escorpiões da família Buthidae, presentes nas Américas do Sul, Central e do Norte (ORTIZ et al., 2014). A antarease cliva proteínas de membrana associadas a vesículas (VAMPs), alterando o processo de exocitose no tecido pancreático (FLETCHER et al., 2010).

A atividade da antarease pode estar relacionada à pancreatite observada em casos de escorpionismo (FLETCHER et al., 2010; RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

A limitação dos antivenenos antiescorpiônico e antiaracnídico em neutralizar, ao menos em parte, as metalopeptidases do VTs foi verificada por Venancio et al. (2013) e Cajado-Carvalho et al. (2014). Isto evidencia a importância do aprimoramento na fabricação dos antivenenos e a busca, identificação e o estudo da função desses agentes não neutralizados.

Um desses componentes parcialmente neutralizados pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico é a enzima conversora de angiotensina símile (ECA-símile) encontrada no VTs (CAJADO-CARVALHO et al., 2016). Esta dipeptidilcarboxipeptidase, que apresenta aproximadamente 50% de similaridade com a ECA testicular humana, tem a atividade inibida pelo captopril e provavelmente contribui no quadro de hipertensão observado no envenenamento (CAJADO-CARVALHO et al., 2016).

A partir do cDNA da glândula de veneno foram descritas dez metalopeptidases denominadas metaloserrulases (TsMS 1 - 10) (CARMO et al., 2014). Assim como a antarease, as metaloserrulases TsMS 1 - 9 possuem o motivo de ligação de zinco estendido, com uma glicina adicional conservada e uma terceira histidina, ou aspartato, ligado ao zinco (HEXXHXXGXXH/D), característico da família das metzincinas. Enquanto a TsMS 10, é classificada como gluzincina, pois possui o sítio de ligação ao zinco caracterizado pelo motivo HEXXH+E. Adicionalmente estão depositadas no NCBI as sequências das metaloserrulases 11 - 20 (TsMS 11 - 20).

Cajado-Carvalho e colaboradores (2019) isolaram pela primeira vez e definiram parâmetros bioquímicos para as metaloserrulases 3 e 4. A TsMS 3 possui 22 kDa e atividade ótima em pH 8,0, e a TsMS 4 apresenta massa molecular de 24 kDa e maior atividade em pH 8,5. As duas metaloserrulases apresentam atividade ótima em 32 °C. A presença dos cátions monovalentes, Na⁺ e K⁺, afeta positivamente a atividade das duas peptidases, em comparação aos divalentes, como Mg²⁺ e Ca²⁺. Ambas são bem neutralizadas pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico produzidos pelo Instituto Butantan. Tanto a TsMS 3 quanto a TsMS 4 são capazes de hidrolisar *in vitro* os neuropeptídeos da família Y e dinorfina 1-13, sendo a TsMS 3 a única capaz de liberar Leu-encefalina (YGGFL) a partir da clivagem da dinorfina 1-13 (CAJADO-CARVALHO et al., 2019).

Dados do transcriptoma da glândula de veneno de *T. serrulatus* indicam a presença da enzima conversora de endotelina-like (ECE-like) (DE OLIVEIRA et al., 2018). No NCBI estão presentes transcritos da glândula de VTs correspondentes a ECE-like 2 - 10 (GenBank: KR068485.1 - KR068493.1), aminopeptidases (GenBank: AMO02526.1), carboxipeptidases B - S (GenBank: KR068534.1 - KR068533.1) e de uma ADAM 17-like (GenBank: KR068495.1).

1.3.2 Outras proteínas ou componentes de maior massa molecular do VTs

Um dos componentes identificados no veneno de *T. serrulatus*, mas de atividade desconhecida, são as proteínas secretadas ricas em cisteínas, as CRISPs (DE OLIVEIRA et al., 2018; AMORIM et al., 2019). Essas proteínas já foram identificadas em peçonhas de serpentes, lagartos, gastrópodes (*Conus* spp.), aranhas e em outros escorpiões (TADOKORO et al., 2020). As CRISPs de venenos de serpentes desempenham diversas funções, como inibição de canais de cálcio, atividade antiangiogênica, antiprotozoária, e envolvimento em respostas inflamatórias (TADOKORO et al., 2020).

As serino peptidases, componentes frequentemente encontrados em venenos animais, no escorpião amarelo estão aparentemente presentes em menor quantidade. Há evidências dessa presença em abordagens transcriptômica e funcional de atividade tripsina-like e quimotripsina-like do VTs (DE OLIVEIRA et al., 2018; AMORIM et al., 2019).

As cisteíno peptidases e catepsinas-like também foram identificadas em transcritos da glândula de veneno de *T. serrulatus* (DE OLIVEIRA et al., 2018). Sendo muitas dessas peptidases também vistas como participantes do processamento digestivo (FUZITA et al., 2005). Fuzita e colaboradores (2005) indicam ainda que as cisteíno peptidases possuem um importante papel, representando 30% das enzimas digestivas em *T. serrulatus*. As catepsinas são peptidases ativas geralmente em meio ácido, a maior parte das catepsinas (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) são cisteíno peptidases, contudo a catepsina A e G são da classe das serino peptidases e a catepsina D e E pertencem a classe das peptidases aspárticas (TURK et al., 2012). Estão envolvidas em diversos processos além da degradação proteica e morte celular por autofagia e necrose, estando presentes, por exemplo, na apresentação de antígenos mediada por

moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), na remodelação óssea, diferenciação de queratinócitos e ativação de hormônios (TURK et al., 2012).

As hialuronidasas, enzimas que clivam o ácido hialurônico, que são polissacarídeos presentes na matriz extracelular, têm sido associadas a difusão dos componentes do veneno de escorpiões, assim como de aranhas e serpentes, no tecido da presa ou acidentado (PESSINI et al., 2001). Em concordância, Oliveira-Mendes e colaboradores (2019) observaram que a administração de soro anti-hialuronidase foi capaz de retardar significativamente a distribuição do veneno de *T. serrulatus* para a corrente sanguínea e outros órgãos em camundongos.

1.4 Resposta inflamatória induzida pelo veneno de *T. serrulatus*

Magalhães et al., (1999) e Fukuhara et al., (2003) analisaram a produção de mediadores inflamatórios em pacientes envenenados, e estes apresentaram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 alfa (IL-1 α) encontrada em casos leves e moderados, enquanto altos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, interferon gama (IFN- γ) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) estão relacionados aos casos severos de envenenamento por *T. serrulatus*, indicando um prognóstico pior. Em macrófagos murinos, o VTs e as neurotoxinas isoladas, Ts1 (atuante em canais de Na⁺) e Ts6 (atuante em canais de K⁺), também exercem o aumento dos mediadores pró-inflamatórios IL-6, TNF- α e IFN- γ (PETRICEVICH, 2002; ZOCCAL et al., 2011). A produção destes mediadores é induzida pela interação do VTs e Ts1 com os receptores Toll-like 2 (TLR2) e CD14/TLR4 que ativa as vias de NF- κ B e MAPK (ZOCCAL et al., 2014). Enquanto a neurotoxina denominada Ts2 provoca o aumento da produção da citocina anti-inflamatória, IL-10 (ZOCCAL et al., 2011).

Uma vez que a inflamação pulmonar é um dos fatores de risco associados aos acidentes graves por *T. serrulatus*, acrescido ao fato de não existirem informações sobre peptidases relacionadas a este evento, a verificação da produção de mediadores pró ou anti-inflamatórios pelas metaloserrulases isoladas é uma das motivações do presente trabalho. É importante ressaltar que metalopeptidases da família das metzincinas participam de processos inflamatórios via liberação de citocinas. Este é, por exemplo, o caso da TACE, também conhecida como ADAM 17, que cliva o fator de necrose tumoral, TNF- α ancorado na

membrana celular (27 kDa), liberando sua forma solúvel (17 kDa) capaz de induzir inflamação (RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Já foi observado que metalopeptidases encontradas em venenos de serpentes são capazes de liberar TNF- α a partir de seu precursor, podendo contribuir para o quadro inflamatório (MOURA-DA-SILVA et al., 1996). Quanto às metalopeptidases de escorpiões, não há informação sobre a participação nesse processo.

1.5 Tratamento do envenenamento

A maioria dos casos de envenenamento por escorpiões é de sintomatologia leve, com dor local que pode persistir por 24 horas, e o tratamento recomendado nestes casos é o uso de analgésico e observação clínica. À medida que a manifestação dos sintomas de envenenamento incluir vômito, náusea, alterações respiratórias e cardíacas, a classificação do acidente é considerada moderada ou grave, tornando fundamental a utilização da soroterapia o mais rápido possível.

O desenvolvimento de soro antiescorpiônico no Instituto Butantan começou na década de 1910. No Brasil, além do Instituto Butantan, a produção do antiveneno é realizada pela Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil, e destinada ao Ministério da Saúde que garante a distribuição gratuita aos acidentados desde 1988 (HUI WEN et al., 2015). Desde o início, a produção dos soros antiescorpiônico e antiaracnídico utilizados em caso de escorpionismo é feita a partir da imunização de equinos. Após o ano de 1960, com o intuito de diminuir as possíveis reações adversas, a produção de soros compostos pelas imunoglobulinas íntegras de cavalos, acrescentou a etapa de digestão dessas IgGs pela papaína ou pepsina, gerando a porção F(ab')₂ de IgGs, utilizada atualmente em todos os soros antiescorpiônicos feitos no país (SQUAIELLA-BAPTISTÃO et al., 2018).

Embora a soroterapia seja considerada a melhor e mais eficaz medida de tratamento ao escorpionismo, o constante aprimoramento na produção dos antivenenos é buscado. Algumas pesquisas iniciais apontam o uso de imunoglobulinas de aves (IgYs) produzidas em ovos de galinhas como alternativa mais econômica à produção dos soros antiescorpiônicos em cavalos (ALVAREZ et al., 2013; SIFI; ADI-BESSALEM; LARABA-DJEBARI, 2018). Outra abordagem, considerada a nova geração de estratégia imunológica, seria o uso de anticorpos

monoclonais ou fragmentos de anticorpos contra alvos específicos do veneno de escorpiões, estando muitos em desenvolvimento atualmente (LAUSTSEN et al., 2016).

Além da busca por melhora na produção dos soros, terapias complementares utilizando compostos anti-inflamatórios também são alvo de estudos. A administração de dexametasona em camundongos após o envenenamento foi descrita como uma ação capaz de bloquear eficientemente a alta produção de mediadores inflamatórios e a liberação de acetilcolina, associada aos quadros graves de envenenamento (REIS et al., 2020). Assim, esse corticosteroide já utilizado para o tratamento de muitas doenças, poderia se tornar um aliado potente até o devido atendimento hospitalar para administração da soroterapia. Em outro trabalho, Zoccal e colaboradores (2019) investigaram o efeito do hexapeptídeo EP80317 em macrófagos, e observaram a diminuição da produção de mediadores inflamatórios por essas células após a incubação com o VTs. Em camundongos, a molécula ligante do receptor CD36, age como um fator de proteção, diminuindo a mortalidade após o envenenamento (ZOCCAL et al., 2019). O uso de algumas espécies vegetais no tratamento da inflamação e em casos de acidentes com animais peçonhentos é de conhecimento tradicional em algumas regiões, e pesquisas determinaram o efeito inibitório de compostos fenólicos da salva-brava (*Ipomoea asarifolia*) e mangaba (*Hancornia speciosa*), sobre a toxicidade do VTs (LIMA et al., 2014; YAMASHITA et al., 2020).

2 OBJETIVOS

Ampliar o conhecimento sobre o conteúdo proteolítico do veneno de *Tityus serrulatus* (VTs), através do isolamento e caracterização por ensaios funcionais de suas peptidases.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar novas etapas de purificação das metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4 do VTs por diferentes etapas cromatográficas para estudos celulares.

- Avaliar o efeito citotóxico das metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4 sobre macrófagos peritoneais murinos.

- Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , MCP-1 e TNF- α) liberadas por macrófagos peritoneais incubados com concentrações subtóxicas das metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4.

- Avaliar a atividade hidrolítica das frações após cada etapa cromatográfica utilizando substratos fluorescentes na busca de, ao menos, mais uma metalopeptidase do VTs.

- Identificar a estrutura primária das metalopeptidases por espectrometria de massas.

- Caracterizar parâmetros bioquímicos, tais como pH, temperatura e influência de sais na atividade proteolítica de novas metalopeptidases isoladas, assim como a eficácia da soroneutralização.

- Investigar a presença de uma TACE-like, NEP-like e de uma cisteíno peptidase no VTs, utilizando substratos seletivos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno e antivenenos

O veneno de *Tityus serrulatus* (lotes 2200, 2145, 2358, Ts/V160001 e Ts/V170002) foi fornecido em sua forma liofilizada pela Central de Venenos do Núcleo Estratégico de Venenos e Antivenenos (NEVAS) do Instituto Butantan. O veneno foi solubilizado em tampão gelado de acetato de amônio 10 mM, pH 4,0 e em seguida, centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos a 4 °C em microcentrífuga Fresco 21 (ThermoScientific). O sobrenadante foi coletado e a separação da porção proteica do veneno foi realizada utilizando membrana de exclusão molecular de 10 kDa (filtro Amicon Ultra-15 10K - Merck Millipore Ltd.), com a centrifugação da amostra a 4.000 x g por 30 minutos a 4 °C (Centrífuga 5804 R - Eppendorf).

O soro antiescorpiônico (Lote 1209204), composto pela fração F(ab')₂ de imunoglobulinas heterólogas contra o veneno de *Tityus serrulatus*, e o soro antiaracnídico (Lote 1306120) formado pela fração F(ab')₂ de imunoglobulinas heterólogas contra o veneno de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus*, foram fornecidos pelo Núcleo Estratégico de Venenos e Antivenenos (NEVAS) do Instituto Butantan.

3.2 Substratos, inibidores de peptidases e demais reagentes utilizados

Os substratos com supressão intramolecular de fluorescência, FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) Abz-FLRRV-EDDnp e Abz-RGFK(Dnp)-OH foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto e Prof. Dr. Adriana K. Carmona do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os substratos cumarínicos utilizados foram, o Z-FR-MCA obtido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) e o MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ (ES003) obtido da empresa R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Os substratos naturais, dinorfina A (D7017) e peptídeo YY (P1306) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os inibidores enzimáticos utilizados foram o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) adquiridos da Sigma-Aldrich, além do E-64 (5208) e TAPI-1 (6162) adquiridos da empresa Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Os reagentes utilizados no preparo dos tampões, tris hidroximetil aminometano, cloreto de sódio, acetato de amônio, bórax, ácido bórico, fosfato de sódio, sulfato de sódio e bicarbonato de amônio são provenientes da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados nas análises por RP-HPLC, acetonitrila e ácido trifluoroacético (TFA), foram adquiridos na empresa J.T. Baker (Radnor, PA, EUA). Para a realização da digestão *in gel* foram utilizados o ditioneitol (DTT - Molecular Grade V3151), proveniente da Promega (Madison, WI, EUA), a iodoacetamida (IAA - RPN6302), da Cytiva (Marlborough, MA, EUA) e a tripsina (T6567) da Sigma-Aldrich.

Para os ensaios celulares foram utilizados o meio RPMI 1640, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O127:B8 e azul de tripan, adquiridos da Sigma-Aldrich. O soro fetal bovino e a solução de penicilina e estreptomicina foram obtidos da empresa Cultilab (Campinas, SP, Brasil). O brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido da Invitrogen (Waltham, MA, EUA), o dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation foi adquirido da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

3.3 Quantificação proteica

As quantificações proteicas foram realizadas pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando o kit Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad) e pelo método do ácido bicinconínico (BCA), ou reagente de Smith (Smith et al., 1985), utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher) e a proteína albumina sérica bovina (BSA) como referência.

3.4 Avaliação da atividade enzimática sobre substratos peptídicos fluorescentes

A porção do veneno de *Tityus serrulatus* (VTs) com os componentes que apresentam massas moleculares acima de 10 kDa, e as frações obtidas nas etapas cromatográficas, foram submetidas à avaliação de suas atividades enzimáticas. Foi realizado um *screening* de atividade hidrolítica sobre os substratos; Abz-FLRRV-EDDnp, substrato análogo a dinorfina 1-13, Abz-RGFK(Dnp)-OH, substrato conhecido da neprilisina, para *screening* de atividade NEP-like e os substratos cumarínicos, Z-FR-MCA, substrato de maior espectro para serino e cisteíno peptidases e MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂, substrato análogo ao pró-TNF- α , para *screening* de atividade TACE-like. A avaliação foi realizada com 5 μ M de cada substrato, com quantidade variável das frações contendo as peptidases e em tampões específicos (Tabela 1), todas as reações ocorreram com volume final de 100 μ L.

Tabela 1 - Substratos testados, ajustes de leitura e tampões utilizados no *screening* de atividade enzimática das frações.

Substrato	Leitura λ_{EX} e λ_{EM}	Tampão
Abz-FLRRV-EDDnp	320 nm e 420 nm	Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2
Abz-RGFK(Dnp)-OH	320 nm e 420 nm	Tris HCl 50 mM, pH 7,5 ou Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2
Z-FR-MCA	380 nm e 460 nm	Fosfato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, pH 5,5 e 6,25 mM de DTT
MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH ₂	320 nm e 405 nm	Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 ou Tris 25 mM, pH 8,0

As reações enzimáticas foram realizadas em placas brancas opacas de 96 poços (OptiPlate 96 - PerkinElmer) mantidas a 37 °C e monitoradas em fluorímetro Victor 3 (PerkinElmer) ou Hidex Sense 425-301 (Turku, Finlândia) ajustado nos comprimentos de onda de excitação e emissão específicos para cada substrato (Tabela 1), e as leituras ocorreram a cada minuto durante 15 ou 30 minutos. A atividade enzimática foi expressa como unidade de fluorescência livre de substrato clivado por minuto (UF/min) ou como unidade de fluorescência livre de substrato clivado por minuto por μ g de peptidase (UF/min/ μ g). Enquanto a atividade específica foi expressa como μ M de substrato clivado por minuto por μ g de peptidase (μ M/min/ μ g). Para o cálculo da atividade específica, os fluorímetros utilizados foram padronizados pela hidrólise total de 1 μ M de substrato, equivalente a 5370 UF no fluorímetro Victor 3 e 10587 UF no fluorímetro Hidex Sense. Os resultados obtidos em duplicata ou

triplicata foram analisados utilizando o programa Grafit 5.0 (Erithacus software, West Sussex, UK) e os gráficos contendo as médias e os desvios padrões (\pm SD) foram construídos no programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

3.5 Cromatografia de troca aniônica

A porção contendo moléculas acima de 10 kDa do veneno foi submetida à cromatografia de troca aniônica em sistema HPLC (Shimadzu Prominence Co. Japão), utilizando a coluna preparativa Shim-Pack PA-DEAE (20 mm x 100 mm) (Shimadzu Co. Japão) sob o fluxo de 3 mL/min em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,2) previamente filtrados em membrana de poro 0,22 μ m (Merck Millipore). O gradiente foi de 0 - 80% de tampão B em 80 minutos. As frações foram coletadas de acordo com os picos obtidos na detecção em 280 nm. Após as coletas, as frações foram dialisadas utilizando o filtro de exclusão molecular de 10 kDa. A seguir as amostras foram concentradas em SpeedVac (Thermo Scientific), quantificadas e tiveram suas atividades enzimáticas analisadas (item 3.4).

3.6 Cromatografia de exclusão molecular (gel-filtração)

As frações provenientes da etapa de cromatografia de troca aniônica e que apresentaram os maiores níveis de atividade hidrolítica utilizando o substrato FRET Abz- FLRRV-EDDnp foram submetidas a nova etapa cromatográfica de exclusão molecular em coluna analítica Shim-Pack DIOL-300 (7,9 mm x 50 cm) em sistema HPLC (Shimadzu, Co. Japão). Sendo utilizado o tampão de eluição composto por sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, previamente filtrado em membrana de poro 0,22 μ m (Merck Millipore). As amostras foram fracionadas sob fluxo 0,5 mL/min durante 80 minutos. As frações foram coletadas de acordo com os picos obtidos na detecção em 280 nm. Posteriormente, as frações obtidas foram dialisadas, concentradas e tiveram suas atividades enzimáticas analisadas. Algumas frações foram recromatografadas com o objetivo de refinamento da purificação, uma vez que se mostraram complexas nas análises por SDS-PAGE.

3.7 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

As frações ou peptidases isoladas foram avaliadas quanto suas purezas e tamanhos moleculares por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12,5% (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Foi utilizado o sistema de eletroforese Mini Protean Tetra Cell (BioRad, Hercules, EUA). As bandas proteicas foram visualizadas após coloração por nitrato de prata. Como peso molecular de referência foi utilizado Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoScientific #26634).

3.8 Digestão trípica *in gel* e identificação por espectrometria de massas

A identificação das proteínas foi realizada através do método de digestão por tripsina *in gel* adaptado de Hanna et al., (2000). As bandas foram excisadas do gel com o auxílio de lâmina de bisturi e cortadas em pedaços de aproximadamente 1 mm. Os pedaços foram incubados por 3 horas em 500 μ L de solução de descoloramento (50% metanol, 5% ácido acético em água MilliQ), com uma troca de descorante após 2 h. Em seguida, os pedaços de gel foram desidratados com 200 μ L de acetonitrila 100% por 5 minutos, e repetido esse passo. Após a remoção total da acetonitrila por SpeedVac, foi realizada a incubação da amostra em 50 μ L de solução redutora (10 mM de DTT em 100 mM de bicarbonato de amônio) por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução de DTT foi removida e realizada a alquilação da amostra com 50 μ L de solução composta por 50 mM de iodoacetamida em 100 mM de bicarbonato de amônio, essa incubação ocorreu por 30 minutos e protegida da luz. Após a reação, a amostra foi lavada com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos, desidratada com acetonitrila 100% por 5 minutos, e feita a reidratação e desidratação mais uma vez. Após a remoção da acetonitrila por SpeedVac, foi realizada a digestão da amostra com a incubação de 0,25 μ g de tripsina e 100 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM a 37 °C *overnight*. A seguir foi realizada a extração dos peptídeos da matriz de poliácrlamida. Para isso a amostra foi incubada com 50 μ L de solução 1 de extração (ácido fórmico 5% em água MilliQ) por 10 minutos, após o período, o sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para um novo tubo. Em seguida, a amostra contendo os pedaços de gel foi incubada com a solução de extração 2 (ácido fórmico

5%, acetonitrila 50%) por 10 minutos e transferido o sobrenadante para o tubo com os peptídeos do passo anterior. A incubação com a solução 2 foi refeita e coletado o sobrenadante. A amostra com os peptídeos extraídos foi seca por SpeedVac e feita a remoção de sais em minicoluna cromatográfica Zip Tip C18 (Millipore, Billerica, EUA).

Após a remoção de sais, as amostras foram concentradas em SpeedVac, ressuspendidas em ácido fórmico 0,1% e analisadas por cromatografia líquida no Sistema Easy-nLC II acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Waltham, EUA) ou LTQ-XL Linear Ion Trap (Thermo Scientific) em colaboração com a Dr. Daniela Cajado-Carvalho e Dr. Leo K. Iwai do Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) ou por nanocromatografia líquida EASY-nLC1200 (Thermo Scientific) acoplado ao espectrômetro de massas Q Exactive Plus (Thermo Scientific) em colaboração com a Dr. Dilza Trevisan do Centro de Excelência para Descoberta de Alvos Moleculares (CENTD) do Instituto Butantan. Os dados brutos foram analisados utilizando o programa PEAKS Studio versão 8.5 ou Xpro (MA et al., 2003) sendo ajustados os seguintes parâmetros; tripsina como enzima específica, como modificações pós traducionais (PTM) foram selecionadas a carbamidometilação da cisteína como modificação fixa, e oxidação da metionina e deamidação de asparagina e glutamina como modificações variáveis, tolerância de erro do peptídeo precursor de ± 10 ppm, taxa de tolerância de erro do fragmento de $\pm 0,5$ Da e taxa de falso positivo (FDR) de 0,1%. Os espectros de massas foram confrontados com sequências da Ordem Scorpiones depositadas no banco de dados UniProt.

3.9 Avaliação da citotoxicidade das metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4

As metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4 foram avaliadas quanto suas toxicidades em ensaio de viabilidade celular utilizando macrófagos peritoneais murinos em colaboração com a Dra. Carla Cristina Squaiella Baptista do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. Os procedimentos envolvendo os camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA nº 7272080318).

Para a obtenção dos macrófagos, camundongos BALB/c naïve (n = 4) foram eutanasiados em câmara de CO₂, e as células do exsudato peritoneal foram coletadas por duas lavagens com 5 mL de meio RPMI. As células obtidas foram lavadas duas vezes com meio

RMPI, a 400 x g, por 10 minutos, a 18 °C, e ressuspensas em meio R10 (RPMI + 10% de soro fetal bovino). As células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (2 x 10⁵ células/100 µL/poço) e incubadas por 2 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células não aderentes foram descartadas, e as células aderentes (macrófagos) foram ressuspensas em meio R10 contendo as peptidases, nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL, em duplicatas, em volume final de 200 µL/poço. Células ressuspensas em meio R10 foram utilizadas como controle. Após o período de 24 horas de incubação das células com os diferentes estímulos, foram realizados ensaios de viabilidade com a utilização do MTT. Foi adicionado 100 µL de R10 contendo 0,5 mg/mL de MTT por poço, e realizada a incubação por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, e 100 µL de DMSO foram adicionados por poço, para dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. A partir das absorbâncias das amostras e do controle positivo (células cultivadas somente com R10), foi calculada a viabilidade celular.

