



Fundação Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul
Programa Multicêntrico De Pós-Graduação Em Bioquímica E
Biologia Molecular

Efeito da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas de sangue periférico humano.

Dissertação de Mestrado

Telma Rodrigues da Silva Benetti

Campo Grande, MS, Brasil,

2022.



Fundação Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul
Programa Multicêntrico De Pós-Graduação Em Bioquímica E Biologia
Molecular

Efeito da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas de sangue periférico humano.

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) como requisito para a obtenção de grau de Mestra em Bioquímica e Biologia Molecular.

Discente: Telma Rodrigues da Silva Benetti

Orientador: Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena

Campo Grande, MS, Brasil,

2022.



Fundação Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul
Instituto de Biociências
Programa Multicêntrico De Pós-Graduação Em Bioquímica E Biologia
Molecular

Efeito da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas de sangue periférico humano.

Telma Rodrigues da Silva Benetti

Banca examinadora

Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena (orientador)

Profa. Dra. Alda Maria Teixeira

Profa. Dra. Andréia Machado Cardoso

Profa. Dra. Carla Santos de Oliveira (Suplente)

Profa. Dra. Maria Rita Marques (Suplente)

Campo Grande, 31 de março de 2022.

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de estudos como muita dedicação, superação e muita resiliência, num cenário nunca visto anteriormente, devido a pandemia de Covid-19 que assola a humanidade, agradeço primeiramente a Deus por me guiar até esse momento tão especial, a titulação de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela UFMS.

A gratidão pelo meu orientador, o prof. Dr. Malson Lucena é imensurável, pois este me acolheu quando pensei em desistir, segurou na minha mão e fez sentido à minha caminhada acadêmica, agradeço por sua orientação, suas dicas, paciência e educação com que trata os discentes e seus orientandos, pela parceria e acima de tudo pelo excelente profissional e pessoa humana de grande admiração que representa, ademais, sou grata por nossos caminhos terem se encontrado.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), ao Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) e à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) por tornar esse projeto exequível. Aos docentes que oportunizaram o aprendizado significativo e que com certeza esses ensinamentos não serão em vão e levarei para minha vida acadêmica e profissional com muita estima, em especial à prof.^a Dr.^a Alda Maria Teixeira, por sua gentileza e delicadeza com que transmite seus ensinamentos, à prof.^a Dr.^a Andréia Machado Cardoso, por suas orientações quanto ao sistema purinérgico, à prof.^a Dr.^a Carla Santos de Oliveira e à prof.^a Dr.^a Maria Rita Marques.

Ao prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, por sua coorientação quanto ao sistema purinérgico, aos protocolos de coleta e separação de plaquetas e linfócitos de sangue periférico humano e às atividades de ATPases nessas amostras.

Aos meus colegas Henrique Covali, Mila Fernandes, Igor Leal, Romário Portilho e Laís Corrêa que tive a oportunidade e prazer de conhecê-los e compartilhar experiências, anseios, dúvidas e além de tudo, conhecimento, cada um teve uma parcela de contribuição para ter chegado até aqui, Henrique pela

sua ajuda e amizade, com idade quase de ser meu filho, no entanto me acolheu e me guiou quando não sabia pra onde ir; Mila por sua ajuda na coleta de escorpiões; Igor por compartilhar seus conhecimentos sobre as ATPases, Romário por colaborar na coleta de sangue periférico dos participantes da pesquisa; Laís por me ajudar nos experimentos.

Ademais não poderia deixar de mencionar minha família, que me alicerça. Meu esposo Waldir Benetti, que me apoiou quando resolvi retomar meus estudos e ingressar no mestrado depois de dez anos de formada, sempre me incentivando e confiando na minha pessoa. Agradeço também aos meus filhos Lucas, Vinícius e Enthony Rodrigues por serem a razão de todas as minhas conquistas, por entenderem, mesmo na minha ausência física, que estava fazendo algo importante que faria diferença em nossas vidas. Aos meus pais Antônia Maria e Juarez Pereira, fontes de inspiração, que mesmo sem instrução de nível superior, sempre mostraram o quão importante é a educação escolar e a educação familiar. Aos meus irmãos Rosana, Róbert e Cleiton Rodrigues que sempre apoiaram na minha trajetória e acreditaram que conseguiria ir sempre além.

Efeito da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas de sangue periférico humano.

Benetti, T.R.S

Resumo

O sistema purinérgico é um sistema de sinalização, no qual os nucleotídeos de purina, ATP (Adenosina 5'-trifosfato) e ADP (Adenosina difosfato), e o nucleosídeo, adenosina, atuam como mensageiros extracelulares. CD39 (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, E-NTPDase1) converte ATP em ADP e ADP em AMP, e então CD73 (ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) desfosforila AMP em adenosina. CD39 e CD73 regulam a função de vários tipos de células imunológicas, incluindo linfócitos. Além disso, há evidências de que alterações na expressão e atividade de CD39 afetam o potencial trombogênico dos tecidos. O objetivo deste estudo foi quantificar a atividade enzimática da CD39 e CD73 na presença de peçonha de escorpiões *Tityus confluens* (*Tc*) e *Tityus paraguayensis* (*Tp*), em amostras de linfócitos e plaquetas humanos. Nossos resultados demonstram que a peçonha de *T.c* tem efeito supressor sobre atividade da CD39 na hidrólise de ATP em linfócitos do sangue periférico quando comparados ao controle ($P < 0,05$). Por outro lado nossos resultados demonstram não haver efeito sobre as enzimas CD39 e CD73 em plaquetas do sangue periférico. Este estudo traz pela primeira vez o efeito da peçonha de escorpiões *Tityus* sobre as enzimas CD39 e CD73 em células do sangue periférico. Futuros estudos, com maiores doses, poderão elucidar a via de ação principal das peçonhas quando em contato com o sangue.