3.10 Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias em resposta às metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4

A concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , MCP-1 e TNF) nos sobrenadantes de cultura de macrófagos estimulados pelas metalopeptidases TsMS 3 e TsMS 4 foi determinada por método de CBA (BD Cytometric Bead Array - Mouse Inflammation Kit), de acordo com as instruções do fabricante. Células ressuspensas em meio R10 foram utilizadas como controle negativo, e células estimuladas com LPS (5 µg/mL), como controle positivo de ativação de macrófagos. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II, e os dados foram analisados utilizando o *software* BD FCAP Array versão 3.0. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 5, utilizando-se o teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

3.11 Análises *in silico*

3.11.1 Alinhamento de sequências

Para a determinação do porcentual de identidade e similaridade entre as peptidases estudadas foi feito o alinhamento de suas sequências de aminoácidos disponíveis nos bancos de dados do NCBI e Uniprot utilizando o programa Pairwise Sequence Alignment, EMBOSS Water (SMITH; WATERMAN, 1981; LI et al., 2015), e para o alinhamento múltiplo de sequências foi utilizada a ferramenta MUSCLE, Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (EDGAR, 2004).

3.11.2 Identificação dos pontos de clivagem preferenciais pela antarease

A determinação da especificidade primária da antarease baseada na frequência de aminoácidos nas posições P4 - P4' (SCHECHTER; BERGER, 1967) de seus substratos conhecidos foi realizada utilizando a ferramenta IceLogo (COLAERT et al., 2009)

3.11.3 Predição das regiões do peptídeo sinal e propeptídeo

As regiões preditas como peptídeo sinal e propeptídica da metalopeptidase presente em F15.2, número de acesso no Uniprot A0A218QWY7, foram determinadas utilizando os programas SignalP 5.0 (ARMENTEROS et al., 2019) e ProP 1.0 (DUCKERT et al., 2004).

3.11.4 Predição de estrutura terciária da metalopeptidase F15.2

Com o auxílio do programa Phyre2 (KELLEY et al., 2015), foi obtido o modelo tridimensional de maior compatibilidade de acordo com a estrutura primária da F15.2.

3.12 Determinação das condições ótimas para as atividades da antarease e F15.2

A fim de determinar as condições ótimas para a atividade da antarease e da peptidase presente em F15.2 foram realizados os ensaios de variação do pH, da influência da presença de

sais e da variação de temperatura, utilizando o substrato Abz-FLRRV-EDDnp. Para a avaliação da influência do pH foram preparados, de acordo com Stoll e Blanchard (1990), tampão 50 mM fosfato de sódio pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5, tampão 50 mM boráx - ácido bórico pH 8,0, 8,4 e 9,0 e tampão 50 mM bórax-NaOH pH 9,5 e 10. Para este ensaio, 107 ng de antarease ou 0,33 µg de F15.2, com 5 µM de Abz-FLRRV-EDDnp foram incubados em cada pH e a atividade enzimática foi monitorada por 15 minutos a 37 °C em fluorímetro ajustado para λ_{EM} 320 nm e λ_{EM} 420 nm.

Com a determinação do pH ótimo para a atividade hidrolítica, foi verificada a influência de sais mono e divalentes na hidrólise do mesmo substrato FRET pelas peptidases. Sendo adicionado ao tampão no qual foi observado a maior atividade enzimática, 50 mM de cada sal; cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de lítio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio. A reação foi monitorada durante 30 minutos.

Para verificar a influência da temperatura na atividade enzimática, as peptidases foram incubadas a 26, 32, 37 e 42 °C por 15 minutos previamente a adição do substrato. A reação foi monitorada por 30 minutos na temperatura da pré-incubação.

Foi avaliada a atividade da antarease e F15.2 frente aos inibidores de metalo e serino peptidases utilizando 50 mM EDTA e 2 mM PMSF, respectivamente. Para a avaliação da inibição por PMSF foi realizada a pré-incubação por 30 minutos antes da adição do substrato. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.13 Determinação dos pontos de clivagem dos substratos FRET e substratos naturais pela antarease e F15.2

Foram analisados os sítios de clivagem preferencias das peptidases utilizando o substrato FRET Abz-FLRRV-EDDnp, e os peptídeos biologicamente ativos, dinorfina A (1-13) YGGFLRRIRPKLK e peptídeo YY, YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂. Para a determinação do ponto de clivagem do substrato FRET, 107 ng de antarease e 5 µM do Abz-FLRRV-EDDnp foram incubados em tampão boráx - ácido bórico 50 mM, pH 8,0, com volume final de 100 µL, a 37 °C por 30 minutos. Para a F15.2 (0,33 µg), a incubação ocorreu em tampão bórax - ácido bórico

50 mM, pH 9,0. Após o período de incubação, os produtos de hidrólise foram analisados por LC-MS.

A ação da antarease (107 ng) sobre os peptídeos biologicamente ativos, dinorfina A (30 μM) e peptídeo YY (23,2 μM) foi analisada em duas condições de pH; em tampão bórax - ácido bórico pH 8,0 e em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4, com volume final de 100 μL . As mesmas concentrações dos peptídeos biologicamente ativos foram utilizadas para a verificação da atividade de F15.2 (0,33 μg) utilizando o tampão bórax - ácido bórico 50 mM, pH 9,0 e tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4. As incubações ocorreram a 37 °C por 2 horas no caso na dinorfina A e por 6 horas com o peptídeo YY. Após o tempo de incubação, as clivagens dos substratos foram analisadas por RP-HPLC (Shimadzu Proeminence Co., Japão) utilizando a coluna C18 (Restek Ultra C18 5 μm 150 x 4,6 mm). Foram utilizados o solvente A, 0,1% de ácido trifluoroacético em água, e solvente B, composto por acetonitrila e o solvente A (proporção 9:1). O gradiente utilizado foi de 10% a 60% de solvente B em 20 minutos, sob fluxo de 1 mL/min e detecção de absorvância em 214 nm. Os perfis cromatográficos foram obtidos e os picos foram coletados manualmente. Em seguida as amostras foram analisadas por LC-MS em colaboração com o Dr. Daniel Pimenta, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

3.14 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da constante catalítica (k_{cat}) para a hidrólise de Abz-FLRRV-EDDnp pela antarease

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m), as seguintes concentrações do substrato Abz-FLRRV-EDDnp foram utilizadas, 4 μM , 8 μM , 12,5 μM , 17 μM , 20 μM , 42 μM e 50 μM . As concentrações crescentes de substratos foram incubadas com a antarease (85,6 ng) em tampão bórax-ácido bórico 50 mM, pH 8,0 com volume final de 100 μL . O ensaio foi realizado em duplicata e a reação foi monitorada em fluorímetro por 30 minutos a 37 °C. A velocidade máxima, V_{max} e o K_m foram obtidos nos programas Grafit e GraphPad Prism. Para obtenção do k_{cat} foi realizada a conversão de UF/min para $\mu\text{M}/\text{min}$ considerando a hidrólise total de 1 μM de Abz-FLRRV-EDDnp equivalente a 10587 unidades de fluorescência, UF, e a concentração da antarease, considerando sua massa molecular de 25,5 kDa (FLETCHER et al., 2010).

3.15 Ensaio de soroneutralização da atividade catalítica da antarease e F15.2

A capacidade neutralizante do soro antiescorpiônico (SAE) e soro antiaracnídico (SAAr) frente a atividade catalítica da antarease e F15.2 foi avaliada *in vitro*. O experimento consistiu da incubação de 107 ng de antarease e os soros em duas concentrações, 1:10 e 1:100 (μg peptidase: μg antiveneno) em tampão bórax – ácido bórico 50 mM, pH 8,0. Com as mesmas doses de antiveneno, o ensaio com a F15.2 (0,33 μg) ocorreu em tampão bórax - ácido bórico 50 mM, pH 9,0. Esta pré-incubação ocorreu por 30 minutos em temperatura ambiente. Após os 30 minutos, foi adicionado o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 μM) e a reação foi monitorada em fluorímetro a 37 °C por 30 minutos. A velocidade, UF/min, da reação da antarease ou da fração F15.2 apenas com o substrato, e sob as mesmas condições, foi determinada como controle (100% de atividade).

3.16 Avaliação da atividade do VTs sobre o substrato Z-FR-MCA

A atividade hidrolítica da porção acima de 10 kDa do veneno de *Tityus serrulatus* foi analisada utilizando o substrato Z-FR-MCA. Para isso, 1,3 μg do VTs foi incubado com 5 μM do substrato em tampão contendo fosfato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, pH 5,5 e 6,25 mM de DTT. Devido sua instabilidade, o DTT foi adicionado por último ao volume total de tampão utilizado. A reação com volume final de 100 μL foi monitorada em fluorímetro ajustado para as leituras nos comprimentos de onda, λ_{EX} 380 nm e λ_{EM} 460 nm, a 37 °C por 30 minutos. A atividade enzimática foi expressa como unidade de fluorescência livre de substrato clivado por minuto (UF/min). Os resultados obtidos em duplicata foram analisados utilizando o programa Grafit 5.0 (Erithacus software, West Sussex, UK).

3.17 Teste de inibição e soroneutralização da atividade do VTs sobre Z-FR-MCA

Foi verificado o efeito de inibidores de cisteíno, serino e metalopeptidases, assim como dos soros antiescorpiônico e antiaracnídico, sobre a atividade do VTs para a hidrólise de Z-FR-MCA. Para isso, 1,3 μg do VTs foi incubado em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, pH 5,5 e 6,25 mM de DTT com os seguintes inibidores; 10 μM E-64, 2 mM

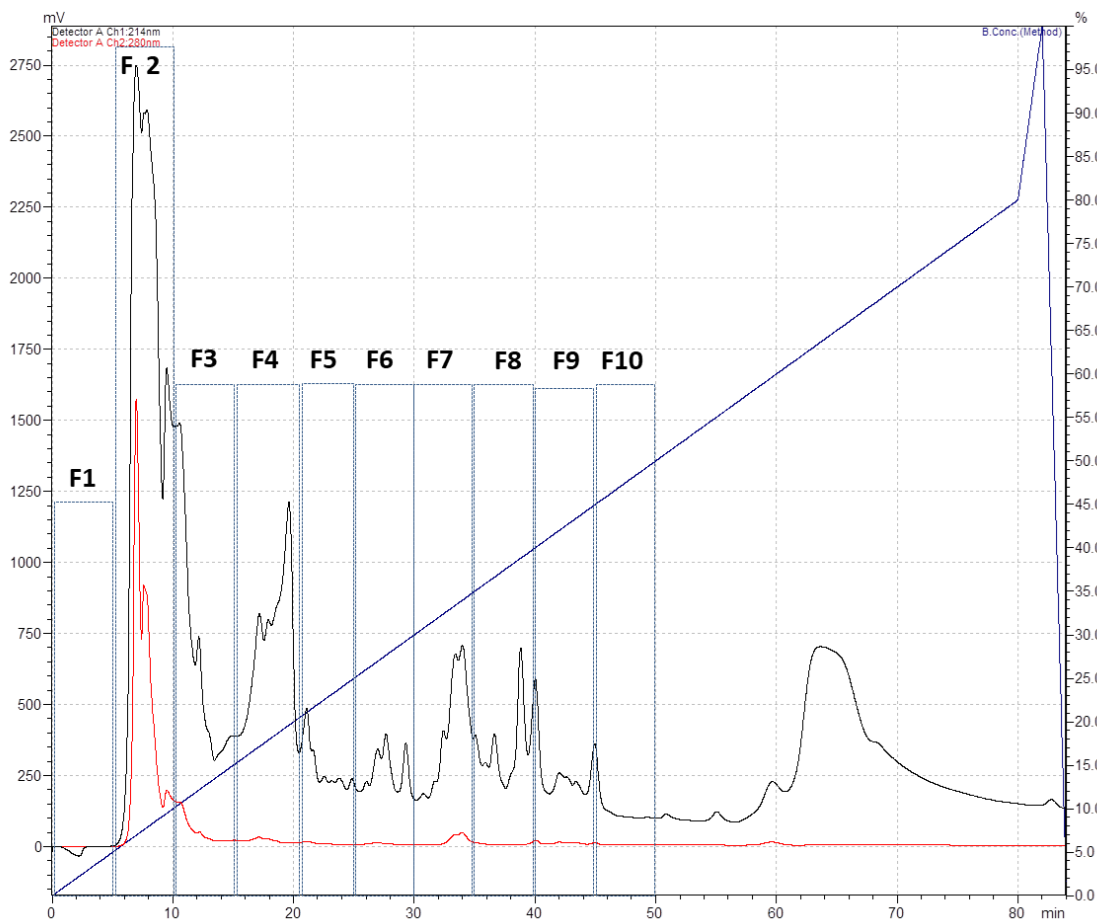
PMSF, 2 mM 1,10-fenantrolina, 50 mM EDTA e em duas concentrações de SAE e SAAR, 1:100 e 1:500 (μg de VTs : μg de antiveneno) por 30 minutos em temperatura ambiente, previamente a adição do substrato ($5 \mu\text{M}$). A reação foi monitorada em fluorímetro a 37°C por 30 minutos. Como controle e comparação de atividade enzimática foi realizada a incubação do VTs com o substrato sob as mesmas condições. Os resultados foram analisados no programa Grafit 5.0 e o gráfico com a média e desvio padrão foi construído no GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção da TsMS 3 e TsMS 4

Aproximadamente 20 mg de veneno de *T. serrulatus* (lotes 2145, 2200 e 2358) foram fracionados em membrana de corte molecular de 10 kDa, e a porção contendo moléculas com massas moleculares acima de 10 kDa foi submetida à cromatografia por troca aniônica DEAE (Figura 5) de acordo com o isolamento das metaloserrulases descrito por Cajado-Carvalho e colaboradores (2019).

Figura 5 - Perfil cromatográfico da porção acima de 10 kDa do veneno de *Tityus serrulatus* em cromatografia por troca aniônica.



Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico da porção acima de 10 kDa do veneno de *T. serrulatus* em coluna preparativa Shim-Pack PA-DEAE (troca aniônica), sob o fluxo de 3 mL/min em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,2) em HPLC (Shimadzu). A linha azul representa o gradiente de concentração do tampão B, 0 - 80% em 80 minutos. Detecção em 214 nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha).

Os picos de 1- 10 foram coletados em intervalos de 5 minutos. Foi realizada a troca de tampão e concentração de todas as frações utilizando o filtro de corte molecular de 10 kDa, e posteriormente as concentrações proteicas das frações foram quantificadas.

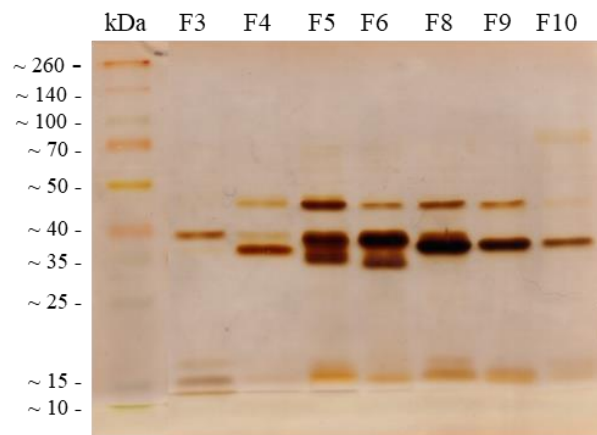
No ensaio de atividade enzimática sobre Abz-FLRRV-EDDnp, as frações F4 e F6 apresentaram as maiores atividades hidrolíticas, $1369,54 \pm 152,9$ UF/min/ μ g e $3919,11 \pm 825,6$ UF/min/ μ g, respectivamente (Tabela 2). A fração F7 desta coleta foi perdida, devido à quebra do tubo.

Tabela 2 - Atividade hidrolítica sobre Abz-FLRRV-EDDnp (5μ M) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 das frações do VTs provenientes da cromatografia por troca aniônica (DEAE). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um experimento realizado em duplicata.

Amostras DEAE	Atividade sobre Abz-FLRRV-EDDnp (UF/min/μg)
VTs	$609,5 \pm 11,5$
F2	sem atividade
F3	$166,2 \pm 5,6$
F4	$1369,5 \pm 152,9$
F5	$1274,0 \pm 3,4$
F6	$3919,1 \pm 825,6$
F8	$1080,6 \pm 82,1$
F9	$267,8 \pm 7,6$
F10	$119,1 \pm 0,1$

O perfil eletroforético das amostras ativas sobre o substrato utilizado (Figura 6) demonstrou que as frações F4 e F6 continham mais de uma banda proteica. A seguir essas frações foram submetidas à cromatografia por gel filtração (Figuras 7 e 8).

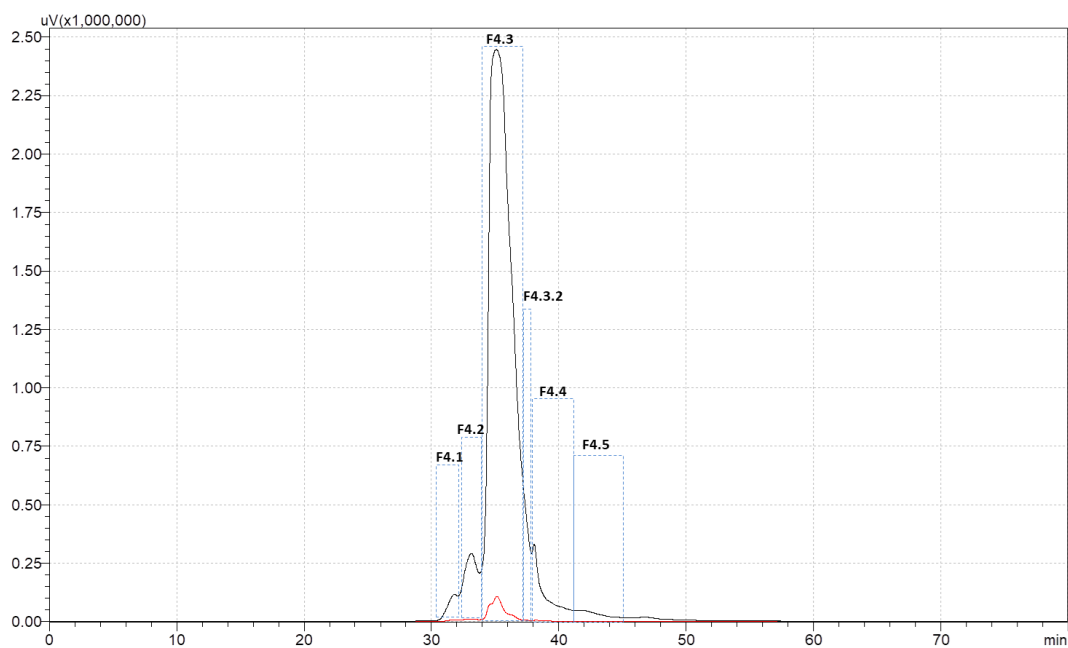
Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% das frações do VTs provenientes da cromatografia de troca aniônica.



Fonte: Silva, CCF (2022).

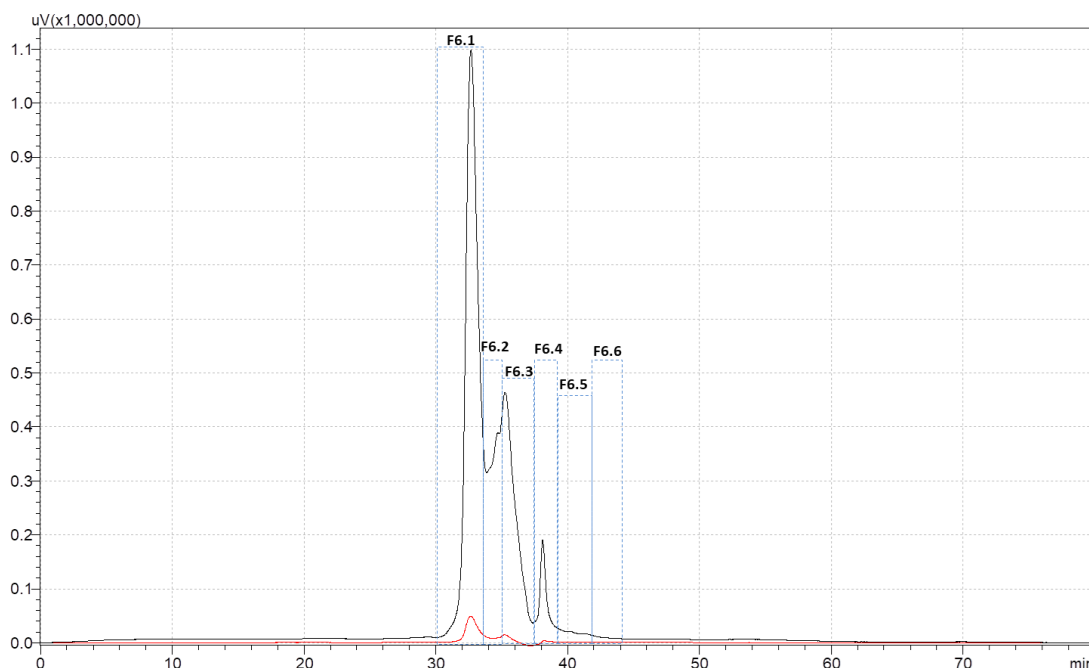
Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5 % das frações F3, F4, F5, F6, F8, F9 e F10 em condições redutoras. Foi utilizado de 1 a 3 µg de proteína por poço. Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração F4 em coluna de gel filtração



Fonte: Silva, CCF (2022).

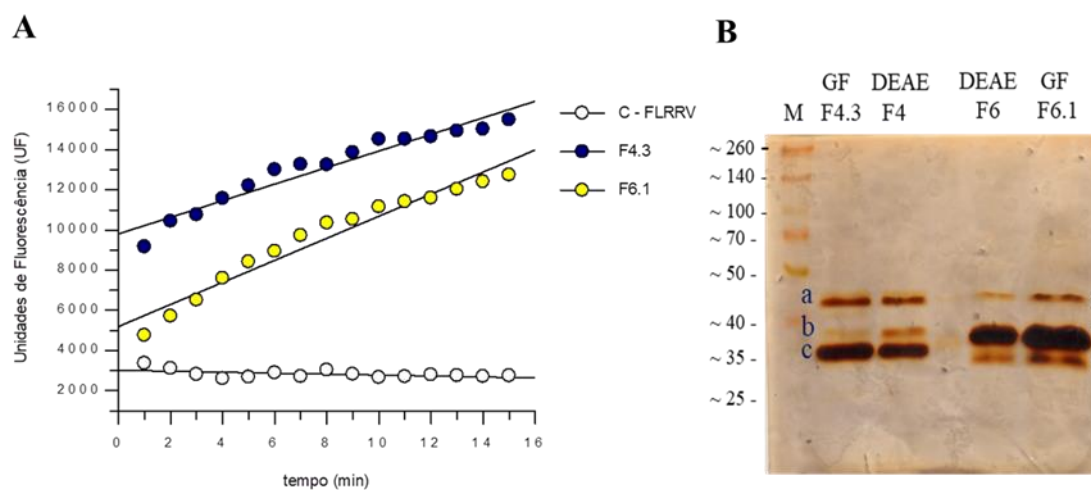
Perfil cromatográfico da fração F4 em coluna de gel filtração Shim-Pack DIOL-300 sob fluxo 0,5 mL/min durante 80 minutos em tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Detecção em 214 nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha).

Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração F6 em coluna de gel filtração

Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico da fração F6 em coluna de gel filtração Shim-Pack DIOL-300 sob fluxo 0,5 mL/min durante 80 minutos em tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Detecção em 214 nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha).

As frações F4.3 e F6.1 foram as que exibiram atividade hidrolítica sobre Abz-FLRRV-EDDnp, de $1122,04 \pm 61,7$ UF/min/ μ g e $12568,3 \pm 2239,4$ UF/min/ μ g, respectivamente (Figura 9A). Em seguida as frações provenientes das duas etapas cromatográficas foram submetidas à SDS-PAGE onde foi possível observar que apesar de passarem pela cromatografia por gel filtração, o perfil eletroforético das amostras continuava semelhante ao da etapa anterior (Figura 9B).

Figura 9 - Atividade enzimática e SDS-PAGE das frações F4.3 e F6.1

Fonte: Silva, CCF (2022).

Frações F4.3 e F6.1. (A) Atividade enzimática das frações sobre Abz-FLRRV-EDDnp em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 e (B) SDS-PAGE 12,5% das frações F4, F4.3, F6 e F6.1 em condições redutoras. Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

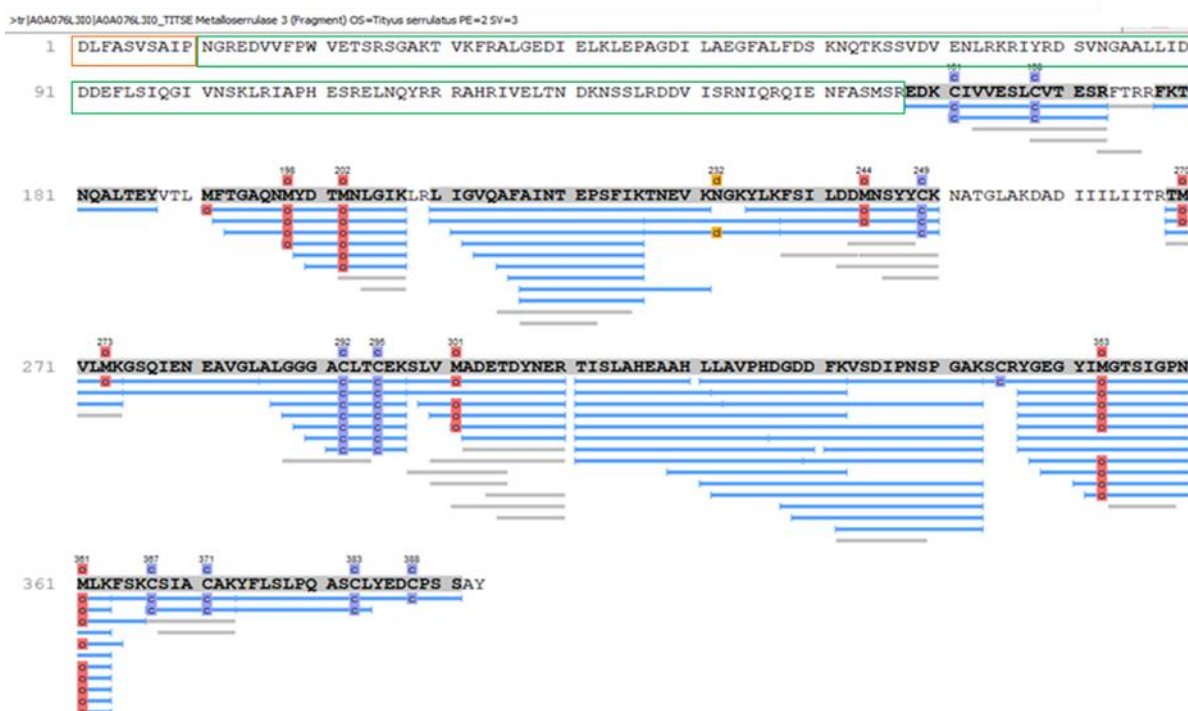
As bandas do gel denominadas como a, b e c, foram recortadas, submetidas à digestão triptica e análise por espectrometria de massas para a identificação das proteínas presentes. A Tabela 3 exibe as proteínas que apresentam as maiores similaridades com os espectros obtidos.

Tabela 3 - Identificação das proteínas a partir dos espectros de massas obtidos pelo LTQ-Orbitrap Velos, analisados no programa Peaks Studio 8.5 e confrontados com o banco de dados do Uniprot

Amostra	Cobertura / Identificação / Acesso
F4.3a	55% putative CRISP <i>T. serrulatus</i> A0A218QX21
F4.3b	35% TsMS2 A0A076LAV6
F4.3c	53% TsMS3 A0A076L3I0
F6.1a	38% putative CRISP <i>T. serrulatus</i> A0A218QX58
F6.1b	43% TsMS16 A0A1S5QN57 42% TsMS2 A0A076LAV6 15% TsMS4 A0A076L332
F6.1c	48% TsMS4 A0A076L332 38% putative metalloproteinase <i>T. serrulatus</i> A0A218QWY7

As proteínas de maiores massas moleculares, com aproximadamente 45 kDa (bandas F4.3a e F6.1a em condições redutoras) foram identificadas como CRISPs do VTs. Na fração F4.3 também foram encontradas sequências correspondentes à TsMS 2 (banda F4.3b). A banda mais intensa da amostra F4.3 foi identificada como TsMS 3, como esperado (Figura 10). Quanto à fração F6.1, além da CRISP, foram identificadas a TsMS 16, TsMS 2 e TsMS 4 na banda de maior intensidade (F6.1b). Enquanto na banda inferior (F6.1c) foi localizada a TsMS 4, apresentando maior cobertura (Figura 11). As figuras 10 e 11 exibem os fragmentos encontrados nas bandas F4.3c e F6.1c correspondentes às metallosserulases 3 e 4, respectivamente. Cabe ressaltar que a cobertura obtida possui um valor maior que a apresentada pelo Peaks quando considerada a enzima madura (89,4% da TsMS 3 e 80,7% da TsMS 4), pois as sequências completas das metalopeptidases depositadas no Uniprot correspondem aos zimógenos destas, contendo o peptídeo sinal e a porção pró-peptídica.

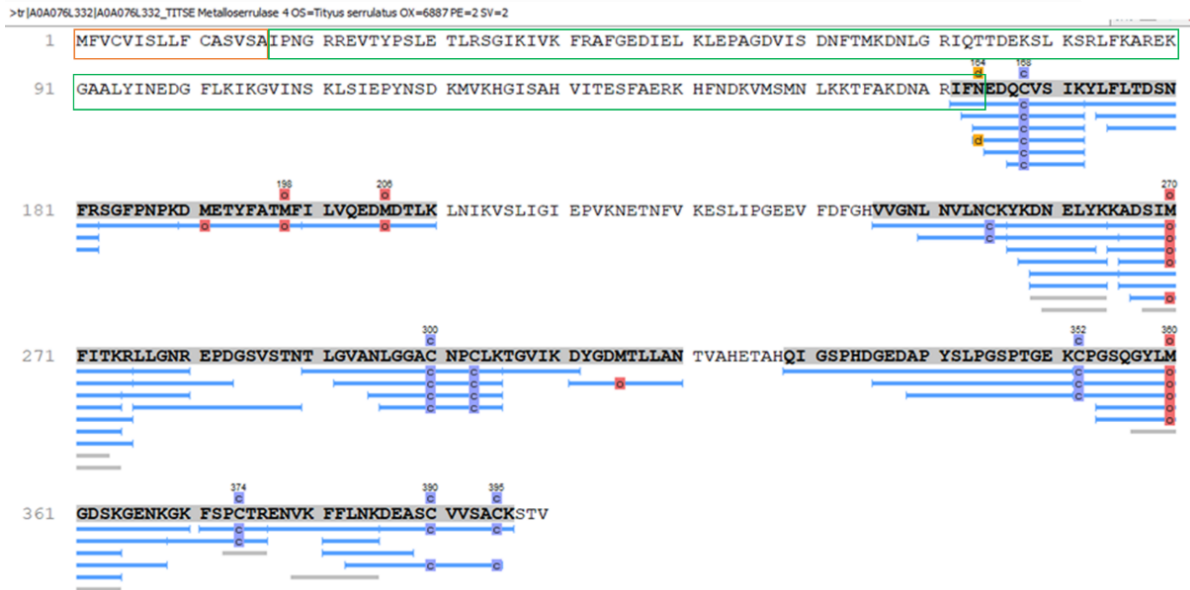
Figura 10 - Identificação da banda 4.3c (TsMS 3) por espectrometria de massas



Fonte: Silva, CCF (2022).

Identificação da banda 4.3c (TsMS 3) por espectrometria de massas no LTQ Orbitrap Velos. A sequência do peptídeo sinal está destacada em laranja, e a região do pró-peptídeo, em verde. Foram observadas modificações pós-traducionais como a oxidação da metionina, representada pelo “o” em vermelho, deamidação da asparagina, pelo “d” em amarelo, e carbamidometilação da cisteína, pelo “c” em roxo. Os espectros obtidos da digestão trípica *in gel* estão representados pelo sublinhado em azul. Sublinhados em cinza representam os peptídeos encontrados no sequenciamento *de novo*.

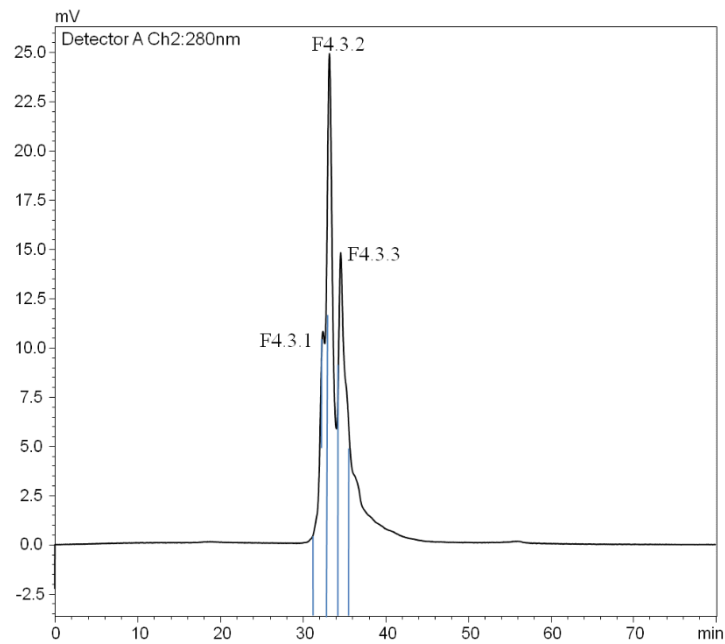
Figura 11 - Identificação da banda 6.1c (TsMS 4) por espectrometria de massas



Fonte: Silva, CCF (2022).

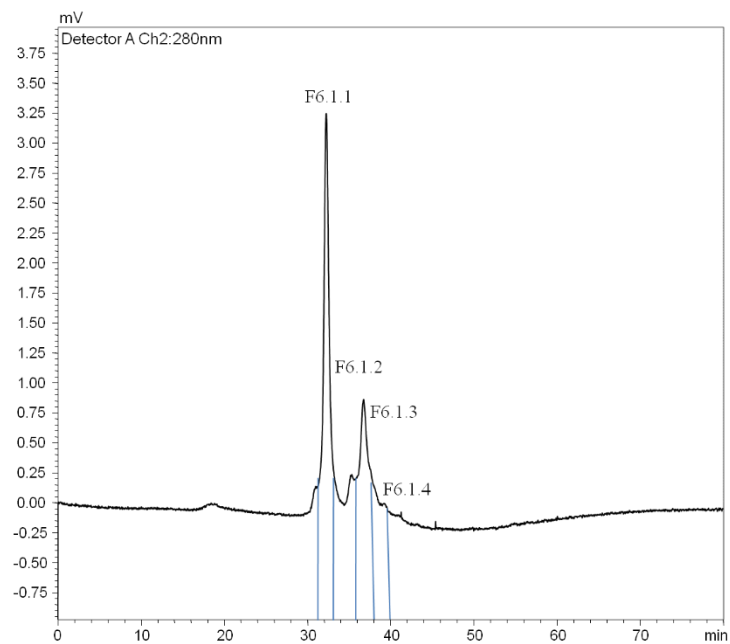
Identificação da banda 6.1c (TsMS 4) por espectrometria de massas no LTQ Orbitrap Velos. A sequência do peptídeo sinal está destacada em laranja, e a região do pró-peptídeo predita, em verde. Foram observadas modificações pós-traducionais encontradas como a oxidação da metionina, representada pelo “o” em vermelho, deamidação da asparagina, pelo “d” em amarelo, e carbamidometilação da cisteína indicada pelo “c” em roxo. Os espectros obtidos da digestão trípica *in gel* estão representados pelo sublinhado em azul. Sublinhados em cinza representam os peptídeos encontrados no sequenciamento *de novo*.

A seguir realizamos mais uma cromatografia por gel filtração das frações F4.3 e F6.1 a fim de isolar a TsMS 3 e TsMS 4 (Figura 12 e 13). Desta vez optamos por basear as coletas na absorbância em 280 nm a fim de obtermos maior resolução dos picos.

Figura 12 - Recromatografia por gel filtração da fração F4.3

Fonte: Silva, CCF (2022).

Recromatografia por gel filtração da fração F4.3 utilizando a coluna Shim-Pack DIOL-300 sob fluxo 0,5 mL/min durante 80 minutos em tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Detecção em 280 nm.

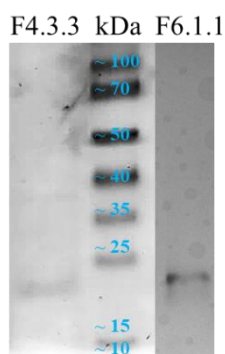
Figura 13 - Recromatografia por gel filtração da fração F6.1

Fonte: Silva, CCF (2022).

Recromatografia por gel filtração da fração F6.1 utilizando a coluna Shim-Pack DIOL-300 sob fluxo 0,5 mL/min durante 80 minutos em tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Detecção em 280 nm.

As frações que passaram pela segunda cromatografia por gel filtração tiveram suas atividades hidrolíticas testadas. Foi observada atividade sobre Abz-FLRRV-EDDnp na fração F4.3.3, com atividade específica de 706,64 UF/min/ μ g e na fração F6.1.1, de 32,8 UF/min/ μ g. As frações F4.3.3 e F6.1.1 foram as únicas que apresentaram ação sobre o substrato FRET e tiveram suas purezas analisadas por eletroforese em SDS-PAGE, apresentando o peso molecular correspondente a TsMS 3 e TsMS 4 (Figuras 14).

Figura 14 - SDS-PAGE das frações F4.3.3 e F6.1.1



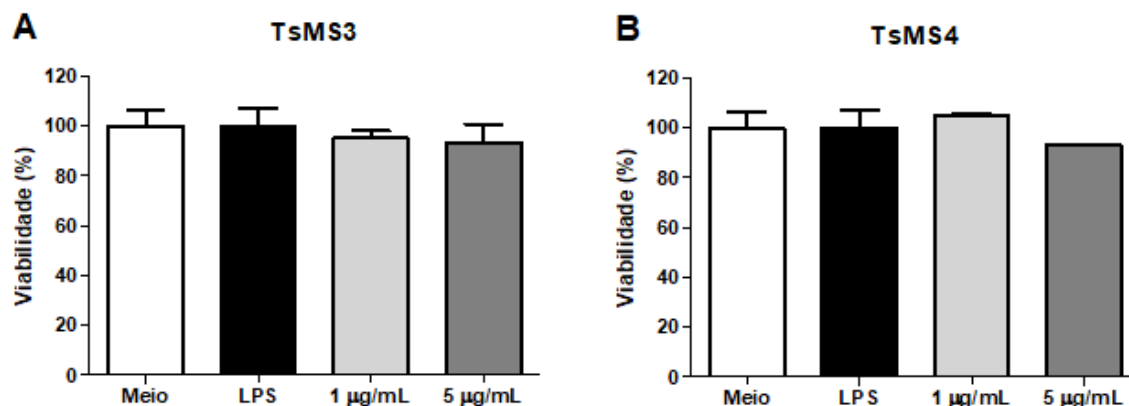
Fonte: Silva, CCF (2022).

SDS-PAGE 12,5% das frações F4.3.3 e F6.1.1 em condições não redutoras. Foi utilizado 1 μ g de proteína por poço. Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

4.2 Efeito da TsMS 3 e TsMS 4 na viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos

Os ensaios de viabilidade celular demonstram que as peptidases TsMS 3 e TsMS 4 nas concentrações de 1 μ g/mL e 5 μ g/mL não possuem ação citotóxica em culturas de macrófagos murinos (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da TsMS 3 e TsMS 4 sobre a viabilidade de macrófagos



Fonte: Silva, CCF (2022)

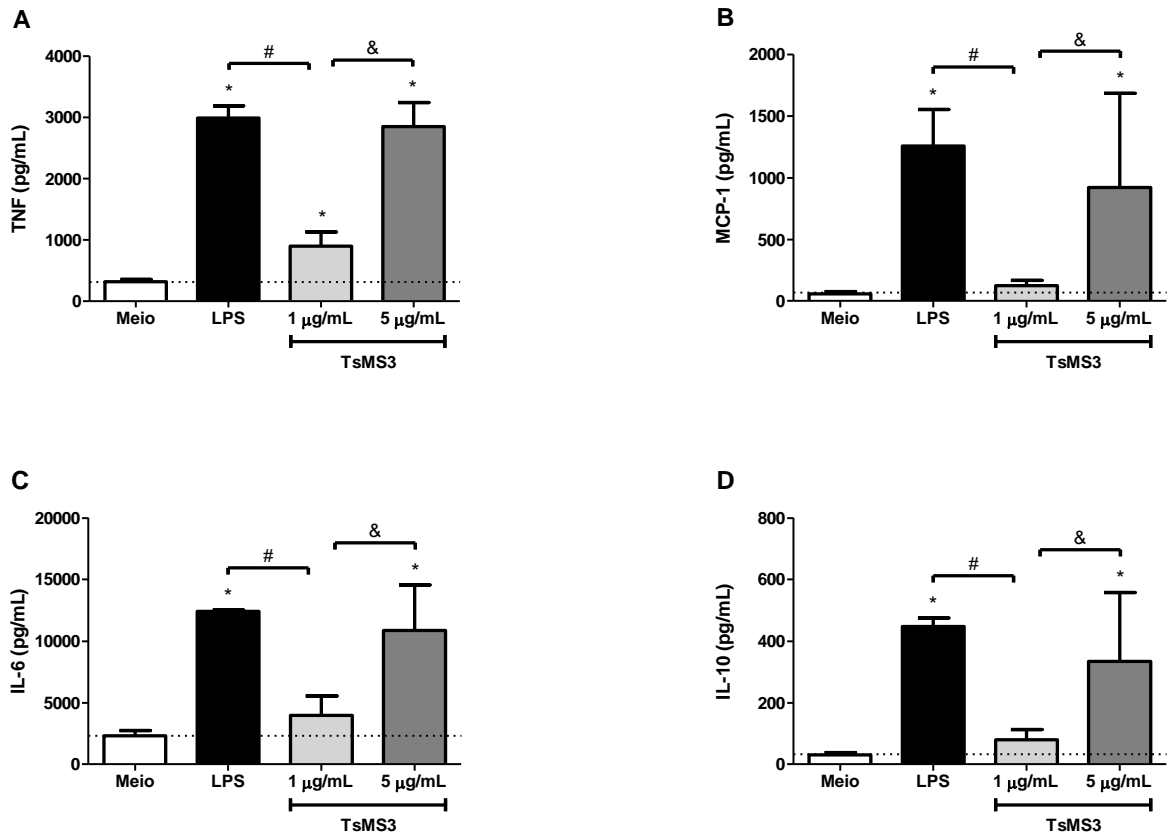
Efeito da TsMS 3 e TsMS 4 sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c naïve foram cultivados por 24 horas na presença das proteases TsMS 3 (A) e TsMS 4 (B), nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL. Células cultivadas somente com meio de cultura RPMI ou na presença de 5 µg/mL de LPS foram utilizadas como controles. A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. Os resultados representam a média ± desvio padrão de um experimento realizado em duplicata.

4.3 Produção de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoneais murinos estimulados *in vitro* com as TsMS 3 e TsMS 4

Como esperado, as células cultivadas somente com meio (controle negativo) produziram níveis basais de TNF, MCP-1, IL-6 e IL-10, enquanto as células cultivadas na presença de LPS (controle positivo) apresentaram aumento significativo da produção dessas citocinas (Figuras 16 e 17). As concentrações de IL-12p70 e IFN- γ ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio, em todas as amostras.

A peptidase TsMS 3 exerceu efeito pró-inflamatório sobre os macrófagos, induzindo aumento significativo da produção de TNF nas duas concentrações testadas (Figura 16A), e de MCP-1, IL-6 e IL-10 na concentração de 5 µg/mL (Figura 16B a D). O efeito exercido pela TsMS 3 apresentou um perfil dose-dependente, com diferenças estatisticamente significativas entre as duas concentrações testadas, para todas as citocinas analisadas (Figura 16). Na concentração de 5 µg/mL, os níveis das quatro citocinas foram semelhantes aos obtidos com LPS (Figura 16).

Figura 16 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados *in vitro* com a TsMS 3



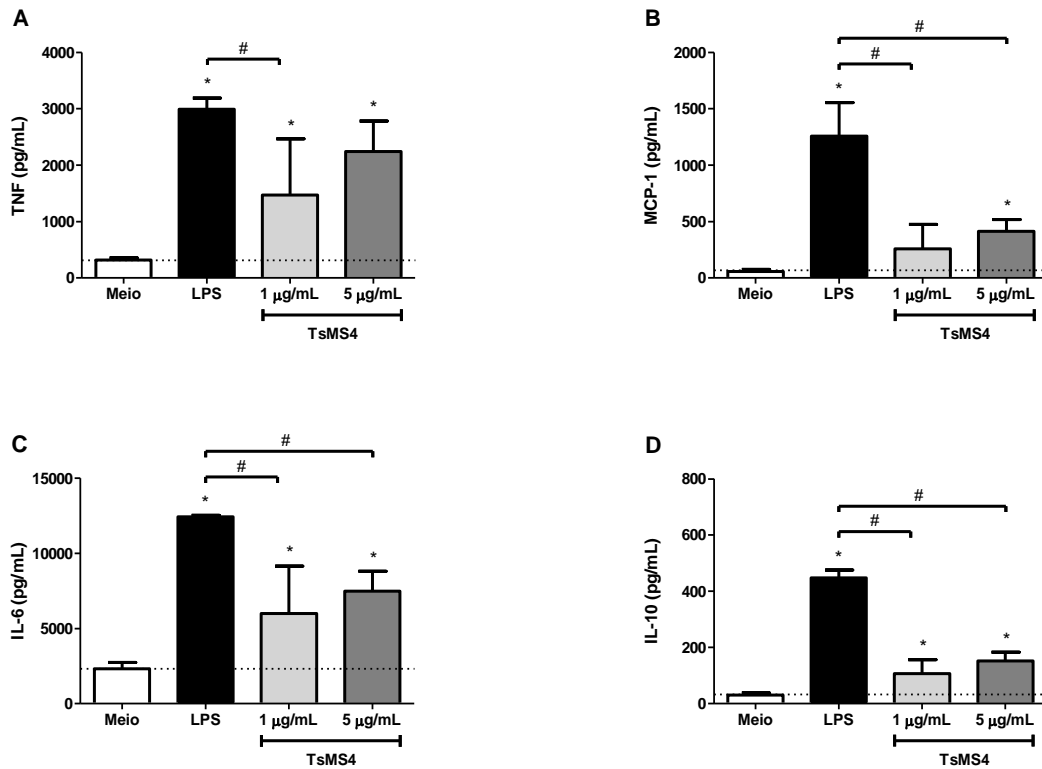
Fonte: Silva, CCF (2022)

Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c naïve foram cultivados por 24 horas na presença de TsMS 3, nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL. Células cultivadas somente com meio ou na presença de 5 µg/mL de LPS foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As concentrações de TNF (A), MCP-1 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram determinadas pelo método de CBA. Os resultados representam a média das duplicatas de um experimento. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo; # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo; & $p < 0,05$ entre as diferentes concentrações de TsMS 3.

A TsMS 4 também exerceu efeito pró-inflamatório sobre macrófagos murinos, aumentando significativamente os níveis de TNF, MCP-1, IL-6 e IL-10, em relação ao controle negativo, nas duas concentrações testadas (Figura 17). Entretanto, não foi possível observar um efeito dose-dependente evidente para TsMS 4, uma vez que não houve diferença significativa entre as duas concentrações testadas, para nenhuma das citocinas analisadas (Figura 17). Além disso, apesar de ter induzido níveis de TNF estatisticamente semelhantes aos do controle

positivo, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17A), a TsMS 4 não foi capaz de promover a liberação de MCP-1, IL-6 e IL-10 em níveis comparáveis aos do LPS (Figura 17B a D).

Figura 17 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados *in vitro* com a TsMS 4.



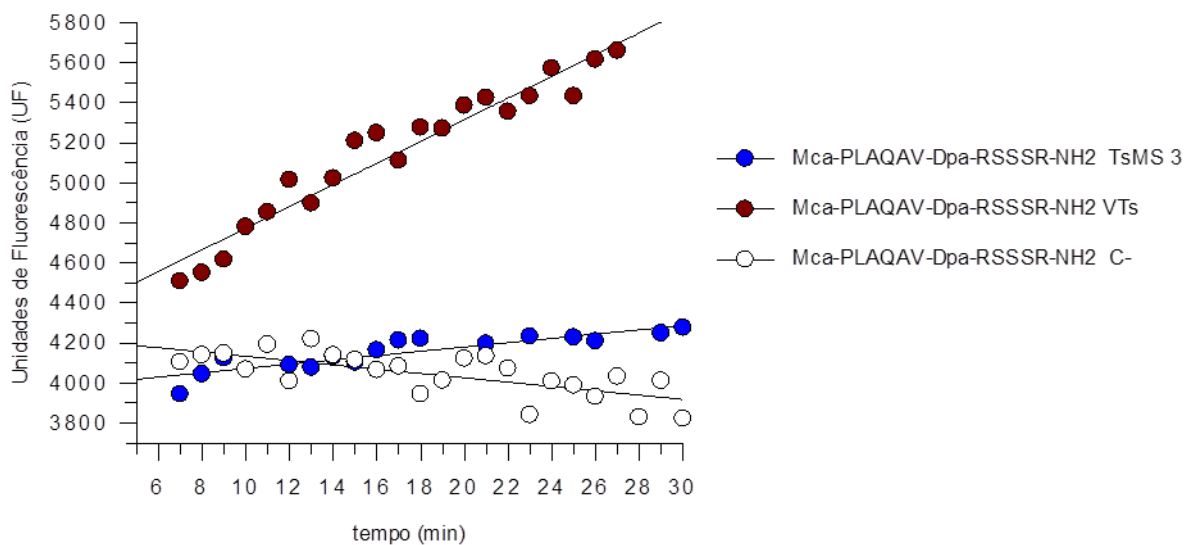
Fonte: Silva, CCF (2022).

Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c naïve foram cultivados por 24 horas na presença da protease TsMS 4, nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações de TNF (A), MCP-1 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram determinadas pelo método de CBA. Os resultados representam a média das duplicatas de um experimento. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo.