Palavras chave: CD39, CD73, Purinas, escorpião, *Tityus*

Effect of Tityus scorpion venom on the activity of purinergic system in human peripheral blood lymphocytes and platelets

Benetti, T.R.S

Abstract

The purinergic system is a signalling system, where the purine nucleotides, ATP (Adenosine 5'-triphosphate) and ADP (Adenosine diphosphate), and the nucleoside, adenosine, act as extracellular messengers. CD39 (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1) converts ATP or ADP into AMP, and then CD73 (ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) dephosphorylates AMP into adenosine. CD39 and CD73 regulate the function of several immune cell types, including lymphocytes. Furthermore, there is evidence that changes in CD39 expression and activity affects the potential thrombogenic of a tissue. The objective of this study was to assay the enzymatic activity of CD39 and CD73 in the presence of scorpion venom from *Tityus confluens* (Tc) and *Tityus paraguayensis* (Tp) in human lymphocyte and platelet. Our results demonstrate that T.c venom has decreased CD39 activity in ATP hydrolysis in peripheral blood lymphocytes when compared to control ($P < 0.05$). On the other hand, the results demonstrate no effect on CD39 and CD73 enzymes in peripheral blood platelets. This study shows the first time the effect of *Tityus* scorpion venom on CD39 and CD73 enzymes in peripheral blood cells. Others studies, with higher doses, can elucidate the main action pathway between venoms and the blood.

Key words: CD39, CD73, Purine, Scorpion, *Tityus*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura1. Espécimes de *Tityus confluens* (a) e *Tityus paraguayensis* (b).

Figura2. Componentes gerais da sinalização purinérgica

Figura3. Efeito da peçonha de *Tc* e *Tp* sobre hidrólise de ATP e ADP em linfócitos do sangue periférico humano.

Figura 4. Efeito da peçonha de *Tc* e *Tp* sobre hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas do sangue periférico humano.

Tabela 1. Atividade enzimática da CD39 sobre a hidrólise de ATP e ADP em linfócitos do sangue periférico humano.

Tabela 2. Atividade enzimática da CD39 e CD 73 sobre a hidrólise de ATP e ADP em plaquetas do sangue periférico humano.

ABREVIATURAS

ADP (Adenosina difosfato)

AMP (Adenosina monofosfato)

APs (fosfatases alcalinas)

AR (receptores de adenosina)

ATP (Adenosina 5'-trifosfato)

CD (células dendríticas)

CD39 (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, E-NTPDase1)

CD73 (ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase)

DAMPs (padrões moleculares associados a danos)

DPBs (peptídeos com ponte de dissulfeto)

DPP-IV (dipeptidil peptidase IV)

E-5'-NT (ecto-5'-nucleotidases)

E-ADA ou ADA (ecto-adenosina desaminase)

EDTA (thylenediamine tetraacetic acid)

E-NTPDase, CD39 (hidrolizados por ectonucleotidases)

ENTPDs (ectonucleotidases)

ENTs (transportadores de nucleosídeos)

FMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina)

GPCR (receptores acoplados a proteína G)

GPI (âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol)

HUVECs (células endoteliais da veia umbilical humana)

NDPBs (peptídeos sem ponte de dissulfeto)

NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases)

NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases)

NTPe (nucleotídeos extracelulares)

P2X 1-7R (receptores purinérgicos do tipo canais iônicos)

P2XRs (receptores ionotrópicos)

P2YRs (receptores acoplados à proteína G, metabotrópicos)

PAM (peptídeos antimicrobianos)

PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos)

PMBC (células mononucleares do sangue periférico ricas em linfócitos)

PRP (plasma rico em plaquetas)

TCA (Ácido tricloro acético)

Tc (*Tityus confluens*)

Tp (*Tityus serrulatus*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Escorpiões: classificação e distribuição.....	03
2.2. O gênero <i>Tityus</i> e peçonhas: características dos envenenamentos e composição.....	05
2.3. O sistema purinérgico.....	08
2.4. Peçonhas e o sistema purinérgico.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo Geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Aspectos éticos.....	15
4.2. Participantes da pesquisa.....	15
4.3. Coleta e processamento do material biológico humano ..	16
4.4. Separação da fração de células mononucleadas ricas em linfócitos e do plasma rico em plaquetas	17
4.5. Coleta de escorpiões	17
4.6. Extração de peçonha	18
4.7. Dosagem de proteínas.....	18
4.8. Atividades enzimática da CD39 e CD73.....	18
4.8.1 Grupos experimentais.....	18
4.8.2 Meios de reação	19
4.9. Análises estatísticas.....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Efeito da peçonha de <i>Tc</i> e <i>Tp</i> sobre a atividade enzimática de CD39 em linfócitos de sangue periférico humano	20
5.2. Efeito da peçonha de <i>Tc</i> e <i>Tp</i> sobre a atividade enzimática de CD39 e CD73 em plaquetas de sangue periférico humano	21
6. DISCUSSÃO	22