4.3.1 Atividade de TsMS 3 sobre MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂

Para avaliar uma possível atividade TACE-like, utilizamos o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂, predito como seletivo para essa metaloprotease. Como exibido na Figura 18, o veneno total foi capaz de clivar o substrato com atividade de $36,54 \pm 0,6$ UF/min/ μg . Foi observada a atividade hidrolítica de TsMS 3 sobre o mesmo substrato da TACE, de $22,6 \pm 0,4$ UF/min/ μg utilizando o tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2.

Figura 18 - Atividade da TsMS 3 e VTs sobre o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂



Fonte: Silva, CCF (2022)

Ensaio de atividade da TsMS 3 (0,48 μ g) representado em azul, e VTs (1,5 μ g), em vermelho, sobre 5 μ M de MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2. Controle negativo (tampão e substrato) representado pelos círculos brancos.

O alinhamento das sequências depositadas no Uniprot da ADAM 17 humana (TACE) e da metaloserrulase 3 demonstra que essas proteínas compartilham 18,8 % de identidade e 32,6% de similaridade (Figura 19).

Figura 19 - Alinhamento das sequências da TsMS 3 e ADAM 17 humana

TsMS3	21	VETSRSGAKTVKFRALGEDIELKLEPAGDILAEGF--ALFDSKNQTKSSV	68
		:: :::..... ..: .. :.....	
ADAM17	60	LQTSTHVETLLTFSALKRHFKLYLTSSTERFSQNFKVVVVDGKNESEYTV	109
TsMS3	69	DVENLRKRIYRDSVNG-----AALLIDDEFLSIQGIVNSKLRIA	108
		. : :.. ...: :.. .	
ADAM17	110	K-----WQDFFTGHVVGEPDSRVLAHIRDDDVIIRI-NTDGAEYNI	150
TsMS3	109	PHE\$RELNQYRRRAHRIVELTNDKNSSLRDDVISRNIQR----QIENFAS	154
	:.....: :.. :.....	
ADAM17	151	P-----LWRFVNDTKDKRMLVYKSEDIKNVSRQLQSPKVCGYLK	188
TsMS3	155	MSRED---KCIV-----VESLC---VTE\$RFRTRR	177
		:.. : .: :.:. .:. . .	
ADAM17	189	VDNEELLPKGLVDREPPEELVHRVKRRADPDPMKNTCKLLVVADHRFYRY	238
TsMS3	178	FKTNQ--ALTEYVTLMFTGAQNMYDTM---NLGIKLRLLIGVQAFAINTEP	222
	: .. . :.....:.....: :..... ...	
ADAM17	239	MGRGEE\$T\$TNYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIQIEQIRILKSP	288
TsMS3	223	SFIKTNEVKNGKYLKFSILDDMNSYCKN-----ATGLAKDADIILIIIT	267
		:: .. :.....:.....: . :.: : : ..:	
ADAM17	289	QEVKPGE-KHYNMAKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCL---	334
TsMS3	268	RTMVLMKGSQIENEAVGLA-LG-----GGAC-----	292
	:.....: : .	
ADAM17	335	--AHLFTYQDFDMGTLGLAYVGS\$PRANSHGGVCPKAYYSPVGKKNIYLNS	382
TsMS3	293	-LTCEKS---LVMADETDYNERTISLAE <u>HEAAH</u> LLAVPHDGDDFKVSDIPN	338
		.. : :.:.. . :... 	
ADAM17	383	GLTSTKNYKGTILTKEAD-----LVTT <u>HELGH</u> NFGAEHDPDGLAECAPNE	427
TsMS3	339	SPGAK\$CRYGEGYIMGTSIGPNMLKFSKCS	368
	:.....	
ADAM17	428	DQGGKYVMYP---IAVSGDHENNKMF\$SNCS	454

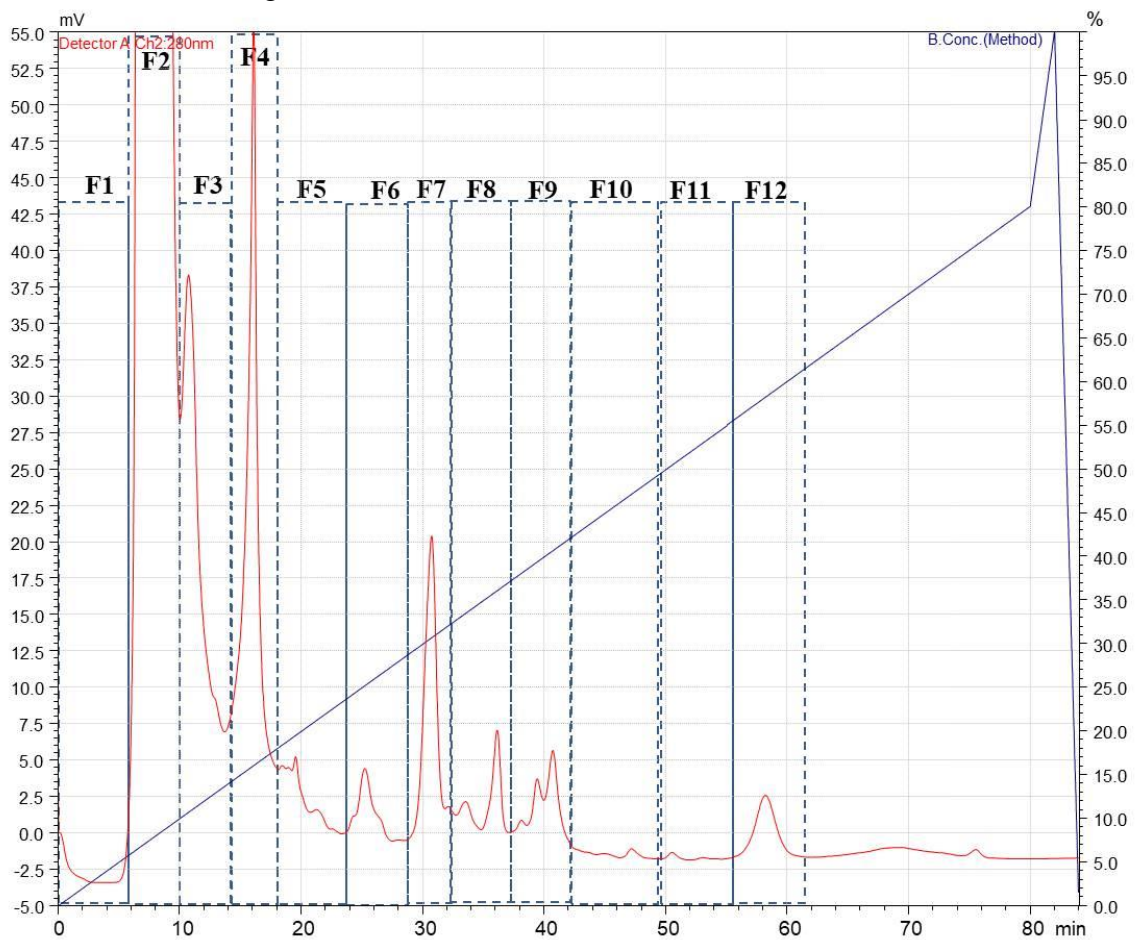
Fonte: Silva, CCF (2022).

Alinhamento das sequências da TsMS 3 (AIJ02111.3) e ADAM 17 humana (P78536) utilizando a ferramenta de alinhamento Pairwise no programa EMBOSS Water. A sequência HEXXH, sítio de ligação do zinco, está sublinhada.

4.4 Novas etapas de purificação: Fracionamento do VTs e análise da atividade enzimática

Após o fracionamento de 15 mg de veneno total (lote Ts/V160001) em membrana de exclusão de 10 kDa, a porção contendo as moléculas com massa molecular superior a 10 kDa foi submetida à cromatografia de troca aniônica (Figura 20). Foram coletadas 12 frações (F1 - 12) e, desta vez, considerando apenas a detecção a 280 nm.

Figura 20 - Perfil cromatográfico da porção acima de 10 kDa do veneno de *T. serrulatus* em cromatografia de troca aniônica

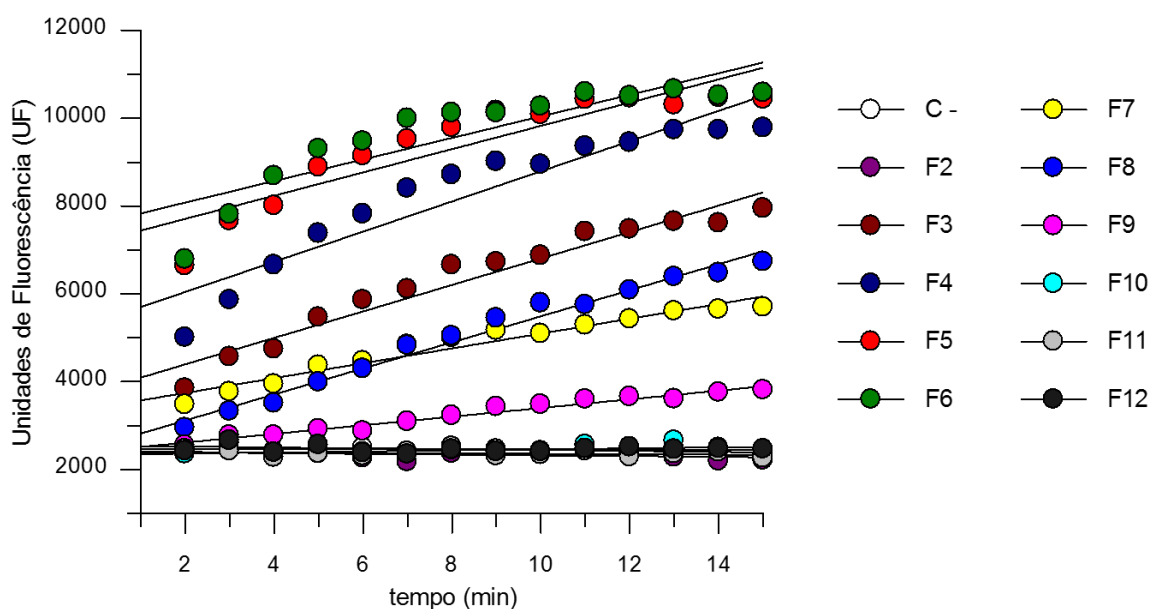


Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico da porção acima de 10 kDa do veneno de *T. serrulatus* em coluna preparativa Shim-Pack PA-DEAE (troca aniônica), sob o fluxo de 3 mL/min em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,2) em HPLC (Shimadzu). A linha azul representa o gradiente de concentração do tampão B, 0 - 80% em 80 minutos. Detecção em 280 nm (linha vermelha).

Após dialisadas, foi analisada a atividade enzimática das 12 frações sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (Figura 21 e Tabela 4).

Figura 21 - Atividade hidrolítica das frações do VTs sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp



Fonte: Silva, CCF (2022).

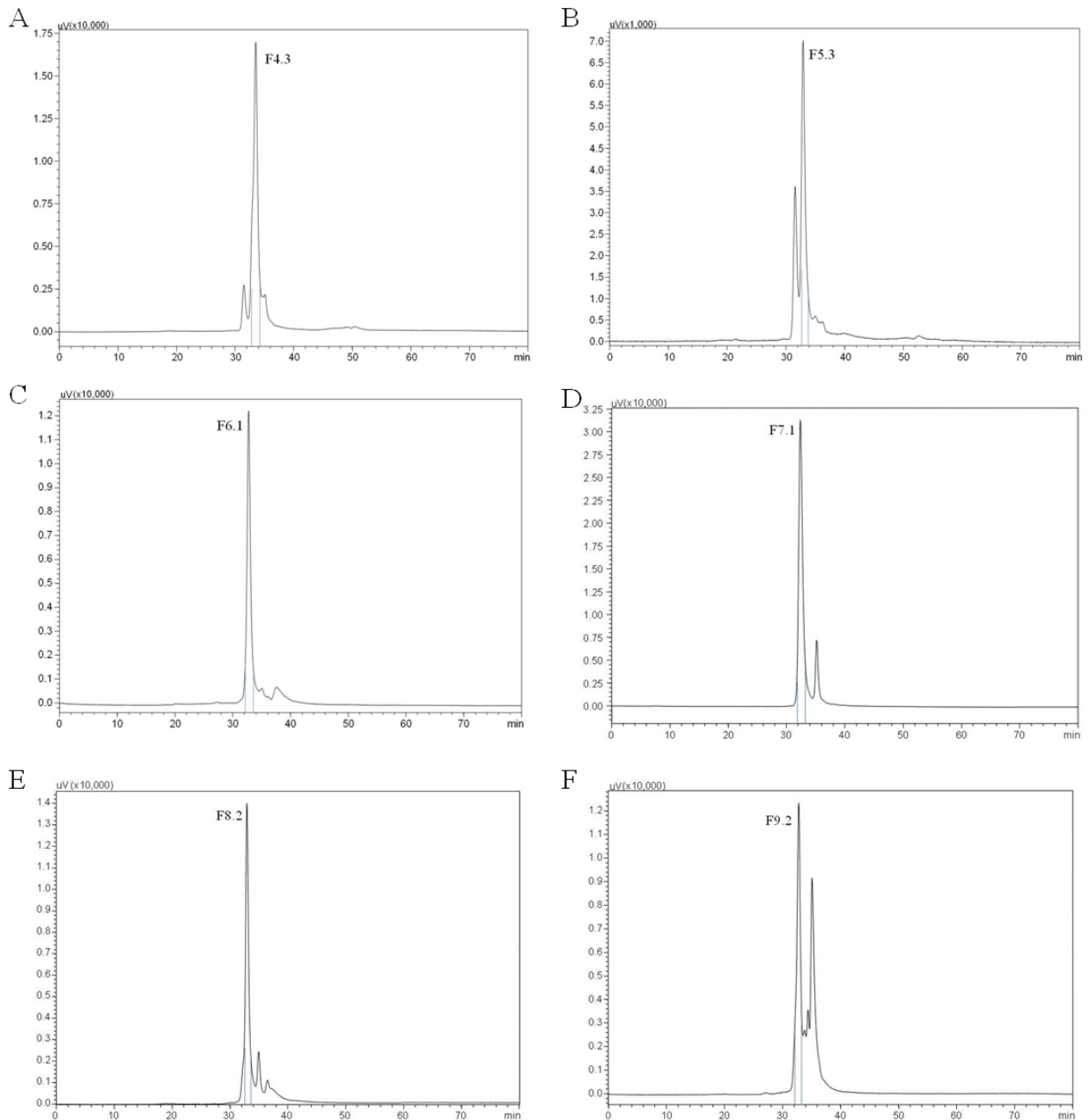
Atividade hidrolítica das frações obtidas na cromatografia de troca aniônica (0,5 µg de cada) sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM) incubados em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8.2.

Tabela 4 - Atividade específica sobre Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 das frações do VTs provenientes da cromatografia por troca aniônica (DEAE). Os resultados representam a média ± desvio padrão de um experimento realizado em duplicata.

Fração DEAE	Atividade sobre Abz-FLRRV-EDDnp (UF/min/µg)
Controle negativo	-10,03
VTs	177,98 ± 6,1
F2	-17,49 ± 0,39
F3	600,82 ± 2,5
F4	1048,5 ± 66,3
F5	1058,46 ± 25,9
F6	878,07 ± 144,35
F7	332,22 ± 8,33
F8	555,35 ± 53,63
F9	200,27 ± 4,56
F10	25,92 ± 3,37
F11	-21,16 ± 14,65
F12	-2,66

As frações F4, F5, F6, F7, F8 e F9 exibiram grande atividade sobre o substrato testado e, a seguir, as mesmas foram submetidas ao fracionamento por exclusão molecular (Figura 22).

Figura 22 - Perfil cromatográfico das frações F4 - F9 em coluna de gel filtração



Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico da fração F4 (A), F5 (B), F6 (C), F7 (D), F8 (E) e F9 (F) em coluna de gel filtração Shim-Pack DIOL-300 sob fluxo 0,5 mL/min durante 80 minutos em tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Detecção em 280 nm.

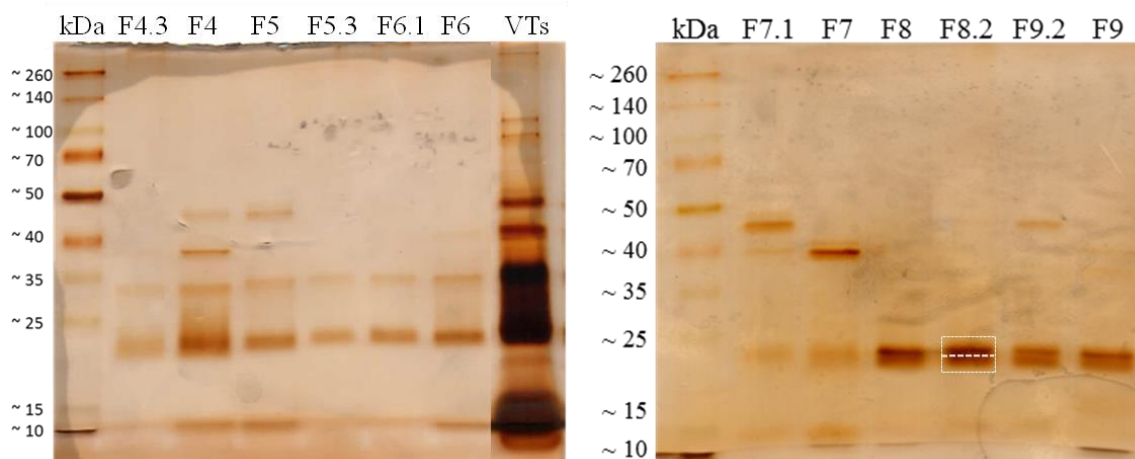
As frações F4.3, F5.3, F6.1, F7.1, F8.2 e F9.2 foram dialisadas, concentradas e quantificadas. A atividade hidrolítica das frações obtidas sobre Abz-FLRRV-EDDnp foi avaliada (Tabela 5). As maiores atividades observadas são referidas as frações F6.1, F5.3 e F4.3.

Tabela 5 - Atividade específica das amostras provenientes da cromatografia por gel filtração sobre Abz-FLRRV-EDDnp (5 μ M) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2.

Amostras gel filtração	Atividade sobre Abz-FLRRV-EDDnp (UF/min/ μ g)
controle negativo	sem atividade
F4.3	396,9 \pm 185,8
F5.3	1398,7 \pm 347,6
F6.1	1702,2 \pm 19,1
F7.1	287,1 \pm 11,9
F8.2	168,6 \pm 9,6
F9.2	sem atividade

Com as mesmas amostras foi feito SDS-PAGE 12,5% para a visualização de suas massas moleculares e avaliação da pureza (Figura 23).

Figura 23 - SDS-PAGE do VTs e das frações F4.3, F5.3, F6.1, F7.1, F8.2 e F9.2



Fonte: Silva, CCF (2022)

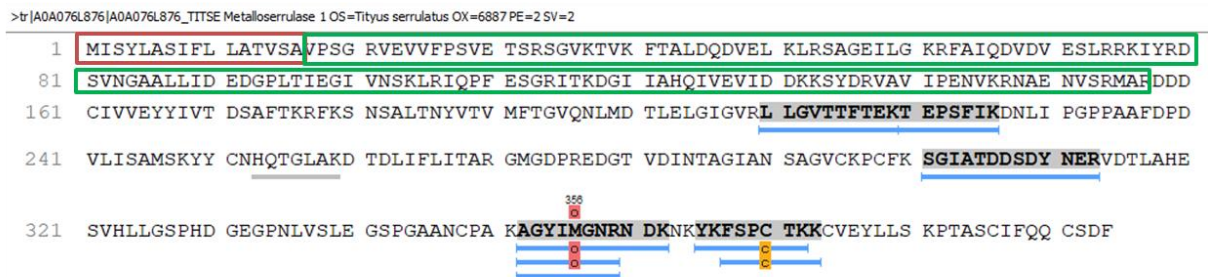
SDS-PAGE 12 % em condições não redutoras das amostras F4.3, F4, F5.3, F5, F6.1, F6, veneno de *Tityus serrulatus* acima de 10 kDa, F7.1, F7, F8, F8.2, F9.2 e F9. Foi utilizado 1,5 μ g de cada amostra e 5 μ g de VTs >10 kDa. Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

4.5 Identificação da fração F8.2 – antarease

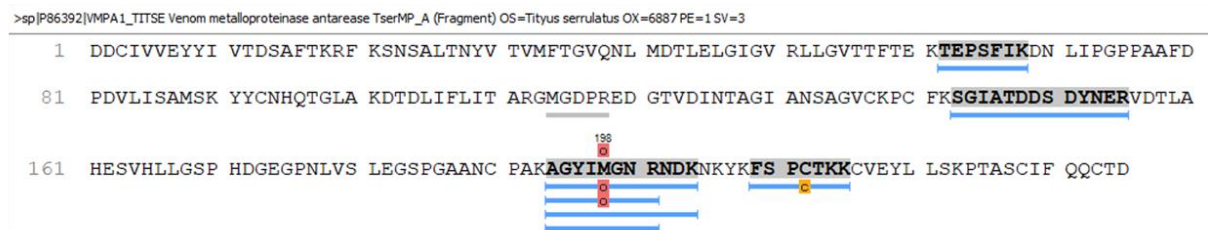
A fração F8.2, que apresentou atividade hidrolítica de 168,6 UF/min/μg sobre Abz-FLRRV-EDDnp (Tabela 5 e Figuras 22E e 23), foi submetida à análise por espectrometria de massas para determinação de sua estrutura primária. Para isso, foi realizada a digestão *in gel* da banda da fração F8.2. Dividimos a banda em duas, uma superior de maior intensidade e a inferior. Os espectros obtidos da banda F8.2 mais intensa, indicou a presença da metalloserulase 1 (TsMS 1) com 10% de cobertura ou 21%, considerando sua forma madura, e 21% de cobertura da antarease. A análise da parte inferior dessa banda indicou a presença da antarease com 16% de cobertura e 10% da TsMS 1 ou 16%, em sua forma madura no programa Peaks (Figura 24). As sequências da TsMS 1 e antarease foram alinhadas pelo programa EMBOSS Water, que indicou 99,6% de identidade e 100% de similaridade entre elas (Figura 25). Deste modo, a fração F8.2 foi identificada como a peptidase antarease e as etapas de seu isolamento constam na Tabela 6.

Figura 24 - Identificação da banda 8.2 por espectrometria de massas

A



B



Fonte: Silva, CCF (2022)

Identificação da banda 8.2 por espectrometria de massas no equipamento LTQ-XL. A) Sequência primária da TsMS 1 (acesso A0A076L876), o peptídeo sinal está destacado em vermelho e a região do pró-peptídeo, em verde. Os espectros obtidos da digestão trípica *in gel* da parte superior da banda F8.2 (mais intensa) estão representados pelos fragmentos sublinhados em azul. Sublinhados em cinza representam os peptídeos encontrados no sequenciamento *de novo*. B) A sequência da antarease (acesso P86392). Os espectros obtidos da digestão trípica *in gel* da parte inferior da banda F8.2 estão

representados pelos fragmentos sublinhados em azul. Sublinhados em cinza representam os peptídeos encontrados no sequenciamento *de novo*. As modificações pós-traducionais encontradas como a oxidação da metionina está representada pelo “o” em vermelho e carbamidometilação da cisteína indicada pelo “c” em amarelo.

Figura 25 - Alinhamento das sequências da TsMS 1 e antarease

antarease	1	DDCIVVEYYIVTDSAFTKRFKSNSALTNYVTVMFTGVQNLMDTLELGIGV	50
TsMS1	159	DDCIVVEYYIVTDSAFTKRFKSNSALTNYVTVMFTGVQNLMDTLELGIGV	208
antarease	51	RLLGVTTTFTEKTEPSFIKDNLIPGPPAAFDPDVLISAMSKYYCNHQTGLA	100
TsMS1	209	RLLGVTTTFTEKTEPSFIKDNLIPGPPAAFDPDVLISAMSKYYCNHQTGLA	258
antarease	101	KDTDLI FLITARGMGDPREDGTV DINTAGIANSAGVCKPCFKSGIATDDS	150
TsMS1	259	KDTDLI FLITARGMGDPREDGTV DINTAGIANSAGVCKPCFKSGIATDDS	308
antarease	151	DYNERVDTLAHESVHLLGSPHDGEGPNLVSLEGS PGAANCPAKAGYIMGN	200
TsMS1	309	DYNERVDTLAHESVHLLGSPHDGEGPNLVSLEGS PGAANCPAKAGYIMGN	358
antarease	201	RNDKNKYKFSPCTK KCV EYLLSKPTASCIFQQC <u>T</u> D	235
TsMS1	359	RNDKNKYKFSPCTK KCV EYLLSKPTASCIFQQC <u>S</u> D	393

Fonte: Silva, CCF (2022).

Alinhamento das sequências depositadas no Uniprot da TsMS 1 (A0A076L876) e antarease (P86392) utilizando o programa EMBOSS Water. A única divergência encontrada foi uma tirosina²³⁴ na sequência primária da antarease ao invés de uma serina³⁹², presente na forma madura de TsMS 1 ambas próximas ao C-terminal e sublinhadas.

Tabela 6 - Resumo das etapas de purificação da antarease. A atividade foi monitorada utilizando o substrato Abz-FLRRV-EDDnp e o tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 incubados a 37 °C.