7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

Anexo: Parecer do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos...	33
--	----

1.INTRODUÇÃO

A peçonha de escorpiões consiste em um sistema complexo de proteínas, enzimas, toxinas e outras moléculas com propriedades biológicas, tais como: mucopolissacarídeos, hialuronidase, fosfolipase, serotonina, histamina, inibidores enzimáticos e etc(GWEE et al., 2002; ORTIZ et al., 2014). Em contato com o corpo humano, esses agentes químicos interagem com receptores da membrana plasmática que iniciam cascatas com mediadores inflamatórios (PETRICEVICH, V. L. 2010).

Atualmente os estudos envolvendo peçonhas relatam descobertas de importância para a saúde pública, entre as atividades descritas estão: antimicrobiana, anticâncer, hemolítica e anti-inflamatória (ALMAAYTAH E ALBALAS, 2013). A peçonha do escorpião possui interesse farmacológico e esses achados se traduzem em abordagens terapêuticas para diferentes patologias (OLIVEIRA ET AL., 2019).

O sistema purinérgico consiste em uma via de biossinalização entre as células. A via purinérgica regula a resposta imune, mecanismos de inflamação, agregação de plaquetas proliferação e morte celular (JOHNSTON-COX et al.; 2010). Neste sistema se destacam as enzimas CD39, CD73 e a ecto-adenosina desaminase (ADA). Essas enzimas hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares como ATP, ADP AMP, Adenosina e Inosina (ZIMMERMANN, H. 2000; 2012).

A relação entre os componentes da peçonha de animais e o sistema purinérgico já foi estabelecida anteriormente (DHANANJAYA ; D'SOUZA2011; 2016). Na peçonha de serpentes, aranhas e escorpiões foi identificado a presença de purinas. Esses componentes atuam potencializando o efeito das enzimas presentes nas peçonhas, auxiliam na difusão de toxinas e aumentam a permeabilidade vascular (DHANANJAYA ; D'SOUZA,2011).

No entanto a compreensão dos alvos moleculares desses componentes da peçonha, assim como sobre o efeito na atividade de enzimas do sistema purinérgico, é um conhecimento em construção. Desta forma, o estudo do efeito da peçonha de escorpiões na atividade de enzimas do sistema purinérgico é uma

forma de estabelecer alvos terapêuticos e compreender o efeito das toxinas nas propriedades catalíticas das ecto-nucleotidases bem como entender como ocorre o envenenamento e contribuir para a assistência médica adequada. Portanto, este trabalho avaliou o efeito da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* sobre as atividades ATP, ADP e AMPásica em linfócitos e plaquetas de sangue periférico humanos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Escorpiões: classificação e distribuição

Os escorpiões são artrópodes, membros da classe Arachnida, possuem quelíceras e podem ser considerados “fósseis vivos”, pois são classificados entre os mais ancestrais, levando em consideração tanto sua origem evolutiva, como morfologia e organização corporal. O sucesso evolutivo deste grupo data de mais de 450 milhões de anos, e deve-se principalmente aos seus aspectos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (LOURENÇO, 2015). Outro aspecto que reforça o argumento do êxito evolutivo se dá quando verificamos a ampla distribuição geográfica, com exceção apenas da Antártida. Não obstante, nas últimas décadas esses animais vêm perdendo seu habitat natural, e conquistando novos espaços no ambiente urbano (SILVA, 2012).

Atualmente, os escorpiões representam um grupo menos representativo, cerca de 2000 espécies, se comparado aos de outros artrópodes como os insetos que têm mais de um milhão de espécies e as aranhas com cerca de 40.000 espécies (LOURENÇO, 2015). O interesse pelos escorpiões se deve principalmente por sua reputação negativa de “assassino de homem”, mas quando se observa a quantidade de espécies que causam acidentes ao homem, não existem mais que 50 espécies de importância médica. A maioria das espécies que provocam acidentes em humanos pertencem à família *Buthidae* (LOURENÇO, 2015), que inclui escorpiões do gênero *Leiurus* no Oriente Médio, *Androctonus* e *Buthus* no norte da África, *Tityus* na América do Sul, *Centruroides* na América do Norte e Central, *Mesobuthus* na Ásia (especialmente na Índia) e *Parabuthus* na África do Sul (ISBISTER E BAWASKAR, 2014); verifica-se espécies que representam perigo ao homem em pelo menos duas outras famílias, *Hemiscorpiidae* e *Scorpionidae* (LOURENÇO, 2015).

Aproximadamente 131 espécies são registradas no Brasil e o gênero *Tityus* C.L. (KOCH, 1836) apresenta maior riqueza de espécies (aproximadamente 80), estando presente em todos os biomas do país (PORTO et al., 2010; YAMAZAKI et al.; 2015). Distribuído no Brasil (Mato Grosso do Sul), Argentina e Paraguai, *Tityus paraguayensis* é encontrado principalmente em

biomas com formações vegetacionais abertas como o Cerrado e Chaco. Recentemente, foi registrada a primeira ocorrência de *T. paraguayensis* (T.p) (Figura 1a) durante o período de cheia no Pantanal de Mato Grosso do Sul, evidenciando uma possível estratégia de sobrevivência da espécie durante as inundações sazonais nessa região (YAMAZAKI ET AL.; 2015).

Outra espécie amplamente distribuída na América Latina, e com casos fatais de envenenamentos na Argentina, é *Tityus confluens* (T.c) (Fig 1.a) (DE ROODT, et al., 2009). Este escorpião já foi descrito no Mato Grosso do Sul, Caatinga, Bolívia e na Argentina. Escorpião de tamanho médio, 52-53 mm de comprimento. Sua coloração é amarelada, com a carapaça e tergitos marrom enegrecido. Sua coloração é muito similar o escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*), porém sua calda não apresenta serrilha e há um espinho sob o ferrão (Figura 1b; WILSON, et al., 2004).

a)



b)



Figura1. Espécimes de *Tityus confluens* (a) e *Tityus paraguayensis* (b). (Fonte: BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009; LUCENA, M. N. et al., 2021)

2.2. O gênero *Tityus* e peçonhas: características dos envenenamentos e composição

A incidência global estimada com dados dos órgãos de saúde é, de cerca de 1,5 milhão de envenenamentos com aproximadamente 2.600 mortes por ano. Nos países com gestão apropriada, as mortes estão diminuindo, consequência de melhor alocação dos recursos, treinamento apropriado do pessoal da saúde e implementação de estratégias de gestão de acidentes (CHIPPAUX, 2012). O tratamento sintomático e sua acessibilidade também deve ser considerado como uma alternativa aceitável de tratamento emergente para as picadas de escorpião em detrimento à imunoterapia passiva.

No Brasil, três espécies se destacam quanto à importância médica: *Tityus serrulatus* (T.s), *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus*, sendo o maior número de acidentes graves e letais provocados por *T. serrulatus*. Entre 2000 a 2018, o número de acidentes com escorpiões teve um aumento, sendo registrados mais de 1,1 milhão de casos de envenenamento com escorpiões no Brasil, sendo quase 157 mil somente em 2018, nesse intervalo foram 1261 óbitos, 94 em 2018, tendo um leve aumento em relação ao ano anterior que registrou 82 óbitos e, a região nordeste do país é a mais afetada (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN, 2019).

O aumento generalizado das espécies desse gênero deve-se principalmente à perda de habitat que esses aracnídeos vêm enfrentando, sendo a ação do homem a causa mais evidente, fato que fez esses acidentes superarem os com serpentes nesse período (SILVA, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN, 2019). Um estudo realizado no Rio Grande do Norte constatou que condições climáticas favoráveis para a reprodução do escorpião, além de maior densidade populacional e crescimento desordenado nas áreas urbanas contribuem para aumentar o número de casos no Nordeste do Brasil (ARAÚJO et al., 2017).

Vários fatores podem contribuir para a fatalidade das vítimas: incapacidade de reconhecer precocemente a gravidade e atraso na condução das vítimas para unidades de saúde específicas, hospitais em áreas endêmicas com condições inadequadas e falta de UTI. Estudos apontam também que a avaliação da gravidade do envenenamento, principalmente em crianças, é essencial para estabelecer prognóstico e instituir tratamentos adequados, além disso, o estado de saúde da vítima, bem como sua idade e massa corporal são fatores que podem afetar a gravidade de acidentes com escorpiões (BAHLOUL et al., 2010).

O tratamento pode ser feito com o uso de anti-inflamatórios e em casos graves é recomendado o uso de soro antiescorpiônico. Em crianças de até sete anos, onde se encontra um grupo de risco maior, em casos moderados também se aplica o soro (CUPO et al., 2003).

Dada a sua importância epidemiológica, a grande maioria do conhecimento sobre a composição da peçonha de escorpião vem das espécies da família Buthidae (CHIPPAUX E GOYFFON, 2008). Muitas toxinas foram

identificadas em peçonhas de escorpião, sendo os canais iônicos encontrados em mamíferos e insetos, o principal alvo dessas toxinas. A toxina liga-se aos canais de sódio, inativando-o e resultando na despolarização prolongada e, portanto, na excitação neuronal. Existem outras toxinas que podem atuar sobre os canais de potássio e cálcio, mas os efeitos no envenenamento humano são pouco compreendidos (ISBISTER E BAWASKAR, 2014).

As peçonhas de escorpião são misturas altamente complexas de peptídeos, nucleotídeos, lipídios, mucoproteínas, aminas biogênicas, algumas enzimas e outras substâncias. Esse complexo de moléculas bioativas parece ter evoluído principalmente para subjugar as presas e desempenhar um papel eficaz na defesa química (ORTIZ et al., 2014). Os peptídeos da peçonha geralmente são classificados em dois grupos principais: os peptídeos com ponte de dissulfeto (DPBs) que normalmente têm como alvo canais iônicos e os peptídeos sem ponte de dissulfeto (NDPBs). Estes últimos apresentam interesse médico e farmacológico devido a algumas propriedades biológicas como antimicrobianas, anticâncer, hemolítica, anti-inflamatória, atividade de potencialização imunomoduladora e bradiginina (ALMAAYTAH E ALBALAS, 2013).