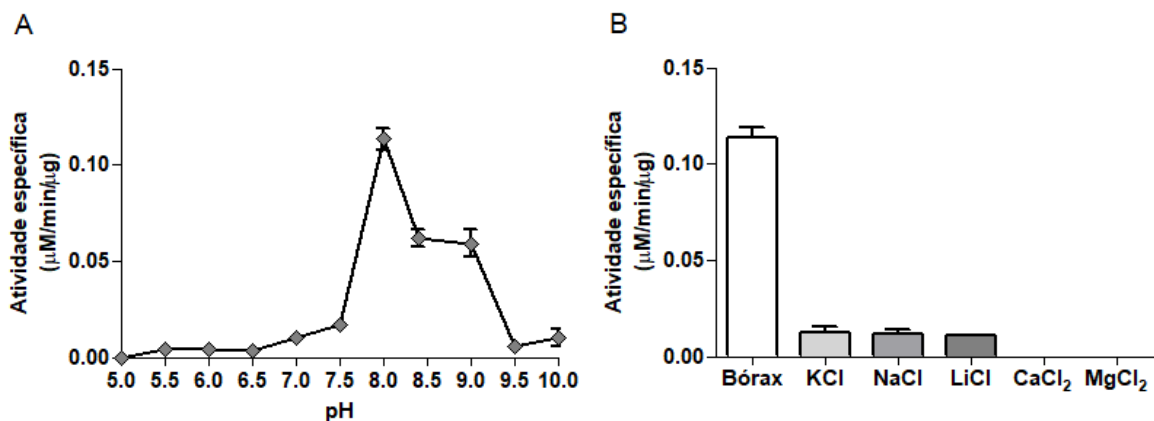
Etapa	Volume (µL)	Proteína total (µg)	Atividade (U)	Atividade total (U/µL)	Atividade específica (U/µg)	Fator de purificação (x)	Rendimento (%)
VTs total	1000	16.000	82	82.000	5,125	1	100
VTs >10 kDa	1000	12.800	72	71.993	5,624	1,10	87,80
DEAE F8	100	102	33,3	3.333	32,680	6,38	4,07
GF F8.2	100	12,84	31,9	3.185	248,057	48,40	3,88

VTs = veneno de *Tityus serrulatus*; VTs > 10 kDa = VTs após a membrana de corte molecular de 10 kDa; DEAE F8 = fração 8 da cromatografia por troca aniônica e GF F8.2 = fração 8.2 da cromatografia por exclusão molecular (gel- filtração).

4.5.1 Parâmetros bioquímicos da atividade hidrolítica da antarease: influência do pH, presença de sais, temperatura e inibidores classe específicos

O efeito da variação de pH sobre a atividade da antarease foi analisado entre pH 5,0 e pH 10,0, sendo observada a maior atividade em pH 8,0 e perda completa de sua atividade hidrolítica em pH 5,0 (Figura 26A). Com a determinação do pH ótimo de atividade, avaliamos a influência de diferentes sais em sua atividade. Quando incubada com 50 mM de KCl, NaCl, LiCl, CaCl₂ ou MgCl₂, a antarease teve sua atividade reduzida ou nula comparada à incubação com apenas o tampão bórax-ácido bórico 50 mM pH 8,0. Os sais monovalentes, cloreto de potássio, o cloreto de sódio e cloreto de lítio causaram a diminuição de 90% da atividade da antarease, enquanto a presença dos sais divalentes, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio, inibiu completamente sua atividade (Figura 26B).

Figura 26 - Efeito do pH e influência de cátions sobre a atividade da antarease



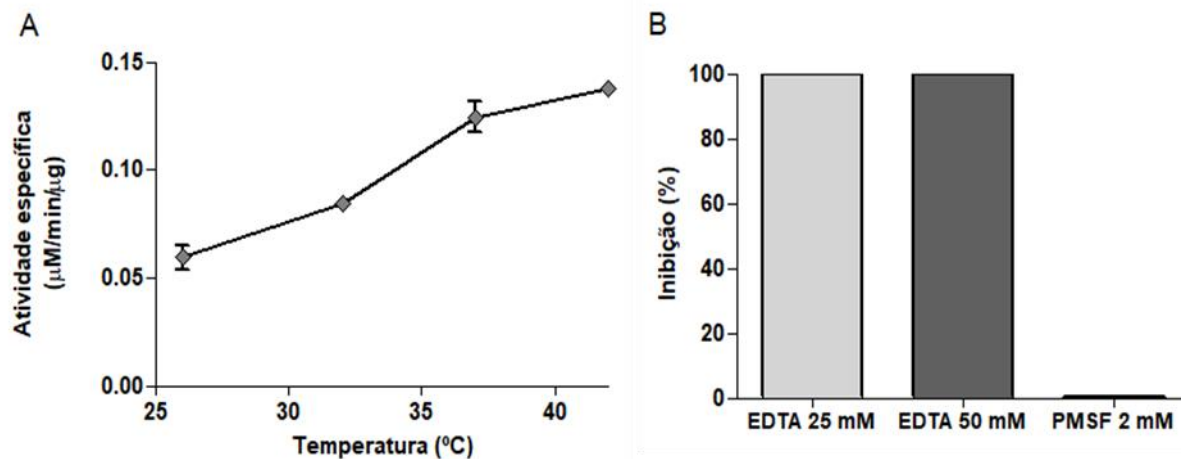
Fonte: Silva, CCF (2022).

Efeito do pH e influência de sais sobre a atividade da antarease (107 ng) sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM). A) Atividade da antarease sob pH 5,0 ao pH 10,0 e B) Atividade da antarease em tampão bórax - ácido bórico 50 mM, pH 8,0 e adição dos cátions monovalentes e divalentes na concentração de 50 mM cada. A reação foi monitorada durante 30 minutos a 37 °C.

A influência da temperatura na atividade hidrolítica da antarease foi analisada com a variação de temperatura entre 26 a 42 °C (Figura 27A). Foi observado o aumento da atividade hidrolítica da antarease conforme o aumento da temperatura utilizada, sendo a maior atividade em 42 °C. A atividade da antarease também foi verificada frente aos inibidores classe específicos, EDTA e PMSF. O EDTA em duas concentrações, 50 e 25 mM, inibiu totalmente

atividade da antarease, enquanto 2 mM PMSF após 30 minutos de incubação, não alterou sua atividade (Figura 27B).

Figura 27 - Efeito da temperatura e de inibidores sítio específicos sobre a atividade da antarease



Fonte: Silva, CCF (2022).

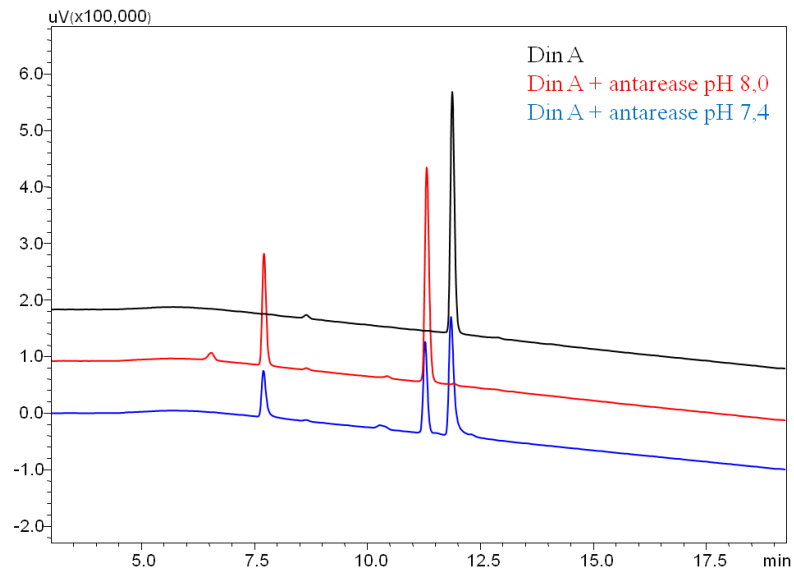
Efeito da temperatura e de inibidores de metalo e serino peptidases sobre a atividade da antarease (107 ng) sobre Abz-FLRRV-EDDnp. A) a atividade da antarease sob 26 $^{\circ}\text{C}$ a 42 $^{\circ}\text{C}$ e B) frente a inibidores de metalo e serino peptidases, EDTA 25 e 50 mM, e 2 mM PMSF.

4.5.2 Especificidade da antarease: ponto de clivagem em substrato FRET e substratos naturais

Após os experimentos de caracterização dos parâmetros de atividade da antarease, as incubações em que foram observadas atividades mais efetivas foram retiradas dos poços e seguiram para a análise por espectrometria de massas LC-MS a fim de obter o(s) ponto(s) de clivagem do substrato Abz-FLRRV-EDDnp. A análise por LC-MS mostrou que a antarease hidrolisa em um único ponto, entre as argininas, Abz-FLR↓RV-EDDnp.

Em relação a ação da antarease sobre a dinorfina A (1-13), a análise pelo perfil cromatográfico exhibe a clivagem completa da dinorfina pela antarease quando incubada em pH 8,0 e clivagem parcial em pH 7,4 (Figura 28). A análise por LC-MS confirmou um único ponto de clivagem em YGGFLR↓RIRPKLK.

Figura 28 - Perfil cromatográfico após a incubação da dinorfina A com a antarease

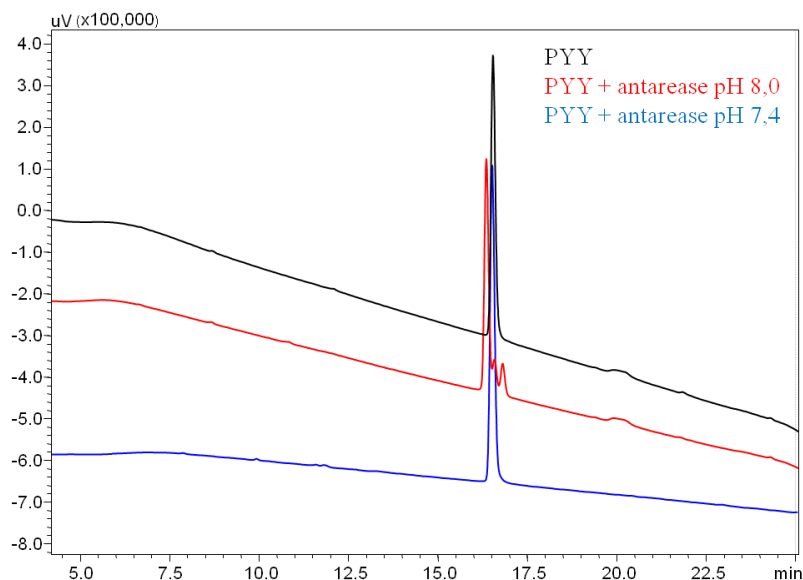


Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico após a incubação da dinorfina A (30 μ M) com a antarease (107 ng). Em preto, a dinorfina A (controle), em vermelho, a incubação da dinorfina A e antarease em tampão 50 mM bórax - ácido bórico pH 8,0 e em azul, dinorfina A na presença da antarease em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4. Todas as incubações ocorreram por 2 horas a 37 °C. Cromatografia realizada em coluna C-18 (Restek) em HPLC (Shimadzu), com fluxo 1 mL/min por 40 min.

A ação da antarease sobre o peptídeo YY foi observada quando a incubação ocorreu no pH ótimo para a peptidase, pH 8,0. Um ponto de clivagem foi verificado pela análise do perfil cromatográfico (Figura 29) e confirmada por LC-MS, sendo a hidrólise entre a Arg e His, YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLR↓HYLNLVTRQRY-NH₂.

Figura 29 - Perfil cromatográfico após a incubação do peptídeo YY com a antarease



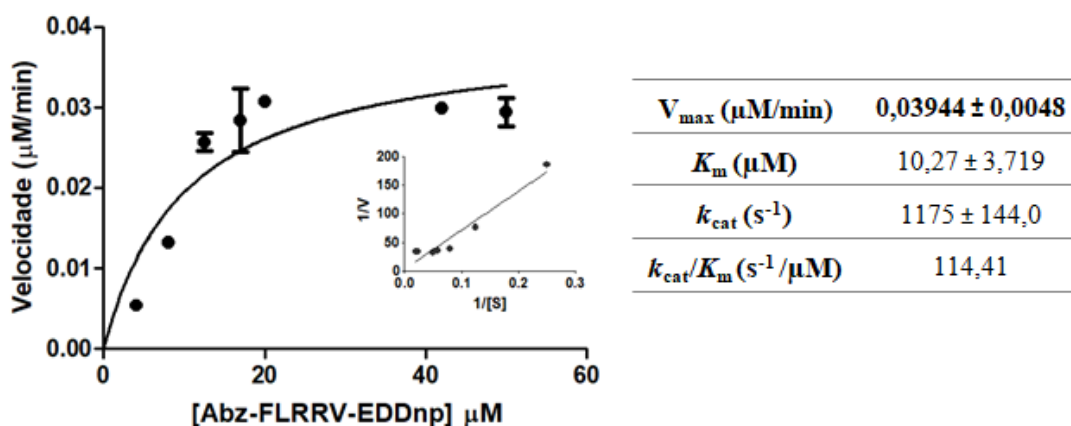
Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico após a incubação do peptídeo YY, PYY (23,2 μM) com a antarease (107 ng). Em preto, PYY (controle), em vermelho, a incubação do PYY e antarease em tampão 50 mM bórax - ácido bórico pH 8,0 e em azul, PYY na presença da antarease em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4. Todas as incubações ocorreram por 6 horas a 37 °C. Cromatografia realizada em coluna C-18 (Restek) em HPLC (Shimadzu), sob fluxo de 1 mL/min por 40 min.

4.5.3 Parâmetros cinéticos da antarease: determinação K_m e k_{cat}

A constante de Michaelis-Mentem, K_m , para a atividade da antarease sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp foi determinada como $10,27 \pm 3,72 \mu\text{M}$ e a constante catalítica, k_{cat} , definida foi de $1175 \pm 144,0 \text{ s}^{-1}$ (Figura 30).

Figura 30 - Constantes cinéticas da atividade da antarease sobre Abz-FLRRV-EDDnp



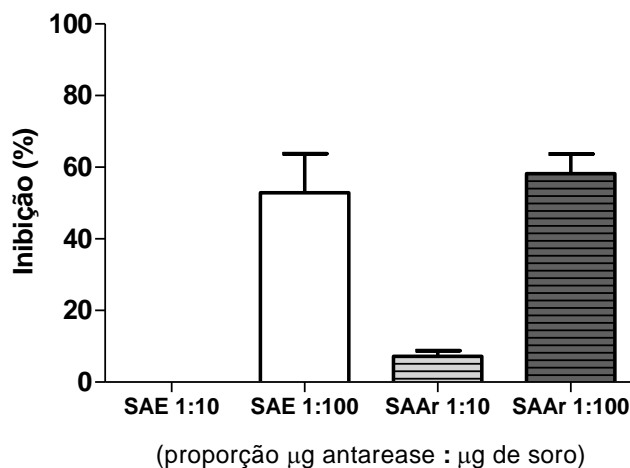
Fonte: Silva, CCF (2022)

Gráfico da determinação da constante de Michaelis-Menten para a hidrólise de Abz-FLRRV-EDDnp pela antarease. A tabela exibe os valores obtidos para V_{\max} , K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m com os respectivos desvios padrões obtidos no programa GraphPad Prism. Experimento realizado em duplicata.

4.5.4 Inibição da atividade da antarease frente aos soros antiaracnídico e antiescorpionico produzidos pelo Instituto Butantan

O ensaio de soroneutralização *in vitro* com os soros antiescorpionico (SAE) e antiaracnídico (SAAr) mostrou que nas condições testadas, a atividade da antarease foi parcialmente inibida (Figura 31). Em média, 53% da atividade da antarease é inibida pelo SAE na proporção de 1:100, 7% na incubação da antarease com SAAr na proporção de 1:10, e 58% de inibição da atividade hidrolítica da antarease quando o SAAr foi utilizado na proporção de 1:100.

Figura 31 - Soroneutralização da atividade da antarease *in vitro*



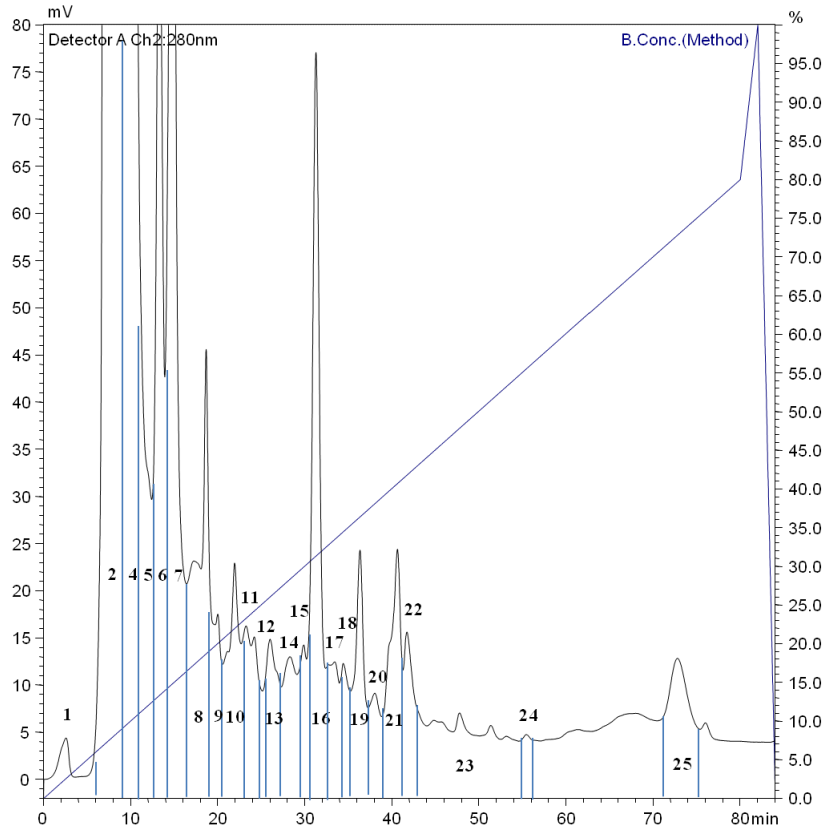
Fonte: Silva, CCF (2022).

Ensaio *in vitro* de soroneutralização da atividade da antarease (107 ng) sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 μM) frente a incubação com o soro antiescorpiônico (SAE) e soro antiaracnídeo (SAAR) com 1:10 e 1:100, proporção μg de antarease para μg de antiveneno. A reação ocorreu em tampão bórax - ácido bórico 50 mM, pH 8,0 e foi monitorada por 30 minutos. Experimento realizado em duplicata.

4.6 Atividade e identificação da fração F15.2

Novas etapas de fracionamento do veneno de *T. serrulatus* a partir de lote Ts/V170002 foram realizadas. Deste modo avaliamos a atividade enzimática da fração F15, obtida após a cromatografia por troca aniônica (Figura 32), cromatografia por gel filtração e SDS-PAGE (Figura 33, painéis A e B, respectivamente). A atividade hidrolítica da fração F15 sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 foi de $281,17 \pm 55,5$ UF/min e da fração F15.2, foi de $136,7 \pm 82$ UF/min/ μg .

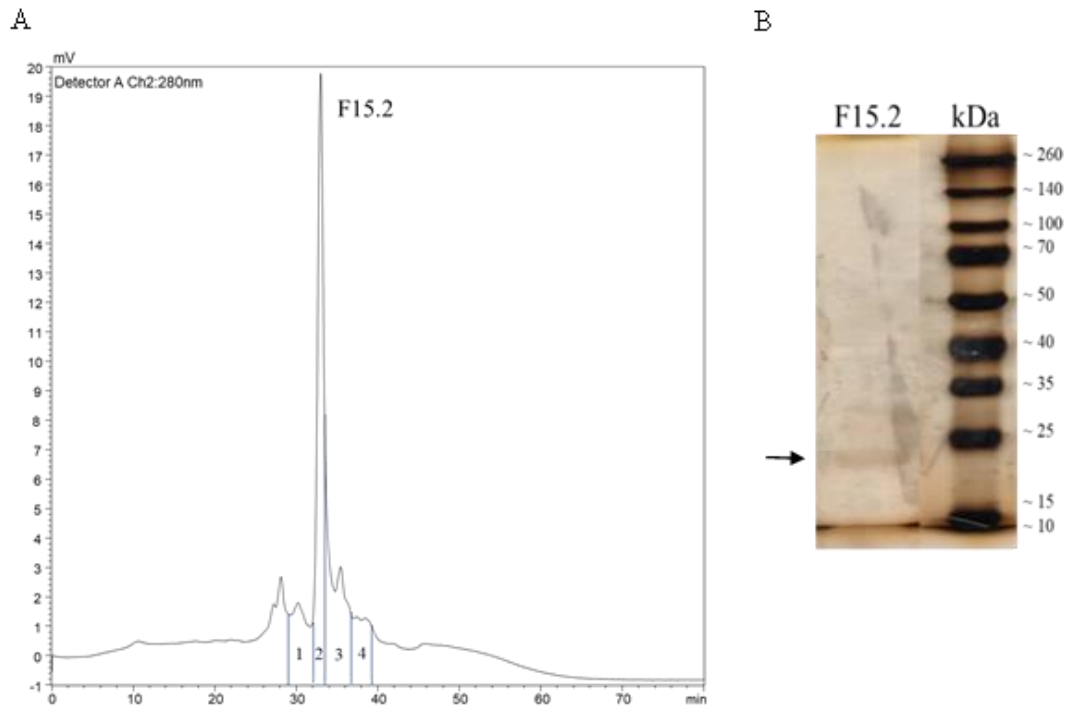
Figura 32 - Perfil cromatográfico da porção maior que 10 kDa do veneno de *Tityus serrulatus*



Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico da porção maior que 10 kDa do veneno de *Tityus serrulatus* (Lote Ts/V170002) Cromatografia por troca aniônica em coluna Shim-Pack PA-DEAE, sob fluxo de 3 mL/min em tampão A (Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2) e tampão B (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,2) em HPLC (Shimadzu). A linha azul representa o gradiente de concentração do tampão B, de 0 - 80% em 80 minutos. Detecção em 280 nm.

Figura 33 - Perfil cromatográfico da fração F15 em coluna de gel-filtração e SDS-PAGE de F15.2



Fonte: Silva, CCF (2022).

A) Perfil cromatográfico da fração F15 em coluna de gel filtração Shim-Pack DIOL-300 sob fluxo de 0,5 mL/min durante 80 minutos em tampão sulfato de sódio 200 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Detecção em 280 nm. B) SDS-PAGE 12,5% em condição não-redutora da amostra F15.2 (1 µg). Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

Foi realizada a digestão *in gel* da banda do gel indicada pela seta (Figura 33B). O resultado obtido pela análise por LC-MS/MS da banda de aproximadamente 23 kDa indica a presença de uma metalopeptidase identificada por dados do transcriptoma da glândula de veneno de *Tityus serrulatus* (DE OLIVEIRA et al., 2018), com acesso A0A218QWY7 (Figura 34). Os peptídeos identificados de F15.2 cobrem 10% da sequência obtida a partir do transcrito total, e quando consideradas as regiões do peptídeo sinal e pró-peptídeo preditas, a cobertura aumenta para 13% da proteína madura.

Figura 34 - Identificação da banda da fração F15.2 por espectrometria de massas

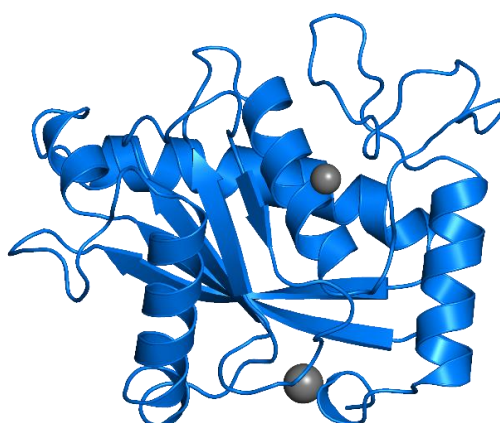
```
>tr|A0A218QWY7|A0A218QWY7_TITSE Putative metalloproteinase (Fragment) OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=3 SV=1
1  IFVFTVSAI PTGREDDVFP WVETSRSGVK TVKFRTLGED IELKLEPAGD ILAKDFALLD LNNQRQPSVD VEKLRKRIYR
81  DSANGAALLI DDEEPSIEG IVNSKLRIAP HESRELNQYG GRAHRIVELT SDKNPSLRHD VISRNIQRQI ANFTSVSRED
161 KCIIVVEFLCV TESKFSEFK TNEALTEYVT QMFTGVQNMV DTMNLEIKIR LIGIQAFTKE NEPSYIKESD VQNGKYLHSD
241 IIYKANNYYC KNATGLAQA DIIMLIVSRL LVWVKDSKVT GSAIGIALGA SACNKCEKVG VSLDETDYNE RTITIAHEAG
321 HMLGVPHDGQ ESTEAEVPNG PGAKSCPYPD GYIMGSTIEP NMLKFSKCSK ESAKYFFTLF QASCLREDCP NSGY
```

Fonte: Silva, CCF (2022).

Identificação da banda da fração F 15.2 (banda de 24 kDa) por espectrometria de massas no LTQ Orbitrap Velos. A sequência do peptídeo sinal está destacada em laranja, e a região do pró-peptídeo, em verde. Os espectros obtidos da digestão trípica *in gel* estão representados pelo sublinhado em azul. Sublinhados em cinza representam os peptídeos encontrados no sequenciamento *de novo*.