Vários estudos foram feitos com base nas propriedades terapêuticas dos NDPBs. A peçonha bruta de *Tityus discrepans* e frações inibiram o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* sp, levando a morte do parasita (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2017). Foram isolados das glândulas de peçonha do escorpião *Mesobuthus eupeus* dois peptídeos catiônicos lineares, meucina-24 e meucina-25, com propriedades antimaláricas, sendo que ambos inibiram o desenvolvimento de *Plasmodium berghei* e mataram parasitas intraeritrócitos de *P. falciparum* e não apresentaram toxicidade para as células não infectadas (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2017). Os peptídeos NDPBs também têm funções antivirais. O primeiro relato de peptídeo antiviral produzido a partir de peçonha de escorpiões foi o Hp1090, descoberto em uma biblioteca de cDNA da glândula do escorpião *Heterometrus petersii*, que inibiu a infecção pelo vírus da hepatite C (ORTIZ et al.; 2014).

A descoberta de novos peptídeos antimicrobianos (PAMs) de fontes naturais é de grande importância para a saúde pública, uma vez que essas moléculas são candidatas farmacológicas devido à sua eficácia e baixas taxas de resistência (OLIVEIRA et al.; 2019). Os PAMs já foram caracterizados na

hemolinfa de diferentes animais, como acantossucrinas e gomesina, da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (DA SILVA et al., 2000); rondonina, da aranha *Acanthoscurria rondoniae*; lacraia da “centopeia” *Scolopendra viridicornis* (CHAPARRO; DA SILVA., 2016) e um fragmento de um peptídeo fibrinogênio humano encontrado na hemolinfa de *Triatoma infestans* (DINIZ et al., 2018). Existem poucos estudos que descrevem o funcionamento do sistema imunológico ou caracterizam PAMs do plasma e hemócitos de escorpiões (OLIVEIRA et al., 2019). Uma defensina denominada CII-dlp (peptídeo semelhante à defensina de *C. limpiduslimpidus*) foi identificada no escorpião *Centruroides limpidus limpidus*, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DE LA VEGA et al., 2004). Todas essas moléculas estão envolvidas na proteção dessas espécies e mostram como a descoberta e caracterização de peptídeos bioativos é muito importante e tem uma ampla aplicabilidade, por exemplo, seletividade para células cancerígenas, com efeitos na proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2019). Recentemente, um AMP de *T. serrulatus* foi isolado, caracterizado e denominado serrulina, apresentando uma estrutura primária semelhante aos PAMs ricos em glicina descritos para outros aracnídeos, como carrapatos e aranhas, além de apresentar atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OLIVEIRA et al., 2019).

2.3. O sistema purinérgico

O sistema purinérgico (Figura 2) compreende uma via comum de sinalização célula-célula envolvida em muitos mecanismos como na resposta imune, dor, inflamação, agregação plaquetária, vasodilatação, proliferação e morte celular. Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem atuar como sinais moleculares ao serem hidrolisados por CD39, CD73 e a ecto-adenosina desaminase (ADA) (ZIMMERMANN, H. 2000; 2012).

A adenosina 5'-trifosfato (ATP) celular atua como transportador de energia que impulsiona praticamente todas as funções celulares (JUNGER, 2011). Por outro lado, o ATP tem um papel completamente diferente no meio extracelular, onde tem como função a sinalização através da ativação de receptores de nucleotídeos (IDZKO et al., 2014). A adenosina é um nucleosídeo formado pela junção da adenina com uma ribose. Este é um metabólico

regulador, é gerado em resposta a uma inflamação, hipóxia ou lesão celular e desencadeia vários eventos de sinalização, sendo também um importante mediador da inibição da ativação plaquetária (JOHNSTON-COX et al., 2010).

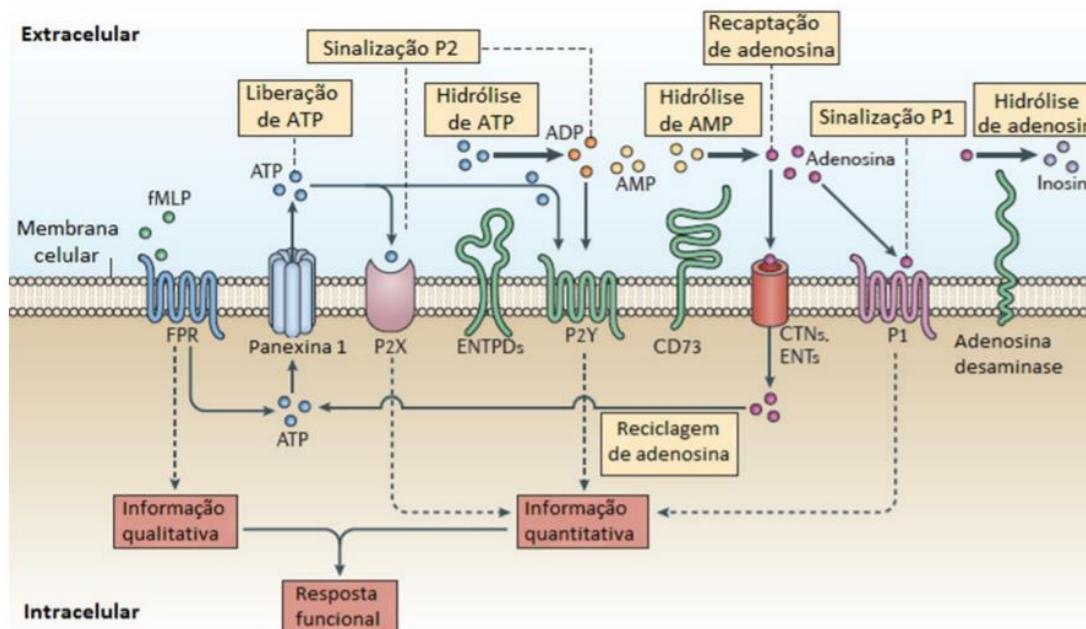


Figura 2. Componentes gerais da sinalização purinérgica. Neste esquema é possível identificar a estimulação do receptor N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), que leva a abertura de canais panexina 1 e consequente liberação de ATP (esfera em azul) e ativação autócrina de receptores P2x. No espaço extracelular as ectonucleotidases ENTPDs hidrolisam ATP à adenosina. A adenosina (esfera roxa) é ainda convertida a inosina e recaptada por transportadores de nucleosídeos (ENTs). JUNGER (2011).

A ecto-adenosina desaminase (ADA) é uma enzima que participa do metabolismo das purinas e está relacionada à proliferação dos linfócitos, estando presente virtualmente em todo organismo humano onde, principalmente, é encontrada em altos níveis em órgãos linfoides, tais como baço, timo e linfonodos. A ADA é uma enzima polimórfica, sua ação regula as concentrações intra e extracelular de adenosina por catalisar a conversão de adenosina em inosina (SILVA et al., 2016). Independentemente de sua função catalítica, a ADA tem sido detectada na superfície de células hematopoiéticas e possui uma função estimulatória de proliferação em linfócitos durante a resposta imunológica. Existem dois tipos de proteínas que ancoram a ADA na superfície

celular: a CD26 e os receptores de adenosina (AR). A primeira também conhecida como dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), é uma glicoproteína transmembrana tipo II homodimérica de 110 KDa que, funcionalmente, atua como um receptor para ADA, sendo expressa em células epiteliais, diversos tipos de células endoteliais, fibroblastos e células linfoides e está envolvida em várias patologias (FRANCO et al., 1997; MORENO et al., 2018). Os ARs são receptores da família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) e existem quatro tipos: A1, A2A, A2B e A3, os quais são encontrados em diferentes sistemas, como o sistema imune (BOREA et al., 2018).

As ectoenzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares são chamadas de ectonucleotidases. As ectonucleotidases que degradam o ATP em adenosina são divididas em 4 famílias: as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases); as ectonucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (NPPs); as fosfatases alcalinas (APs); e as ecto-5'-nucleotidases (E-5'-NT). Estas estão envolvidas na degradação de ATP em ADP, AMP e adenosina (BURNSTOCK, 2006; 2014). A cascata de ectonucleotidases, iniciada por NTPDases, é terminada pela CD39 com a hidrólise de AMP e formação de adenosina. Desta forma, as enzimas CD39 e a ADA, são ectoenzimas que convertem adenosina em inosina, regulam as concentrações de adenosina no plasma e no meio extracelular (ROBSON et al., 2006).

As CD39 (ecto-nucleotidases, ENTPDases ou apirases) são enzimas dependentes de cátions divalentes, capazes de hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados em nucleosídeos monofosfatados. (SANSOM et al., 2007; ZIMMERMANN, 2000). Entre as funções das NTPDases estão a regulação da concentração de nucleotídeos extracelulares (NTPe) participando na sinalização purinérgica, adesão celular, reciclagem de purinas, regulação da homeostase vascular além de atuar como receptor em diversas células (ZIMMERMANN et al., 2012).

A CD73 é um homodímero ligado à membrana plasmática através de uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo responsável pela desfosforilação de ribo e desoxirribonucleosídeos 5'-monofosfatados a seus correspondentes nucleosídeos (BAVARESCO, 2008). Dentre suas funções não relacionadas à sua atividade enzimática, destacam-se seu envolvimento na

interação célula-célula e célula matriz celular, em eventos de migração celular, assim como nos mecanismos que induzem a resistência a drogas, envolvimento na motilidade celular, proliferação e ativação de linfócitos e na adesão destes no endotélio, aumento da migração, adesão e invasão de tumores de mama devido a sua superexpressão, dentre outras (BAVARESCO, 2008; ALGARS, et al., 2011; EBERHARDT et al., 2022).