Com a sequência primária de F15.2 foi possível realizar a busca por um modelo de estrutura tridimensional similar utilizando o programa Phyre² (Figura 35). O melhor *template* encontrado foi a metalopeptidase acutolisina A, do veneno da serpente *Deinagkistrodon acutus* (código PDB 1BSW). O programa indicou que a F15.2 apresenta 26% de identidade e 82% de cobertura da acutolisina A, e que a estrutura secundária de F15.2 pode ser composta de 30% de alfa-hélices, 21% de folhas-beta e 17% estruturas aleatórias

Figura 35 - Modelo tridimensional da acutolisina A



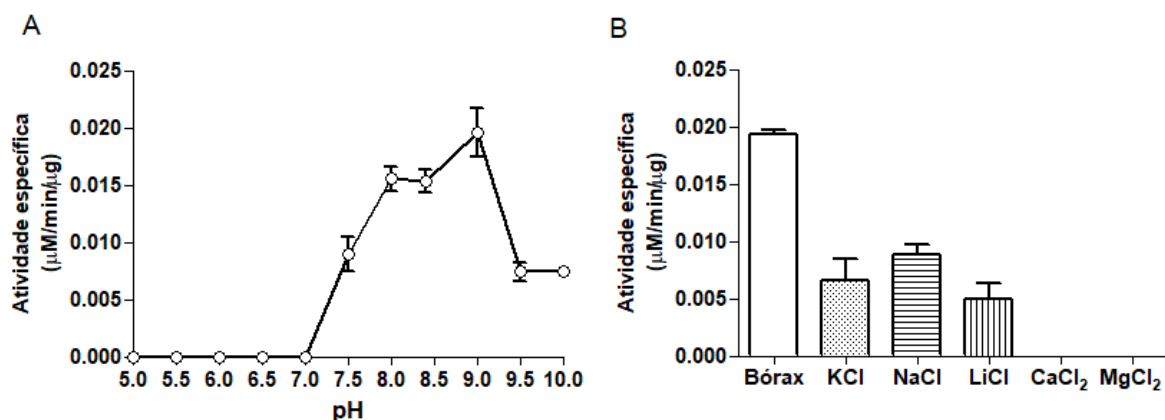
Fonte: Gong et al. (1998).

Modelo estrutural da acutolisina A (código PDB 1BSW), o melhor *template* encontrado para predição da estrutura da F15.2 no programa Phyre². A esfera cinza superior representa o sítio de ligação do zinco, e a esfera cinza inferior, representa o íon de cálcio.

4.6.1 Parâmetros bioquímicos da atividade hidrolítica de F15.2: influência do pH, presença de sais, temperatura e inibidores classe específicos

A atividade de F15.2 se mostrou dependente de um meio básico, sendo determinado como ótimo para sua ação o pH 9,0 (Figura 36A), sua atividade enzimática é reduzida em mais de 50% na presença dos cátions monovalentes, enquanto na presença dos divalentes a peptidase perde sua atividade (Figura 36B).

Figura 36 - Efeito do pH e influência de cátions sobre a atividade da fração F15.2

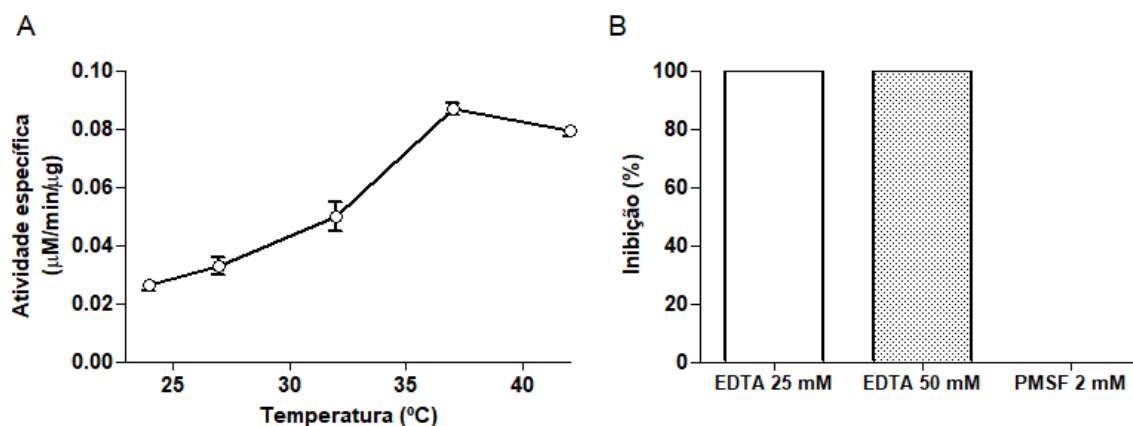


Fonte: Silva, CCF (2022)

Efeito do pH e influência de sais sobre a atividade da fração F15.2 (330 ng) sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 µM). A) Atividade da fração sob pH 5,0 ao pH 10,0 e B) Atividade de F15.2 em tampão bórax - ácido bórico 50 mM, pH 9,0 e adição dos sais monovalentes e divalentes na concentração de 50 mM cada. A reação foi monitorada durante 30 minutos a 37 °C.

A temperatura ótima de atividade de F15.2 foi determinada como 37 °C, sendo sua atividade totalmente inibida por EDTA e não alterada pela incubação com PMSF, confirmando sua classe enzimática (Figura 37).

Figura 37 - Efeito da temperatura e dos inibidores sítio específicos sobre a atividade de F15.2



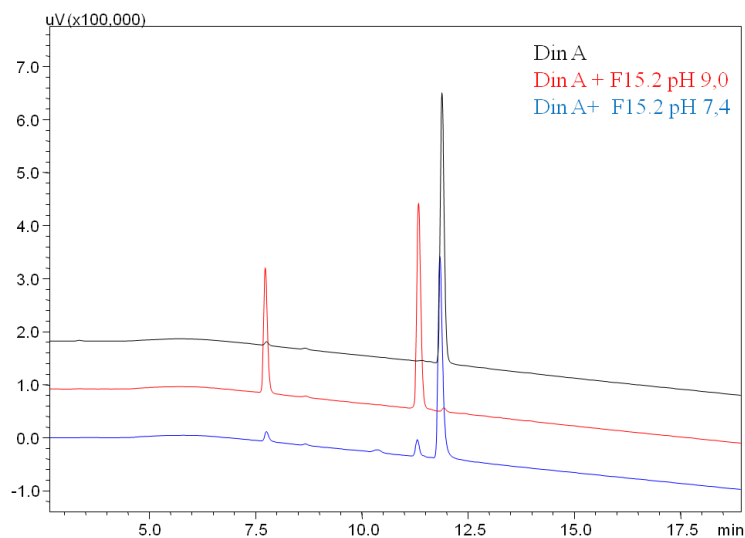
Fonte: Silva, CCF (2022).

Efeito da temperatura e inibidores de metalo e serino peptidases sobre a atividade da fração F15.2 (0,33 μg). A) a atividade de F15.2 sob 24 a 42 °C e B) frente a inibidores de metalo e serino peptidases, EDTA 25 e 50 mM, e 2 mM PMSF.

4.6.2 Especificidade da fração F15.2: ponto de clivagem em substrato FRET e substratos naturais

A análise por LC-MS indicou a hidrólise entre as argininas em Abz-FLR↓RV-EDDnp pela ação de F15.2. O perfil cromatográfico da incubação com a dinorfina A com a F15.2 exibe a clivagem completa do substrato no pH ótimo de F15.2, pH 9,0. Enquanto a incubação pelo mesmo período (2 h) em pH 7,4 indica que houve atividade, porém significativamente menor (Figura 38). O LC-MS mais uma vez confirmou a clivagem feita por F15.2 entre as argininas no substrato natural, YGGFLR↓RIRPKLK.

Figura 38 - Perfil cromatográfico após a incubação da dinorfina A com a fração F15.2

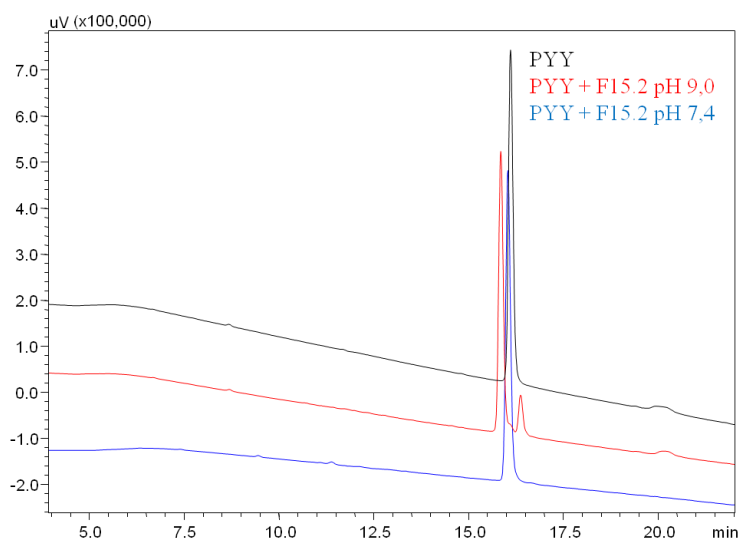


Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico após a incubação da dinorfina A (30 μM) com a fração F15.2 (0,33 μg). Em preto, a dinorfina A (controle), em vermelho, a incubação da dinorfina A e F15.2 em tampão 50 mM bórax - ácido bórico pH 9,0 e em azul, dinorfina A na presença de F15.2 em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4. Todas as incubações ocorreram por 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Cromatografia realizada em coluna C-18 (Restek) em HPLC (Shimadzu), sob fluxo de 1 mL/min por 40 min.

Em relação a atividade enzimática de F15.2 sobre o peptídeo YY, a análise por HPLC indica a clivagem total do substrato quando realizada a incubação em pH 9,0 e não em pH 7,4 por 6 horas (Figura 39). O resultado por LC-MS dessa clivagem identificou apenas um ponto de hidrólise entre Arg e His, YPIKPEAPGEDASPEELNRY \downarrow YYASLR \downarrow HYLNLVTRQRY-NH $_2$.

Figura 39 - Perfil cromatográfico após a incubação do peptídeo YY com a fração F15.2

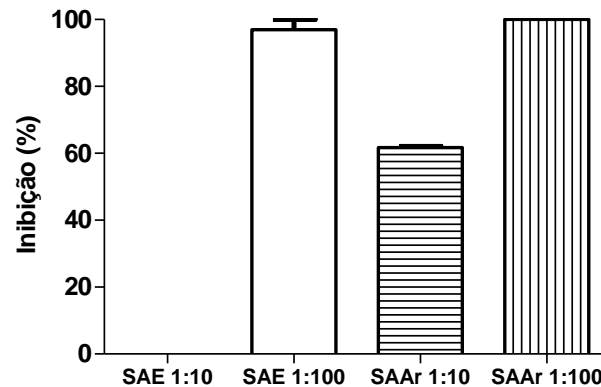


Fonte: Silva, CCF (2022).

Perfil cromatográfico após a incubação do peptídeo YY, PYY (23,2 μ M) com F15.2 (0,33 μ g). Em preto, PYY (controle) e em vermelho a incubação do PYY e F15.2 em tampão 50 mM bórax - ácido bórico pH 9,0 e em azul, PYY na presença de F15.2 em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4. Todas as incubações ocorreram por 6 horas a 37 °C. Cromatografia realizada em coluna C-18 (Restek) em HPLC (Shimadzu) fluxo 1 mL/min por 40 min.

4.6.3 Inibição da atividade de F15.2 frente aos soros antiaracnídico e antiescorpiônico produzidos pelo Instituto Butantan

O ensaio de soroneutralização *in vitro* com os soros antiescorpiônico (SAE) e antiaracnídico (SAAr) mostrou que nas condições testadas, a atividade de F15.2 foi bem inibida pelos soros na proporção 1:100 (Figura 40). Quando analisada a menor concentração testada, 1:10, o SAE parece não alterar a atividade de F15.2 sobre Abz-FLRRV-EDDnp. Em média, 61,7% da atividade de F15.2 é inibida pelo SAAr na menor dose testada, 1:10.

Figura 40 - Soroneutralização da atividade da fração F15.2 *in vitro*

Fonte: Silva, CCF (2022).

Ensaio *in vitro* de soroneutralização da atividade da fração F15.2 (330 ng) sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp (5 μ M) frente a incubação com o soro antiescorpiônico (SAE) e soro antiaracnídeo (SAAr) com 1:10 e 1:100, proporção μ g de F15.2 para μ g de antiveneno. A reação ocorreu em tampão bórax - ácido bórico 50 mM, pH 9,0 e foi monitorada por 30 minutos. Experimento realizado em duplicata.

4.7 Análise da similaridade entre as metalopeptidases

Foi realizado o alinhamento múltiplo com as sequências das peptidases estudadas neste trabalho a fim de verificar o grau de identidade e similaridade entre estas (Figura 41).

Figura 41 - Alinhamento das metalopeptidases TsMS 3, TsMS 4, antarease e F15.2

```

A0A076L332 | TsMS4      EDQCVS I KYLFLTDSNFRSGFPNPKDMETYFATMFILVQEDMDTLKLNIVSLIGIEP--
P86392 | antarease     DD-CIVVEYYIVTDSAFTRKFKSNSALTNVVTVMFTGVQNLMDTLELGIGVRLGVTTF
A0A076L3I0 | TsMS3     EDKCIVVESL CVTESRFRTRFKTNQALTEYVTLMFTGAQNM YDTMNLGIKLRLLIGVQAF
A0A218QWY7 | F15.2     EDKCIVVEFLCVTESKFSERFKTNEALTEYVTQMFTGVQNM YDTMNLGIKIRLIGIQAF
: * * : : : : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
: * * : : : : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

A0A076L332 | TsMS4      VKNETNFVKESLIPG-EEVDFDFGHVVGNLNVLNCKYKDNELYKKADSIMFITKRLLG
P86392 | antarease     EKTEPSFIKDNLIPGPPAAFDPDLVISAMSKYYCNHQTG-LAKDIDLIFLITARGMGDPR
A0A076L3I0 | TsMS3     INTEPSFIKTNEVKN--GKYLKFSILDDMNSYYCKNATG-LAKDADIIILII TRTMVLMK
A0A218QWY7 | F15.2     KENEPSYIKESDVQN--GKYLHSDI IYKANNYYCKNATG-LAQKADIIMLIVSRLLVWVK
: * . . . : * : : : : : : : * : . * : . : * * * : * : * :
: * . . . : * : : : : : : : * : . * : . : * * * : * : * :

A0A076L332 | TsMS4      PDGSVSTNTLGVANLGGACNPNCLKTGVIKDYGDMTLLANTVAHEETAHQIGSPH
P86392 | antarease     EDGTVDINTAGIANSAGVCKPCFKSGIATDDSDYNERVDTLAHESVHLLGSPH
A0A076L3I0 | TsMS3     -GSQIENEAVGLALGGGACLTCEKSLVMADETDYNER TISLAHEAHLLAVPH
A0A218QWY7 | F15.2     -DSKVTGSAIGIALGASACNKCEKVGVSLETDYNER TITIAHEAGHMLGVPH
: . : : : * : * : . . . * * * : * * . . : * * * : * : * * * :
: . : : : * : * : . . . * * * : * * . . : * * * : * : * * * :

A0A076L332 | TsMS4      -SLPGSPTGEKCPGSQGYIMGDSKGENKGFSPCTRENVKFFLNKDEASCVVSACKSTV-
P86392 | antarease     VSLEGSPGAANCPAKAGYIMGNRNDKNKYKFSPTKKCV EYLLSKPTASCIFQOCTD---
A0A076L3I0 | TsMS3     SDIPNSPGAKSCRYGEGYIMGTSIGPNMLKFSKCSIACAKYFLSLPQASCLYEDCPSSAY
A0A218QWY7 | F15.2     A EVPNGPGAKSCPYDDGYIMGSTIEPNMLKFSKCSKESAKYFFTL P QASCLREDCPNSGY
: . : . * . . * * : * * * : * * * : . : : : . * * * : * :

```

Fonte: Silva, CCF (2022).

Alinhamento das formas maduras da antarease (P86392), TsMS 3 (A0A076L3I), TsMS 4 (A0A76L332) e da metalopeptidase identificada na fração F15.2 (A0A218QWY7) utilizando a ferramenta de alinhamento múltiplo MUSCLE. A sequência HExxHxxGxxH e o Met-turn, que formam o sítio de ligação do zinco, estão sublinhados. Em cinza estão destacados os resíduos de cisteínas.

As quatro metalopeptidases estudadas apresentam similaridade acima de 50% (Tabela 7). O alinhamento revelou a maior proximidade entre a metalloserrulase 3 e a metalopeptidase F15.2, que compartilham 66,1% de identidade e apresentam 80% de similaridade entre suas sequências primárias. A segunda maior similaridade entre as metalopeptidases selecionadas, foi entre a antarease e metalloserrulase 3, de 63,5% e com 47,9% dos resíduos de aminoácidos idênticos. Em relação a TsMS 4, esta compartilha 41% de sua estrutura primária com a antarease e 34,1 % com a F15.2. Quando comparadas, a antarease e F15.2 exibem 44,6% da estrutura primária idêntica e 63,5% de similaridade.

Tabela 7 - Porcentual de identidade e similaridade entre as metalopeptidases encontradas no veneno de *T. serrulatus*: TsMS 3, TsMS 4, antarease e F15.2. Valores obtidos a partir do alinhamento Pairwise, EMBOSS Water.

	Similaridade %	TsMS 4	antarease	TsMS 3	F15.2
Identidade %					
TsMS 4 (A0A076L332)			57,0	51,9	50,6
antarease (P86392)	40,9			60,5	63,5
TsMS 3 (A0A076L3I0)	33,2	47,9			80,1
F15.2 (A0A218QWY7)	34,1	44,6	66,1		

4.8 Ação do VTs sobre o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂

Uma vez observada a ação do VTs sobre a substrato análogo ao TNF- α , MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ (Figura 18), verificamos a ação do inibidor TAPI-1 sobre esse processo. A incubação com 10 μ M de TAPI-1 inibiu 65,4 % da atividade enzimática do VTs (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade hidrolítica do VTs > 10 kDa (2,6 µg) sobre o substrato MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ (5 µM) em tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 e na presença de 10 µM de TAPI-1. A reação ocorreu por 30 minutos monitorada em fluorímetro Hidex Sense, com comprimentos de onda de excitação e emissão, 320 e 405 nm, respectivamente

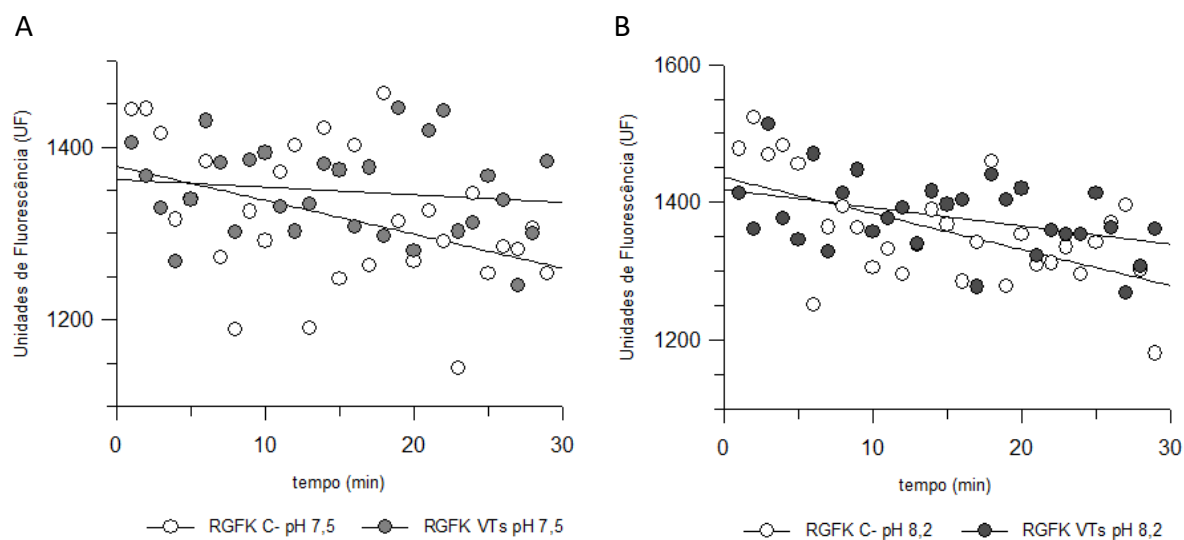
Amostra	UF/min/µg
VTs	32,51 ± 5,63
VTs + TAPI-1	11,25 ± 1,84

Não foi observada a hidrólise do substrato derivado do TNF- α pela TsMS 4, antarease e F15.2, em suas condições ótimas de atividade.

4.9 Atividade hidrolítica do VTs sobre o substrato Abz-RGFK(Dnp)-OH

A possível ação do veneno de *T. serrulatus* sobre o substrato FRET Abz-RGFK(Dnp)-OH foi analisada com a utilização do tampão Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. O resultado não indicou atividade enzimática nas duas condições testadas (Figura 42).

Figura 42 - Atividade do VTs sobre o substrato Abz-RGFK(Dnp)-OH



Fonte: Silva, CCF (2022).

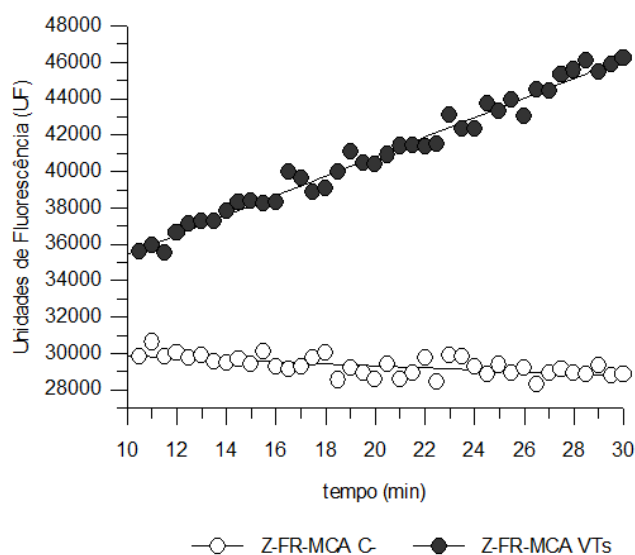
Gráfico representativo da incubação do veneno de *Tityus serrulatus* (VTs >10 kDa, 0,9 µg) com o substrato Abz-RGFK(Dnp)-OH (5 µM) em A) tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e B) Tris 20 mM, NaCl

20 mM, pH 8,2 O ensaio foi monitorado por 30 minutos em fluorímetro Victor 3, nos comprimentos de onda de excitação 320 nm e emissão em 420 nm. Como controle negativo (C-) apenas o tampão e substrato foram monitorados sob as mesmas condições.

4.10 Atividade hidrolítica de cisteíno peptidases presentes no VTs

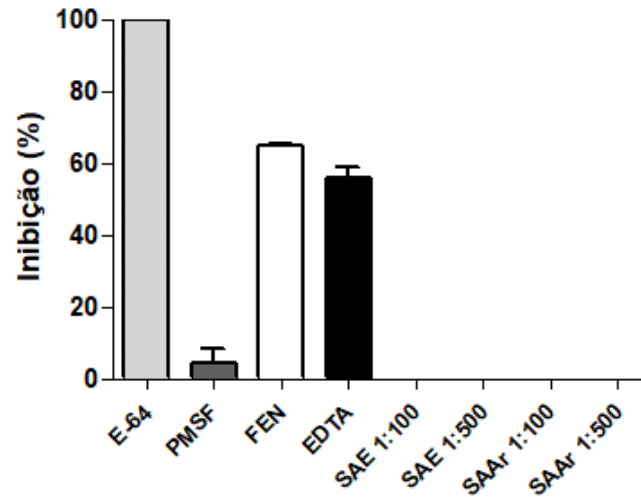
Foi observada a ação do veneno de *Tityus serrulatus* (porção do veneno acima de 10 kDa) sobre o substrato cumarínico Z-FR-MCA, com atividade de $179,16 \pm 4,22$ UF/min/ μ g de veneno (Figura 43). A hidrólise do mesmo substrato foi totalmente inibida na presença de 10 μ M de E-64, enquanto a incubação com 2 mM PMSF não alterou a ação do VTs (variação de 0 a 8,3% de inibição). Por sua vez, a incubação com os inibidores de metalopeptidases, EDTA e 1, 10-fenantrolina, inibiu entre 55% e 65% a hidrólise do substrato pelo VTs. O ensaio de soroneutralização *in vitro* com os soros antiescorpiônico e antiaracnídico em duas doses elevadas, 100 e 500 vezes em relação a massa de veneno utilizada, demonstrou que os soros não inibiram a atividade enzimática desempenhada pelo veneno de *Tityus serrulatus* sobre Z-FR-MCA (Figura 44).

Figura 43 - Atividade do VTs sobre o substrato Z-FR-MCA



Fonte: Silva, CCF (2022).

Gráfico representativo da atividade do veneno de *Tityus serrulatus* (1,3 μ g) sobre o substrato Z-FR-MCA (5 μ M) em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 6,25 mM, pH 5,5. O ensaio foi monitorado por 30 minutos em fluorímetro Hidex Sense, nos comprimentos de onda de excitação 380 nm e emissão em 460 nm. Como controle negativo (C-) apenas o tampão e substrato foram monitorados sob as mesmas condições.

Figura 44 - Inibição da atividade do VTs sobre o substrato Z-FR-MCA

Fonte: Silva, CCF (2022).

Ensaio de inibição e soroneutralização da atividade hidrolítica do VTs (1,3 µg) sobre o substrato Z-FR-MCA (5 µM). O ensaio foi realizado em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 6,25 mM, pH 5,5. A atividade foi monitorada por 30 minutos, após 30 minutos de pré-incubação do VTs com os inibidores ou soros específicos, nas seguintes concentrações; 10 µM E-64, 2 mM de PMSF, 2 mM de 1,10-fenantrolina, 50 mM de EDTA, soro antiescorpiônico (SAE) e soro antiaracnídeo (SAAr) proporção massa de veneno em µg por massa de soro em µg, 1:100 e 1:500.

5 DISCUSSÃO

O acidente ocasionado por escorpiões é um sério problema de saúde pública no Brasil, onde o número de acidentes registrados aumenta progressivamente desde 2012. Um dos maiores responsáveis por esses acidentes, o escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*, tem encontrado em centros urbanos condições propícias para sua proliferação, sendo ocasionalmente transportado para novas regiões do país. Fatores como o desequilíbrio ambiental, o crescimento desordenado de cidades, infraestrutura domiciliar inadequada e saneamento básico insuficiente estão diretamente relacionados ao aumento do escorpionismo (LISBOA et al., 2020). O treinamento de profissionais da saúde e o aprimoramento no sistema de notificação contribuem também para o melhor conhecimento desses casos. A severidade do acidente, especialmente em crianças, está associada ao intervalo entre a picada e o atendimento hospitalar (GUERRA et al., 2008), tornando fundamental a ampliação de políticas públicas voltadas à conscientização da população sobre o escorpionismo e sua prevenção.

Possuindo como principais funções a predação e a defesa, a peçonha de animais é uma complexa secreção de moléculas bioativas que em seres humanos podem afetar o funcionamento de diferentes órgãos, acarretando morbidade e mortalidade. Em escorpiões de interesse médico, o isolamento e caracterização de componentes do veneno levou ao maior conhecimento das toxinas atuantes em canais de sódio, cálcio e potássio, atribuídos a muitos dos sintomas manifestados no envenenamento (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). As neurotoxinas de canais representam aproximadamente 20% dos transcritos obtidos da glândula de veneno de *Tityus stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012), *T. bahiensis* (DE OLIVEIRA et al., 2015) *T. obscurus* e *T. serrulatus* (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Em *T. serrulatus*, além das neurotoxinas, é conhecida a presença de peptídeos que exercem outras funções, como as hipotensinas, os antimicrobianos e os inibidores enzimáticos. A análise por transcriptoma da glândula de veneno indicou que o conteúdo enzimático é representado por fosfolipases, hialuronidases, cisteíno, serino e metalopeptidases. Em adição, estes estudos demonstraram que cerca de 40% dos componentes do VTs estão relacionados às metalopeptidases (DE OLIVEIRA et al., 2018). Apesar dessa evidência, ainda são poucos os relatos de isolamento e caracterização desses componentes do VTs (BERTAZZI, 2007;

FLETCHER et al 2010; CAJADO-CARVALHO et al., 2016; CAJADO-CARVALHO et al., 2019).

Um dos primeiros estudos sobre os componentes proteolíticos do VTs foi realizado por Bertazzi (2007), com duas metalopeptidases, MQ-5 e MQ-7, bastante similares. Ambas são capazes de ativar o sistema complemento, induzindo a migração de neutrófilos, após clivagem de C3 e C5 e geração de suas formas ativas, C3a e C5a (BERTAZZI, 2007). MQ-5 e MQ-7 também apresentam ação fibrinogenolítica e caseinolítica. Nesse estudo foram identificados fragmentos peptídicos provenientes de digestão trípica de MQ-7 (LLGVTTTFTEK e ATDDSDYNER) e do sequenciamento de seu N-terminal (CIVVEYYIV). Com o conhecimento da sequência primária da antarease (FLETCHER et al., 2010) e das metaloserrulases (CARMO et al., 2014), é possível reconhecer que os mesmos fragmentos identificados da MQ-7 estão presentes na antarease e TsMS 1 apenas, indicando que a MQ-7 é a antarease.

Verano-Braga e colegas (2013) especulam que as peptidases do veneno de *Tityus serrulatus* podem ser responsáveis pelas modificações pós-traducionais no processamento de peptídeos e proteínas endógenas, aumentando deste modo, o repertório de fragmentos peptídicos com alvos e modos de ação diversos. Entretanto não é descartada a possível função desses componentes proteolíticos no aumento da permeabilidade de tecidos, promovendo o “espalhamento” de outras proteínas do veneno (ALMEIDA et al., 2002), ou ainda com ação direta no envenenamento, como por exemplo a antarease, por clivar a VAMP2 relacionada à pancreatite observada em alguns acidentes (FLETCHER et al., 2010). De modo díspar, Zornetta e colaboradores (2017) não observaram a ação hidrolítica da antarease recombinante sobre a VAMP2. Contudo, a mesma metalopeptidase recombinante afeta a junção neuromuscular de camundongos e moscas (*Drosophila melanogaster*) causando neuroparalisia por clivagem de proteínas na superfície da membrana pré-sináptica, impedindo a neuroexocitose (ZORNETTA et al., 2017).

O conteúdo proteolítico do VTs é diretamente relacionado à sua toxicidade, uma vez que Cajado-Carvalho e colaboradores (2017) observaram que lotes de veneno que apresentaram baixo nível de atividade proteolítica sobre o substrato FRET Abz-GFLRRV-EDDnp, também apresentaram valores de dose letal mediana, DL₅₀, mais elevados.

Tendo em consideração estudos que apontam a neutralização parcial da atividade de metalopeptidases do VTs pelos antivenenos disponíveis, torna-se importante identificar esses componentes a fim de contribuir para uma soroneutralização mais eficaz.

No presente trabalho, foram apresentadas novas informações sobre os componentes do VTs através da análise da ação das metaloserrulases TsMS 3 e TsMS 4 sobre macrófagos e a caracterização bioquímica de outras duas metalopeptidases, a antarease e a peptidase presente em F15.2. Para os estudos com as TsMS 3 e TsMS 4, novas etapas de purificação dessas metaloserrulases foram realizadas de acordo com Cajado-Carvalho et al. (2019). Inicialmente analisamos a citotoxicidade das metaloserrulases, e foi observado que tanto TsMS 3 quanto TsMS 4 não alteraram a viabilidade de macrófagos murinos nas doses testadas. Por esse dado, pode-se afirmar que o aumento das citocinas pró-inflamatórias é produto da ativação dos macrófagos e não decorrente de morte celular e extravasamento de citocinas.

O efeito diferencial de TsMS 3 e TsMS 4 sobre macrófagos, sendo observada dose-dependência na incubação de macrófagos com TsMS 3, sugere que não há contaminação por LPS nas peptidases avaliadas. No entanto, a quantificação de endotoxinas nas amostras usadas seria um controle importante a se fazer.

A TsMS 3 e TsMS 4, assim como o veneno total de *Tityus serrulatus* e algumas neurotoxinas isoladas do VTs, são capazes de ativar macrófagos, ocasionando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Fato este condizente com a observação do quadro de inflamação aguda, local e sistêmica em indivíduos acidentados.

De modo geral, TNF- α , MCP-1, IL-6 e IL-10 são citocinas liberadas após a estimulação de receptores da imunidade inata, incluindo TLRs (CHI et al., 2006). O pró-TNF- α é uma molécula ancorada à membrana de macrófagos ativados, monócitos e linfócitos, que sofre clivagem da porção transmembrana, e conseqüente liberação de TNF- α no meio extracelular, por ação da TACE, enzima também conhecida como ADAM 17 (RAWLINGS; SALVESEN, 2013; QU et al., 2017). Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de que as metalopeptidases do veneno de *T. serrulatus* possam clivar diretamente o TNF- α da membrana. Por outro lado, MCP-1, IL-6 e IL-10 são diretamente liberadas na sua forma solúvel (CHI et al., 2006) o que corrobora a ideia de que uma cascata de sinalização intracelular esteja sendo ativada pelas metalopeptidases do veneno. Os mecanismos pelos quais essa ativação ocorre ainda precisam ser estudados, mas poderiam envolver pelo menos dois fenômenos: (1) a ligação direta das peptidases aos receptores de imunidade inata dos macrófagos e (2) a clivagem de

moléculas da superfície celular pela ação direta das peptidases, gerando mediadores inflamatórios por estresse ou ligantes endógenos de receptores da imunidade inata.

A inibição da TsMS 3 e TsMS 4, previamente a incubação com os macrófagos, poderia indicar, ou não, a participação do sítio catalítico das peptidases no processo observado. Contudo o uso de inibidores como EDTA e 1,10-fenantrolina em cultura de macrófagos é, mesmo em menores concentrações, citotóxica.

Por análise de modelagem molecular teórica, Cajado-Carvalho (2017) observou que a TsMS 3 apresenta como melhor *template* teórico, a TACE (Figura 45). Ambas compartilham 32,6% de similaridade. Adicionalmente verificamos a ação do VTs e da TsMS 3 sobre o substrato peptídico análogo a pró-forma de TNF- α , Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂. Verificamos se o TAPI-1, inibidor da TACE/ADAM-17 e de MMPs, poderia inibir a atividade do VTs, e observamos uma redução de 65,4% na hidrólise do mesmo substrato. A análise com a TsMS 3 e TAPI-1 não foi conclusiva, necessitando maior quantidade da enzima para o teste. Estudos adicionais podem ainda verificar a capacidade de TsMS 3 de liberar TNF- α a partir de seu precursor. Em caso afirmativo, isso corresponderia ao aumento observado dessa citocina nos ensaios com os macrófagos. A TsMS 4, antarease e F15.2 não apresentaram atividade sobre o substrato Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂. Outro indício de atividade sobre o precursor de TNF- α seria a presença de uma ADAM 17-like no VTs, ainda não isolada, mas identificada pelo transcriptoma. A sequência da ADAM 17-like de *T. serrulatus* depositada no NCBI, de acesso GenBank: AMO02512.1, possui 38,4 % de identidade e 54,6 % de similaridade com a ADAM 17 humana (P78536).

Figura 45 - Modelagem molecular teórica preliminar da TsMS 3 ou ADAM-17



Fonte: Cajado-Carvalho, D. (2017).

Modelagem molecular teórica preliminar da metalloserrulase 3 utilizando o software Phyre². O modelo foi construído 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 a TsMS 3 foi a TACE (código PDB 2i47). O sítio catalítico está marcado em lilás e a metionina (Met-turn) em vermelho.

As metalloserrulases TsMS 3 e TsMS 4 possuem o tamanho predito de 22 kDa e 24 kDa, respectivamente. Contudo no SDS-PAGE em condição redutora, a massa molecular destas aparecem na altura de 35 kDa (Figura 9B). Apesar de curioso, isto já foi observado em outras proteínas (MARANGON et al., 2014; BERTAZZI, 2007). O motivo dessa diferença seria que em condições redutoras as proteínas sem as ligações dissulfeto podem adquirir uma conformação mais estendida, o que as faz ter taxas de migrações menores nas análises eletroforéticas em comparação com suas formas nativas.

Quanto à metodologia empregada para o isolamento das metalopeptidases, as purificações iniciais se basearam na detecção de absorvância em 214 nm, contudo, observamos que a detecção em 280 nm mostra um perfil com picos mais definidos (Figura 5 e 20) facilitando a coleta das frações. Consequentemente observamos perfis menos complexos nas etapas cromatográficas subsequentes (por exemplo, a comparação entre a cromatografia por gel filtração da fração F4 na primeira e na segunda purificação, Figuras 7 e 22A). Pela presença de aminoácidos aromáticos nas metalloserrulases conhecidas, este procedimento se mostra adequado. O rendimento obtido das metalloserrulases foi semelhante ao obtido no trabalho de Cajado-Carvalho e colaboradores (2019).

A fim de realizar o monitoramento da atividade enzimática, o substrato Abz-FLRRV-EDDnp, análogo à dinorfina, tem sido utilizado em estudos da avaliação da atividade das

metalopeptidases do VTs (CAJADO-CARVALHO et al., 2014; VENANCIO et al., 2013) e serviu de direcionamento para a purificação da TsMS 3 e TsMS 4 (CAJADO-CARVALHO, 2017). No presente trabalho encontramos outras frações que possuem atividade sobre esse substrato FRET e, portanto, torna-se uma ferramenta útil para a seleção de outras metalopeptidases presentes no veneno de *T. serrulatus*.

Muitas das frações provenientes da cromatografia por gel filtração com atividade sobre o FRET apresentaram proteínas de massa molecular próxima a 30 kDa, visualizadas por SDS-PAGE, e a maioria destas foram identificadas por LC-MS/MS como CRISPs, indicando que as mesmas eluem juntamente com as metalopeptidases com a metodologia utilizada e estão em quantidade elevada na porção acima de 10 kDa do veneno de *Tityus serrulatus*.

A fração F8.2 foi identificada como a metalloserrulase 1 e também como a antarease, por meio do resultado de espectrometria de massas. Alinhando as sequências destas duas proteínas, vimos que entre estas há apenas um resíduo de aminoácido diferente. Consideramos deste modo que a antarease é a forma madura, desprovida do peptídeo sinal e da região pró-peptídeo preditos da TsMS 1.

Embora um dos objetivos do trabalho fosse a busca de metalopeptidases inéditas, encontramos a antarease (M12.191) que representa a primeira metalopeptidase com a estrutura primária descrita do VTs (FLETCHER et al., 2010), e de ocorrência em muitos venenos da família Buthidae (ORTIZ et al., 2014). A antarease, presente na fração 8, assim como a TsMS 3 e TsMS 4, possui ação sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp e seu isolamento seguiu as mesmas etapas utilizadas para a purificação da TsMS 3 e TsMS 4; uma cromatografia por troca aniônica, seguida por uma de gel filtração. Diferindo da literatura apenas na ordem, em que a obtenção da antarease é descrita por uma etapa de cromatografia por gel-filtração em Sephadex G-50, seguida de uma cromatografia por troca aniônica (FLETCHER et al., 2010). No estudo de Bertazzi (2007), a purificação de MQ-7 iniciou com o veneno bruto sendo submetido à cromatografia por troca iônica (CM-Celulose-52), seguida pela gel-filtração (Sephacryl S-200), e um terceiro passo com a cromatografia por troca iônica em coluna Mono Q. No presente trabalho obtivemos um rendimento no isolamento da antarease de aproximadamente 4%, contudo, com a informação disponível dos outros trabalhos não é possível afirmar qual método de purificação seria o mais eficiente.

Nas análises de Fletcher e colaboradores (2010), a antarease possui atividade em condições fisiológicas, em pH 7,4 e a 37 °C. Observamos a hidrólise de Abz-FLRRV-EDDnp

pela antarease entre 26 °C e 42 °C, e diferente da TsMS 3 e TsMS 4 (temperatura ótima de atividade a 32 °C), a antarease apresenta em 42 °C o maior pico de atividade. No trabalho com a MQ-7, o substrato é hidrolisado na temperatura mínima testada de 4 °C até 50 °C, e foi demonstrado que a 76 °C a peptidase perde sua ação, possivelmente por sofrer desnaturação (BERTAZZI, 2007).

Em relação a influência do pH, Bertazzi (2007) detalhadamente demonstra que a atividade hidrolítica de MQ-7 acontece em pH 6,0 até o pH 9,0, o que condiz com a nossa observação da atividade peptidásica entre pH 5,5 e pH 10,0. Com uma tendência a meios levemente básicos (pH 8,0 - pH 9,0), a antarease apresenta como pH ótimo de atividade o pH 8,0, idêntico ao pH ótimo descrito para a atividade da TsMS 3 e da ser-ACE-like (CAJADO-CARVALHO, 2017; CAJADO-CARVALHO et al., 2019).

Comparando as constantes cinéticas obtidas da atividade da antarease sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp, com a atividade da TsMS 4 (CAJADO-CARVALHO et al., 2019), observamos que a antarease apresenta maior afinidade, de 2,7 vezes, ao FRET utilizado. O valor de k_{cat} obtido é semelhante ao da TsMS 4 para o mesmo substrato, $1176 \pm 144,0$ (s^{-1}) e $1108 \pm 33,2$ (s^{-1}), respectivamente, contudo, a constante de especificidade dada por k_{cat}/K_m indica que a antarease apresenta a maior especificidade, de quase 3 vezes, em relação a TsMS 4 para o substrato Abz-FLRRV-EDDnp, análogo a dinorfina A.

Quando verificada a ação da antarease sobre os peptídeos biologicamente ativos, dinorfina A (YGGFLRRIRPKLK) e peptídeo YY (YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂), foi observada a clivagem total desses substratos em pH 8,0, enquanto a incubação em pH 7,4 diminuiu ou anulou a atividade da antarease sobre os mesmos peptídeos. Já tendo sido observado por Venâncio e colaboradores (2013), a ocorrência da atividade de metalopeptidases do VTs preferencialmente em pH acima de 8,0. A antarease cliva a dinorfina em Arg-Arg, assim como descrito para a TsMS 4 (CAJADO-CARVALHO et al., 2019). A dinorfina A é um peptídeo opioide endógeno, e sua hidrólise pode estar relacionada com a dor intensa observada em pacientes envenenados (VENANCIO et al, 2013; CAJADO-CARVALHO, 2017). Ainda, as dinorfinas parecem exercer influência sobre o funcionamento do sistema cardiovascular e possivelmente na modulação da expressão de mediadores inflamatórios por monócitos e macrófagos (CISSOM; PARIS; SHARIAT-MADAR, 2020).

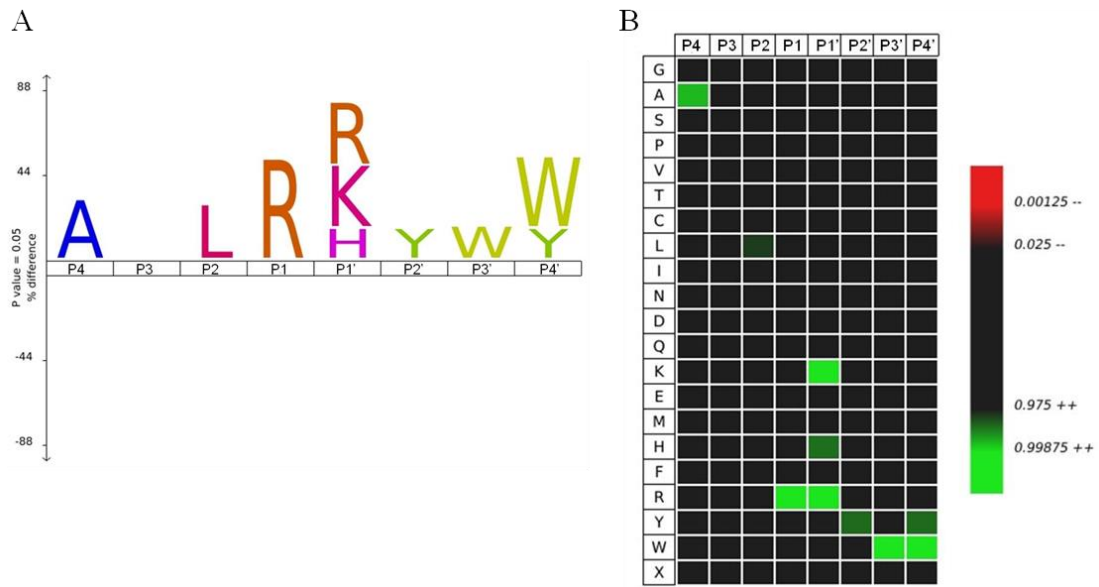
Em relação a hidrólise do peptídeo YY, a antarease atua entre Arg-His, enquanto a TsMS 3 cliva o mesmo substrato em dois pontos (Leu↓Arg e Thr↓Arg), e a TsMS 4 possui 10 sítios de clivagem distintos no mesmo substrato (CAJADO-CARVALHO et al., 2019). O peptídeo YY faz parte junto com o polipeptídeo pancreático, da família dos neuropeptídeos Y. Esses peptídeos estão envolvidos na comunicação entre o sistema gastrointestinal e o sistema nervoso central, o eixo intestino-cérebro. Também classificado como um hormônio intestinal, o peptídeo YY tem efeito na secreção e motilidade gastrointestinal (HOLZER; REICHMANN; FARZI, 2012). Considerando a maior susceptibilidade dos membros da família dos neuropeptídeos Y à ação das metalopeptidases do VTs (CAJADO-CARVALHO et al., 2014), a inativação desses neuropeptídeos/hormônios intestinais poderia também contribuir para as reações sistêmicas do envenenamento que incluem náusea, vômito, aumento das secreções pancreáticas e gástricas, que são manifestações atribuídas a liberação de acetilcolina (CUPO, 2015).

Até então os substratos conhecidos da antarease são a VAMP2 com a clivagem ocorrendo entre Leu↓Lys, e em VAMP8, entre os resíduos de Ala↓Arg e Arg↓Lys (FLETCHER et al., 2010). Com o resultado da espectrometria de massas da sua atividade sobre a dinorfina A e peptídeo YY, ampliamos um pouco mais o conhecimento sobre a especificidade primária da antarease (Tabela 9 e Figura 46). Segundo a análise realizada na plataforma online IceLogo, a antarease exibe grande preferência por substratos contendo o resíduo Arg em P1, assim como a TsMS 4. E na posição P1', também apresenta preferencialmente o resíduo de Arg, seguido por Lys e His, indicando sua preferência por resíduos de aminoácidos básicos nessa posição.

Tabela 9 - Substratos conhecidos da antarease

Substrato	Sítio de clivagem
Dinorfina A	GFLR↓RIRP
Peptídeo YY	ASLR↓HYLN
VAMP2	AAKL↓KRKY
VAMP8	QKVA↓RKFW
VAMP8	KVAR↓KFWW

Figura 46 - Sítios de clivagem preferenciais da antarease



Fonte: Silva, CCF (2022).

Sítios de clivagem preferenciais da antarease sobre seus substratos conhecidos. Exibidos em A) IceLogo e B) Heat map.

Em polipeptídeos precursores de proteínas e peptídeos biologicamente ativos é comum a clivagem da região do propeptídeo ocorrer entre os resíduos de Arg-Arg ou Lys-Arg, e em menor frequência entre Arg-Lys ou Lys-Lys; podendo envolver posteriormente a ação de dipeptidil amino ou carboxipeptidases para o processamento completo da molécula (KOZLOV; GRISHIN, 2007). Assim a especificidade conhecida da antarease e das metaloserrulases isoladas até o momento, reforçam a hipótese que estas poderiam atuar na maturação de moléculas bioativas, ou mesmo nas modificações pós-traducionais de proteínas e peptídeos endógenos do veneno (VERANO-BRAGA et al., 2013; CAJADO-CARVALHO et al., 2014).

Em relação a estrutura terciária das metalopeptidases do VTs, temos o modelo tridimensional predito da antarease, que foi recentemente disponibilizado no banco de dados de estruturas de proteínas AlphaFold (Figura 47). Essa plataforma tem provido a modelagem estrutural com acurácia próxima aos métodos experimentais já realizados para algumas moléculas (JUMPER et al., 2021).

Figura 47 - Estrutura predita da antarease pelo AlphaFold



Fonte: AlphaFold - Banco de dados de Estruturas de Proteínas (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2021). Modelo predito da estrutura da antarease, com score de confiança por resíduos de peptídeos >90.

Seguindo a mesma abordagem de isolamento das outras metalopeptidases purificadas, conseguimos isolar na fração F15.2 uma metalopeptidase que não consta na descrição das metaloserrulases de Carmo e colegas (2014). Essa metalopeptidase foi identificada com base nos transcritos obtidos da glândula de veneno, tendo como o acesso o código A0A218QWY7 no banco de dados Uniprot. Quando analisadas as estruturas primárias, a F15.2 possui a maior similaridade, de 80%, com a TsMS 3. E por abordagem *in silico* utilizando o programa Phyre2, seu modelo tridimensional predito apresenta maior similaridade com a estrutura obtida por cristalografia da metalopeptidase acutolisina A (M12.131), presente no veneno da serpente asiática *Deinagkistrodon acutus*. A acutolisina A é uma metzincina que possui 22 kDa de massa molecular, próximo ao tamanho visualizado por SDS-PAGE da F15.2, e é conhecida por sua forte atividade hemorrágica (GONG et al., 1998). Xu e colaboradores (2006) demonstraram que a acutolisina A adota dois estados nativos, um em pH levemente ácido (entre pH 6,0 - 7,0) em que a peptidase é estável e apresenta baixa atividade caseinolítica, e o segundo estado conformacional em que a acutolisina A possui maior atividade, entre os pH 7,5 e pH 9,0, possuindo como o ótimo para sua atividade caseinolítica o pH 8,5. A condição hemorrágica não é presente dentre os sintomas conhecidos do envenenamento por *T. serrulatus*, tornando pouco provável que a semelhança estrutural entre a F15.2 e acutolisina A possa indicar funções parecidas. Em relação ao pH, verificamos que a F15.2 tem sua ação hidrolítica condicionada a meios alcalinos, com seu pico de atividade em pH 9,0.

Observamos, assim como na antarease, a influência negativa dos cátions mono e divalentes na atividade de F15.2, diferente do observado para a TsMS 3 e TsMS 4, em que foi verificado o aumento da hidrólise na presença de NaCl e KCl (CAJADO-CARVALHO et al., 2019). Na antarease, mais pronunciadamente, os cátions monovalentes estudados reduziram 90% de sua atividade, e na F15.2 a redução na atividade na presença destes foi de 54% a 74%. Na presença dos cátions divalentes, a antarease e F15.2 perderam totalmente a atividade hidrolítica.