Os receptores purinérgicos são referidos como receptores P1 que são ativados somente pelo metabólito adenosina, em contraste com os receptores P2 que são ativados por ATP e / ou outros nucleotídeos (por exemplo, UTP). Com base no tipo de sinalização, os receptores P2 podem ser subdivididos em P2Y e P2X. Os receptores acoplados à proteína G, metabotrópicos (P2YRs), caracterizados por oito tipos em mamíferos (P2Y1/2/4/6/11/12/13/14R) e receptores ionotrópicos (P2XRs), que são canais de íons dependentes de ligantes do tipo nucleotídeos e, atualmente foram identificados sete tipos (P2X 1-7R). O término da sinalização dos receptores P2 envolve a conversão de ATP/ADP em adenosina dentro do compartimento extracelular pela atividade das ectonucleotidases (IDZKO et al., 2014).

Alguns trabalhos têm revelado que mecanismos purinérgicos regulam aspectos-chave de diversos processos fisiológicos, incluindo a ativação dos diferentes tipos de células do sistema imunológico. A ativação das células T induz a liberação de ATP através dos canais de panexina, que translocam os receptores P2X à sinapse imune, onde eles produzem influxo de cálcio e ativação celular através de sinalização purinérgica autócrina. Receptores purinérgicos permitem que as células do sistema imune reconheçam se o ATP que é liberado provém de células hospedeiras com danos. A sinalização purinérgica também é crucial para a ativação da inflamação somada a subsequente libertação de citocinas, tal como interleucina-1 β (IL-1 β), em resposta a padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (JUNGER, 2011). Em células dendríticas (CD), a exposição ao ATP extracelular induz migração e diferenciação para impulsionar respostas da imunidade celular. A adenosina também é reconhecida como um agente bioativo nos estados inflamatórios vasculares, com efeitos mediados em células vasculares e leucócitos (DWYER et al., 2007).

Outras células que também participam do processo inflamatório são as plaquetas, que atuam principalmente na imunidade inata. As plaquetas são células altamente especializadas, que possuem funções como: adesão, agregação, formação do “tampão” hemostático. Internamente, as plaquetas possuem grânulos de estocagem, esses grânulos densos possuem moléculas de (ATP e ADP) no seu interior. Após uma injúria tecidual, ou um processo de inflamação, as plaquetas liberam esses nucleotídeos e aumentam a adesão e a agregação plaquetária (DE QUEIROZ, et al 2017). Para isso, essas células se comunicam rapidamente com as outras células do sistema imunológico pelo seu potencial de liberação de mediadores inflamatórios, tal como o fator de transcrição PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) (SEMPLE et al., 2011).

O sistema purinérgico também está relacionado à função plaquetária. Estudos constataram que o ADP é um ativador da agregação de plaquetas humanas, interagindo com receptores P2Y das plaquetas e que mediante estimulação, as plaquetas secretam ATP, que é quebrado em ADP (BURNSTOCK, 2015). O exame da atividade da CD73 na superfície das células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) confirmou a contribuição da CD73 para o efeito inibitório de HUVECs na agregação plaquetária (KAWASHIMA et al., 2000). A função plaquetária pode ser comprometida pela proteína de membrana NTPDase-1(CD39), que tem a função na superfície endotelial de diminuir a ativação e o recrutamento de plaquetas, metabolizando o ADP liberado pelas plaquetas estimuladas (PULTE et al., 2007). O potencial para aplicação de receptores de adenosina para o desenvolvimento de terapias antiplaquetárias, uma vez que a rápida ativação das plaquetas nos locais de lesão vascular identifica-os como alvos potenciais para manter a hemostasia, particularmente no caso de formação de trombo arterial, evidenciam a interação do sistema purinérgico e a função plaquetária (JOHNSTON-COX et al.; 2010).

2.4. Peçonhas e sistema purinérgico

Nucleosídeos de purinas foram identificados em peçonhas de serpentes há mais de 50 anos, e sugeriu-se que a adenosina poderia contribuir para a hipotensão provocada por essas peçonhas. Posteriormente, foi relatada a

presença de outras purinas (guanosina, iosina, etc.) na peçonha de vários animais, inclusive dos escorpiões (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2011). Um estudo sobre a composição da peçonha de várias serpentes, revelou que purinas livres compreendiam até 8,7% dos componentes sólidos dessas peçonhas. Compreendeu-se também que esses nucleosídeos tinham um significado funcional nos envenenamentos, uma vez que liberados no tecido endógeno (presa) atuam como uma estratégia complementar aos efeitos das enzimas da peçonha. Quando entram em contato com a membrana celular, as purinas da peçonha atuam através de receptores purinérgicos assim como toxinas multifuncionais e contribuem para a imobilização de presas por hipotensão, paralisia e digestão (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2016). A adenosina pode atuar como um potente agente de espalhamento, auxiliando na difusão de toxinas, uma vez que induz o aumento da permeabilidade vascular através da vasodilatação e a inibição da segregação plaquetária (DHANANJAY; D'SOUZA, 2011).