Assim como a antarease e TsMS 4, a F15.2 cliva a dinorfina A (YGGFLRRIRPKLK) em apenas um sítio, entre Arg-Arg. Outro substrato também hidrolisado pela F15.2 foi o peptídeo YY (YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂), entre os resíduos de Arg e His, do mesmo modo que a antarease, podendo estender a possível atuação como uma convertase também à F15.2.

Quando analisado o efeito dos antivenenos, SAE e SAAR, sobre a atividade da antarease e F15.2, observamos a inibição parcial, próximo a 60% da atividade da antarease *in vitro*, e na mesma dose (1:100), a F15.2 tem sua atividade totalmente inibida por ambos os soros. A maior soroneutralização de F15.2 corresponde ao que foi verificado para a TsMS 3 e TsMS 4 com o soro antiaracnídico (CAJADO-CARVALHO et al., 2019). Semelhante ao trabalho de caracterização da TsMS 3 e TsMS 4, verificamos uma tendência a maior inibição das metalopeptidases utilizando o SAAR em relação ao SAE, já na menor dose testada (1:10). A hipótese levantada por Cajado-Carvalho e colaboradores (2019) que poderia explicar este fenômeno seria a presença de metalopeptidases no veneno das aranhas *Loxosceles gaucho* (CHAIM et al., 2011) e *Phoneutria nigriventer* (DINIZ et al., 2018) que compõem o *pool* de imunização para a produção do SAAR, e que estas poderiam apresentar maior imunogenicidade que apenas o VTs utilizado para a produção do SAE. Consequentemente, o soro antiaracnídico teria um maior repertório de IgGs para o reconhecimento e bloqueio das atividades das metalopeptidases presentes no veneno *T. serrulatus*.

Estruturalmente todas as metalopeptidases estudadas no presente trabalho compartilham do mesmo padrão descrito por Carmo e colegas (2014), apresentando 8 resíduos de cisteína conservados, o que sugere que 4 ligações dissulfeto serviriam para a estabilização destas moléculas. Adicionalmente observamos na sequência primária depositada da TsMS 3, outros 2 resíduos de cisteína que poderiam compor mais uma ligação dissulfeto. O resíduo de cisteína adicional localizado próximo a região N-terminal é também observado na sequência de F15.2,

enquanto o outro resíduo encontrado mais próximo a região C-terminal, também é visto na antarease. Contabilizando 10 resíduos de cisteína na TsMS 3, 9 cisteínas na F15.2 e na antarease, sendo um destes não localizado na mesma posição, e apenas as 8 cisteínas consideradas conservadas presentes na TsMS 4.

Investigamos ainda a atividade do veneno de *Tityus serrulatus* sobre dois novos substratos, Abz-RGFK(Dnp)-OH e Z-FR-MCA.

O substrato Abz-RGFK(Dnp)-OH não foi hidrolisado pelo VTs sob as condições testadas. Esse FRET é reconhecido como substrato da neprilisina (NEP, CD10, endopeptidase neutra 24.11, EC 3.4.24.11) (BARROS et al., 2007) e, uma vez que a TsMS 10 foi reportada como pertencente à família das gluzincinas (CARMO et al., 2014), testamos a hipótese de o VTs conter uma NEP-like com a realização deste ensaio. As enzimas conversoras de endotelinas, ECE-like, também foram identificadas a partir do cDNA da glândula de veneno (DE OLIVEIRA et al., 2018) e fazem parte junto com a NEP, da família M13 das metalopeptidases. Assim como as ACEs, as ECEs, são encontradas em invertebrados, indicando que essas metalopeptidases apresentam um alto grau de conservação durante a evolução (MACOURS; HENS, 2004). Apesar da indicação da literatura, não pudemos confirmar a presença de uma NEP-like ou ECE-like no VTs com as condições testadas.

Verificamos também a ação do VTs sobre o Z-FR-MCA, um substrato suscetível à hidrólise por cisteíno e serino peptidases (RAWLINGS et al., 2018). Foi observada a presença de atividade cisteíno peptidásica por esta ser totalmente inibida por E-64. Não foi observada a atividade das frações provenientes da cromatografia por troca aniônica sobre o mesmo substrato, tornando necessário realizar outro procedimento cromatográfico para continuar a investigação sobre as cisteíno peptidases presente no VTs. Transcritos da glândula de veneno identificados como cisteíno peptidases já foram descritos para *T. bahiensis* (DE OLIVEIRA et al., 2015) e *T. obscurus*, além do *T. serrulatus* (DE OLIVEIRA et al., 2018), porém não há registros de isolamento destas a partir do veneno. No escorpião, *Hadrurus spadix*, uma cisteíno peptidase também foi relatada (ROKYTA; WARD, 2017), demonstrando a presença dessa classe enzimática no veneno de diferentes famílias de escorpiões. As cisteíno peptidases e catepsinas foram encontradas no trato digestório de *T. serrulatus* e duas destas foram isoladas utilizando o substrato Z-FR-MCA como indicador de atividade (FUZITA et al., 2015). Levando a questão se a função digestiva dessas peptidases poderia também ser exercida extracorporeamente com a presença destas no veneno. Em adição, não podemos excluir a ação

de cisteíno peptidases relacionadas a alguma manifestação durante o escorpionismo. Pertinente a isso, não verificamos o efeito neutralizante da atividade cisteíno peptidásica *in vitro*, mesmo nas maiores doses testadas, de 500 vezes a quantidade do VTs, por ambos os soros antiescorpiônico e antiaracnídico.

Em relação ao potencial de soroneutralização das metalopeptidases e da atividade cisteíno peptidásica, seria interessante realizar a comparação da efetividade dos soros produzidos no Instituto Butantan com o soro antiescorpiônico produzido na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e no Instituto Vital Brazil, haja vista a diferença de neutralização por estes antivenenos sobre a ação das hialuronidases do VTs (GUERRA-DUARTE et al., 2019).

Outro ponto a considerar seria a comparação do conteúdo da peçonha entre machos e fêmeas de *T. serrulatus*, uma vez que a diferença de sexo pode também revelar diferenças quanto a presença das peptidases e outros componentes em escorpiões (CID URIBE et al., 2017).

Além de entender os agentes que interferem com a homeostase e contribuir para a melhor neutralização dos efeitos tóxicos do VTs, os componentes isolados do veneno também podem se tornar ferramentas biotecnológicas para os estudos de outras patologias, como por exemplo, a atual comercialização da antarease recombinante para fins de pesquisa pela empresa norte americana MyBioSource (número de catálogo 1117729). A antarease também é objeto de patente nos Estados Unidos (US9149666B2) devido seu potencial uso clínico para o tratamento de blefaroespasma, enxaqueca, diabetes, hiperidrose, asma, dentre outras enfermidades, além de possíveis aplicações cosméticas, indicando que o estudo das peptidases do veneno de *Tityus serrulatus* e de outros animais pode revelar moléculas de grande interesse biotecnológico.

6 CONCLUSÕES

De forma geral, o presente trabalho apresenta informações sobre o conteúdo proteolítico do veneno de *Tityus serrulatus*, com a avaliação da atividade de quatro metalopeptidases e a indicação de atividade de ao menos uma cisteíno peptidase.

- As metalloserrulases 3 e 4 não apresentam citotoxicidade em macrófagos murinos, e são capazes de induzir a liberação das citocinas pró-inflamatórias, IL-6, MCP-1 e TNF- α , podendo contribuir para o efeito inflamatório do envenenamento por *T. serrulatus*.
- O veneno de *T. serrulatus* e a TsMS 3 possuem ação sobre o substrato análogo ao pró-TNF- α , MCA-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂. Indicando que o veneno do escorpião amarelo pode conter uma TACE-like.
- A condição ótima de atividade da antarease ocorre em pH 8,0, a 42 °C. Essa peptidase cliva eficientemente o substrato Abz-FLRRV-EDDnp, a dinorfina A e o peptídeo YY. Tendo como resíduo de aminoácido preferencial em P1 a arginina, e em P1', Arg, Leu e His. Sua atividade *in vitro* é parcialmente inibida pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico produzidos pelo Instituto Butantan.
- A peptidase presente em F15.2, pode ser reconhecida como uma nova metalloserrulase, a TsMS 21. Ela se diferencia das demais já caracterizadas por sua condição ótima de atividade ser em pH 9,0 a 37 °C. Tem a capacidade de clivar o substrato FRET Abz-FLRRV-EDDnp, a dinorfina A e o peptídeo YY nos mesmos sítios que a antarease. Sua atividade é totalmente inibida pelos soros antiescorpiônico e antiaracnídico produzidos pelo Instituto Butantan.

- Os resultados obtidos permitem afirmar que a antarease e as metalloserrulases do veneno de *Tityus serrulatus* conhecidas até o momento são capazes de degradar os peptídeos biologicamente ativos, dinorfina A e peptídeo YY.
- O veneno de *Tityus serrulatus* apresenta atividade sobre o substrato Z-FR-MCA, que é inibida por E-64, indicando a presença de ao menos uma cisteíno peptidase. Esta atividade não foi neutralizada utilizando doses elevadas dos soros antiescorpiônico e antiaracnídico.

REFERÊNCIAS¹

ALMEIDA, D.D.; SCORTECCI, K.C.; KOBASHI, L.S.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B. et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Genomics**, v. 13, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-362>>.

ALMEIDA, F.M.; PIMENTA, A.M.C.; DE FIGUEIREDO, S.G.; SANTORO, M.M. et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 1041 - 1045, 2002.

ALMEIDA, RAFAEL B. **Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil**. 161f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

AMORIM, F.G.; LONGHIM, H. T.; COLOGNA, C.T.; DEGUELDRE, M. et al. Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, e:148218, 2019. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1590%2F1678-9199-JVATITD-1482-18>>.

AMR, Z.S.; ABU BAKER, M.A.; AL-SARAIREH, M.; WARRELL, D.A. Scorpions and scorpion sting envenoming (scorpionism) in the Arab Countries of the Middle East. **Toxicon**, v. 191, p. 83 - 103, 2021.

ARMENTEROS, J.J.A.; TSIRIGOS, K.D.; SONDERBY, C.K.; PETERSEN, T. N.; WINTHER O. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 420 - 423, 2019.

BARROS, N.M.T.; CAMPOS, M.; BERSANETTI, P.A.; OLIVEIRA, V. et al. Neprilysin carboxydiptidase specificity studies and improvement in its detection with fluorescence energy transfer peptides. **Biological Chemistry**, vol. 338, p. 447 - 255, 2007.

BERTAZZI, DANIELA T. **Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento**. 155f. Tese (Doutorado em Toxicologia) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BRADFORD, MARION M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 284 - 254, 1976.

BRAGA-PEREIRA, G.F.; SANTOS, A.J. Asexual reproduction in a sexual population of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*, Buthidae) as evidence of facultative parthenogenesis. **The Journal of Arachnology**, v. 49, p. 185 - 190, 2021.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de controle de escorpiões**, Brasília, 72 p., 2009.

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

BRAZIL, VITAL. Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada do escorpião e seu tratamento. **Revista Médica de São Paulo**, v. 10, p. 385 – 390, 1907.

BORTOLUZZI, L.R.; QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 357 - 359, 2007.

BÜCHERL, WOLFGANG. Escorpionismo no Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 34, p. 9 - 24, 1969.

CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A.K.; KODAMA, R.T.; OLIVEIRA, A.K. et al. Neuropeptide Y Family-degrading metallopeptidases in the *Tityus serrulatus* venom partially blocked by commercial antivenoms. **Toxicological Sciences**, v. 142, p. 418 - 426, 2014.

CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A.K.; DUZZI, B.; IWAI, L.K. et al. Insights into the hypertensive effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom: purification of an angiotensin-converting enzyme-like peptidase. **Toxins**, v. 8 (12):348, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxins8120348>>.

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

CAJADO-CARVALHO, D.; SILVA, C.C.F.; KODAMA, R.T.; MARIANO, D.O.C.; PIMENTA, D.C.; DUZZI, B.; KUNIYOSHI, A.K.; PORTARO, F.V. Purification and biochemical characterization of TsMS 3 and TsMS 4: Neuropeptide-degrading metallopeptidases in the *Tityus serrulatus* venom. **Toxins**, v. 11: 194, 2019.

CARMO, A.O.; OLIVEIRA-MENDES, B.B.R.; HORTA, C.C.R; MAGALHÃES, B.F. et al. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon**, v. 90, p. 45 - 55, 2014.

CHAIM, O.M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.P. et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. **Toxins**, v. 3, p. 309 - 344, 2011.

CHI, H.; BARRY, S.P.; ROTH, R.J.; WU, J.J. et al. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. **PNAS**, v. 103, p. 2274 -2279, 2006.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. **Acta Tropical**, v. 107, p. 71 - 79, 2008.

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

CID URIBE, J.I.; JIMÉNEZ VARGAS, J.M.; FERREIRA BATISTA, C.V.; ZAMUDIO ZUÑIGA, F.; POSSANI, L.D. Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. **Toxicon**, v. 125, p. 91 - 98, 2017.

CISSOM, C.; PARIS, J.J.; SHARIAT-MADAR, Z. Dynorphins in development and disease: Implications for cardiovascular disease. **Current Molecular Medicine**, v. 20, 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.2174/1566524019666191028122559>>.

CODDINGTON, J.A.; COLWELL, R.K. Arachnida. In: LEVIN, S.C. **Encyclopedia of Biodiversity**. Nova York: Academic Press, 2001. p. 199 - 218.

COLAERT, N.; HELSENS, K.; MARTENS, L.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K. Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. **Nature Methods**, v. 6, p. 786 - 787, 2009.

COLOGNA, C.T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: An overview. **Protein & Peptide Letters**, v.16, p. 920 - 932, 2009.

COSTA, G.G.; SEREJO, L.F.M.; COELHO, J.S.; CANDIDO, D.M. et al. First report of scorpionism caused by *Tityus serrulatus*, described by Lutz and Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae), a species non-native to the state of Pará, Brazilian Amazon. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 53, 2020. Disponível em: <doi: 10.1590/0037-8682-0285-2019>.

CUPO, PALMIRA. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 642 - 649, 2015.

DE OLIVEIRA, U.C.; CANDIDO, D.M.; DORCE, V.A.C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. **Toxicon**, v. 95, p. 52 - 61, 2015.

DE OLIVEIRA, U.C.; NISHIYAMA, M.Y.; SANTOS, M.B.V.; SANTOS-DA-SILVA, A.P. et al. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. **PLoS ONE**, v. 13 (3), p. 1 - 23, 2018.

DEGHANI, R.; KAMIABI, F.; MOHAMMADI, M. Scorpionism by *Hemiscorpius* spp. In Iran: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0145-z>>.

DIAS, E.C.; LIBANIO, S.; LISBOA, H.M. Lucta contra os escorpiões. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, p. 5 - 25, 1924.

DINIZ, M.R.V.; PAIVA, A.L.B.; GUERRA-DUARTE, C.; NISHIYAMA JR, M.Y.; MUDADU, M.A. et al. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined

transcriptomic and proteomic approaches. **PLoS ONE**, v. 13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200628>.

DOS SANTOS, M.D.S.; PORTO, T.J.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; BRAZIL, T.K. Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenço, 1997 and notes about males of *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). **ZooKeys**, v. 435, p. 49 - 61, 2014.

DUCKERT, P.; BRUNAK, S.; BLOM, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 17, p. 107 - 112, 2004.

DUZZI, B.; CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A.K.; KODAMA, RT. et al. [des-Arg¹]-Proctolin: A novel NEP-like enzyme inhibitor identified in *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 18 - 24, 2016.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792 -1979, 2004.

FLETCHER, P.L.; FLETCHER, M.D.; WENINGER, K.; ANDERSON, T.E.; MARTIN, B.M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 7405 - 7416, 2010.

FUZITA, F.J.; PINKSE, M.W.H.; PATANÉ, J.P.; JULIANO, M.A.; VERHAERT, P.D.E.M.; LOPES, A.R. Biochemical, transcriptomic and proteomic analyses of digestion in the scorpion *Tityus serrulatus*: Insights into function and evolution of digestion in an ancient arthropod. **PLoS ONE**, v.10, e0123841, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123841>>.

FUKUHARA, Y.D.M.; REIS, M. L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; et al. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, vol. 41, p. 49 - 55, 2003.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**, Ministério da Saúde. 2^a ed., 2001

GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, p. 657 - 668, 1998.

GUERRA, C.M.N.; CARVALHO, L.F.A.; COLOSIMO, E.A.; FREIRE, H.B.M. 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. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 509 - 515, 2008.

GUERRA-DUARTE, C.; HORTA, C.C.R.; OLIVEIRA-MENDES, B.B.R.; MAGALHÃES, B.F. et al. Determination of hyaluronidase activity in *Tityus* spp. Scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms. **Toxicon**, v. 176, p. 134 - 143, 2019.

HANNA, S.L.; SHERMAN, N.E.; KINTER, M.T.; GOLDBERG, J.B. 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, p. 2495 - 2508, 2000.

HOLZER, P.; REICHMANN, F.; FARZI, A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. **Neuropeptides**, v. 46, p. 261 - 274, 2012.

HJELLE, J. T. Anatomy and Morfology. In: POLIS, G.A. **The Biology of Scorpions**. Stanford University Press, 1990.

HUI WEN, F.; MONTEIRO, W. M.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; TAMBOURGI, D.V.; SILVA, I.M. et al. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: Identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003701>>.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, p. 583 - 589, 2021.

KELLEY, L.A.; MEZULIS, S.; YATES, C.M.; WASS, M.N.; STERNBERG, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v.10, p. 845 - 858, 2015.

KOZLOV, S.A.; GRISHIN, E.V. The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors. **Toxicon**, v. 49, p. 721 - 726, 2007.

LAEMMLI, ULRICH K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.

LAUSTSEN, A.H.; SOLÀ, M. JAPPE, E.M. OSCOZ, S.; LAURIDSEN, L.P.; ENGMARK, M. Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. **Toxins**, v. 8, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/toxins8080226>>.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, M. et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W580 - W584, 2015.

LIMA, M.C.J.S.; BITENCOURT, M.A.O.; FURTADO, A.A.; ROCHA, H.O.; OLIVEIRA, R.M. et al. *Ipomoea asarifolia* neutralizes inflammation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 890 - 895, 2014.

LIMA, J.F.; CARVALHO, L.S.; SCHNEIDER, M.C. The first chromosomal analysis of bisexual populations of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones: Buthidae). **The Journal of Arachnology**, v. 48, p. 77 - 83, 2020.

LISBOA, N.S.; BOERE, V. NEVES, F.M. Scorpionism in the far south of Bahia, Brazil, 2010 - 2017: case profile and factors associated with severity. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000200005>>.

LOURENÇO, WILSON R. What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 1 - 12, 2015.

LOURENÇO, WILSON R. Scorpions and life-history strategies: from evolutionary dynamics toward the scorpionism problem. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40409-018-0160-0>>.

MA, B.; ZHANG, K.; HENDRIE, C.; LIANG, C.; LI, M.; DOHERTY-KIRBY, A.; LAJOIE, G. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by MS/MS. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2337 - 2342, 2003.

MACOURS, N.; HENS, K. Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 501 - 510, 2004.

MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M.E.S.; AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 37, p. 1155 - 1164, 1999.

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

MARANGON, M.; SLUYTER, S.C.V.; WATERS, E.J.; MENZ, R.I. Structure of haze forming proteins in white wines, *Vitis vinifera* thaumatin-like proteins. **PLoS One**, v. 9, p. 1 – 21, 2014.

MATTHIESEN, F.A. Parthenogenesis in scorpions. **Evolution**, v. 16, p.255 - 256, 1962.

MC CORMICK, S.J.; POLIS, G.A. Prey, Predators and Parasites. In: POLIS, G.A. **The Biology of Scorpions**. Stanford University Press, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS **Sistema de Informação de Agravos de Notificações**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 24 mar. 2022.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.D.; PAINE, M.J.I.; DENNISON, J.M.T.J. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**, v. 26, p. 2000 - 2005, 1996.

OLIVEIRA-MENDES, B.B.R.; MIRANDA, S.E.M.; SALES-MEDINA, D.F.; MAGALHÃES, B.F.; KALAPOTHAKIS, Y. et al. Inhibition of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase affects venom biodistribution. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, 2019. Disponível em: < doi: 10.1371/journal.pntd.0007048>.

ORTIZ, E.; RENDÓN-ANAYA, M.; REGO, S.C.; SCHAWTZ, E.F.; POSSANI, L.D. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 1738 - 1746, 2014.

PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, p. 1495 - 1504, 2001.

PETRICEVICH, VERA L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 23 - 31, 2002.

PIMENTA, R.J.G.; BRANDÃO-DIAS, P.F.P.; LEAL, H.G.; CARMO, A.O. et al. Selected to survive and kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian yellow scorpion. **PLoS ONE**, v. 14, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214075>>.

POLIS, G.A. **The Biology of Scorpions**. Stanford University Press, 1990.

POLIS, G.A.; SISSOM, W.D. Life History. In: POLIS, G.A. **The Biology of Scorpions**. Stanford University Press, 1990.

PUCCA, M.B.; CERNI, F.A.; PINHEIRO JUNIOR, E.L.; BORDON, K.C.F. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, v.108, p. 272 - 284, 2015.

QU, Y.; ZHAO, G.; LI, H. Forward and reverse signaling mediated by transmembrane tumor necrosis factor- α and TNF receptor 2: Potential roles in an immunosuppressive tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1675, 2017.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; JIMÉNEZ-VARGAS, J.M.; GURROLA, G.B.; VALDIVIA, H.H.; POSSANI, L.D. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328 - 342, 2013.

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

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A.J.; THOMAS, P.D.; HUANG, X. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. D624 - D632, 2018.

REIN, J.O. The Scorpion Files. In: O. BÁNKI, Y. ROSKOV, M. DÖRING, G. OWER, L. VANDEPITTE, D. HOBERN, D. et al. **Catalogue of Life Checklist**, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.48580/dfp3-3f6>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

REIS, M.B.; RODRIGUES, F.L.; LAUTHERBACH, N.; KANASHIRO, A.; SORGI, C.A.; MEIRELLES, A.F.G. et al. Interleukin-1 receptor-induced PGE2 production controls acetylcholine-mediated cardiac dysfunction and mortality during scorpion envenomation. **Nature Communications**, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19232-8>>.

ROKYTA, D.R.; WARD, M.J. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (*Hadrurus spadix*) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity. **Toxicon**, v. 128, p. 23 - 37, 2017.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, p. 157 - 162, 1967.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76 - 85, 1985.

SMITH, T.F.; WATERMAN, M.S. Identification of common molecular subsequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 147, p. 195 - 197, 1981.

SOUZA, C.A.R.; CANDIDO, D.M.; LUCAS, S.M.; BRESCOVIT, A.D. On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). **Zootaxa**, v. 1987, p. 1 - 38, 2009.

SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C.C.; SANT'ANNA, O.A.; MARCELINO, J.R.; TAMBOURGI, D.V. The history of antivenoms development: Beyond Calmette and Vital Brazil. **Toxicon**, v. 150, p. 86 - 95, 2018.

THE UniProt CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D158 - D169, 2017.

TADOKORO, T.; MODAHL, C.M.; MAENAKA, K.; AOKI-SHIOI, N. Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) from venomous snakes: An overview of the functional diversity in a large and underappreciated superfamily. **Toxins**, v. 12, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/12/3/175>>.

TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M. SUN, T. et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 68 - 88, 2012.

VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M.; NAIR, S. NATASSIA, C. et al. AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, p. D389 - D444, 2021.

VENANCIO, E.J.; PORTARO, F.C.V.; KUNIYOSHI, A.K.; CARVALHO, D.C. 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.; DUTRA, A.A.A.; LÉON, I.R.; MELO-BRAGA, M.N. et al. Moving pieces in a venomous puzzle: Unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 3460 - 3470, 2013.

WENDRUFF, A.J.; BABCOCK, L.E.; WIRKNER, C.S.; KLUSSENDORF, J.; MIKULIC, D.G. A Silurian ancestral scorpion with fossilised internal anatomy illustrating a pathway to arachnid terrestrialisation. **Scientific Reports**, v. 10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56010-z>>.

XU, X.; CHEN, J.; ZHANG, L.; LIU, Q. Metal ions- and pH-induced conformational changes of acutolysin A from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. **Biopolymers**, v. 85, p. 81 - 90, 2007.

YAMASHITA, F.O.; TORRES-REGO, M.; GOMES, J.A.S.; FELIX-SILVA, J. PASSOS, J.G.R. et al. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) fruit juice decreases acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* venom: Potential application for auxiliary treatment of scorpion stings. **Toxicon**, v. 179, p. 42 - 52, 2020.

ZOCCAL, K.F.; BITENCOURT, C.S.; SECATTO, A.; SORGI, C.A. et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, p. 1101 - 1108, 2011.

ZOCCAL, K.F.; BITENCOURT, C.S.; PAULA-SILVA, F.W.G.; SORGI, C.A. et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PLoS One**, v. 9, p. 1 - 12, 2014.

ZOCCAL, K.F.; GARDINASSI, L.G.; BORDON, K.C.F.; ARANTES, E.C. et al. EP80317 restrains inflammation and mortality caused by scorpion envenomation in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00171>>.

ZORNETTA, I.; SCORZETO, M.; DOS REIS, P.V.M.; DE LIMA, M.E.; MONTECUCCO, C. et al. Electrophysiological characterization of the antarease metalloprotease from *Tityus serrulatus* venom. **Toxins**, v. 9, p. 1 - 13, 2017.