SANTORO et al, (2009) descreveram o isolamento e caracterização de uma enzima pirofosfatase/fosfodiesterase solúvel presente na peçonha da jararaca, *Bothrops jararaca*, que hidrolisa principalmente nucleosídeo 5' trifosfato e é um potente inibidor de agregação de plaquetas. Pesquisas com miotoxinas de *Bothrops sp.* revelam que a liberação de ATP das células musculares está intimamente relacionada aos danos celulares e, esse efeito pode ser reduzido pela administração de medicamentos antipurinérgicos (CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2010). Estudos sugerem que as concentrações de purinas encontradas em algumas das peçonhas são suficientes para promover efeitos sistêmicos como vasodilatação (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2016). Pouco se sabe sobre os efeitos do sistema purinérgico em relação à peçonha de escorpião, mas acredita-se que por possuírem muitos componentes moleculares semelhantes aos das serpentes, será possível a compreensão do mecanismo purinérgico no envenenamento escorpiônico. Recentemente, foi verificado que a toxina BmK I, o principal peptídeo da peçonha do escorpião *Buthus martensi* e ativador de canal de Na⁺, induz o desenvolvimento da dor (JI et al., 1996). A supra regulação de P2X7Rs medeia a ativação microglial no corno dorsal espinhal, e, portanto, contribui para o desenvolvimento da dor induzida por BmK I (ZHOU et al., 2019). Além disso,

a colocalização dos receptores com a interleucina 1 β demonstra a participação de BmK I na resposta inflamatória.

A peçonha de escorpiões possui mediadores moleculares que afetam os processos inflamatórios e podem ser liberados após o ataque escorpiônico, por exemplo: cininas, ecosanóides, fator ativador de plaquetas, fator de aumento da permeabilidade, óxido nítrico e citocinas. A interação da peçonha com as células e proteínas da membrana causa uma série de reações que levam à lesão e morte celular. Após a injeção de peçonhas, uma variedade de citocinas pró-inflamatórias são liberadas com citocinas contrarreguladoras ou anti-inflamatórias, a razão entre essas citocinas determina o efeito sobre a resposta inflamatória (PETRICEVICH, V. L. 2010).

Após a inoculação da peçonha de *Tytus serrulatus* foi observado a liberação de os interleucias (IL-1 α e β , IL-6, IL-8, IL-10), interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), o envenenamento causou aumento da inflamação renal, cardíaca e pulmonar, caracterizada pelo aumento da quantidade de células mononucleares após injeção em ratos (PETRICEVICH, V. L. 2010).

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral

Verificar o efeito da peçonha dos escorpiões *T. confluens* e *T. paraguayensis* sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos humanos.

3.2. Objetivos específicos

- Obter linfócitos e plaquetas de sangue humanos.
- Quantificar a atividade das enzimas CD39 e CD73 em linfócitos e plaquetas do sangue periférico.
- Determinar o efeito da peçonha dos escorpiões sobre a hidrólise do ATP, ADP e AMP em plaquetas e linfócitos.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS sob o parecer de número: 4.588.216 (Anexo 1). Foi elaborado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi entregue aos participantes no primeiro contato com a pesquisadora, para que os mesmos conhecessem os objetivos do estudo e decidissem quanto sua participação. No TCLE, foi solicitada ao participante sua autorização para coleta de sangue venoso periférico, sendo que para assegurar a confidencialidade e a privacidade, a pesquisadora garantiu que os nomes e identidades serão mantidos em sigilo. Os participantes da pesquisa que assinaram o TCLE, ficaram com uma via do TCLE, assim como a pesquisadora responsável. Os dados da pesquisa estão mantidos em arquivo confidencial, físico e digital, sob guarda da

pesquisadora e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Houve risco mínimo para a saúde física, mental, emocional, haja visto que toda e qualquer ação pode gerar riscos, como constrangimento no momento da coleta sanguínea, desconforto com o procedimento (como mancha roxa ou dor leve no local da coleta) e ansiedade. No entanto, para prevenir qualquer desconforto e constrangimento, a coleta foi realizada por um profissional da saúde, devidamente habilitado, com o cuidado necessário para preservar o participante. Caso alguma das situações citadas ocorra, a pesquisadora garantiu que o profissional (membro da equipe desta pesquisa) prestaria o atendimento e suporte imediato.

4.2. Participantes da pesquisa

Participaram dessa pesquisa de forma voluntária 9 participantes. Os critérios de inclusão compreenderam: Homens ou mulheres adultas maiores de 18 anos, não portadores de doenças crônicas, processo infeccioso ou inflamatório agudo em curso no momento da coleta sanguínea, todos vinculados ao InBio/UFMS.

4.3. Coleta e processamento do material biológico humano

O material biológico (sangue venoso periférico), aproximadamente 10mL, foi coletado em um espaço reservado (sala pertencente ao Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio na UFMS) para garantir maior privacidade ao participante. Nesta sala, estavam disponíveis todos os materiais necessários para realização da coleta e descarte adequado de perfurocortantes, de acordo com as normas de biossegurança (RESOLUÇÃO RDC Nº 512, DE 27 DE MAIO DE 2021).

Para o procedimento de coleta de sangue, não foi necessário estar em jejum ou passar por algum tipo especial de preparação. Foram utilizados os seguintes materiais para o procedimento: seringa descartável de 20mL; álcool 70%; agulha descartável 25x7mm; luvas de procedimento; tubos de coleta EDTA

e citrato (aproximadamente 5 mL foram transferidos para tubos contendo EDTA e 5 mL para tubos contendo citrato); garrote; e algodão.

O ambiente foi preparado e houve um treinamento com instrução acerca dos materiais a serem utilizados. Logo após, foi solicitado ao participante que se sentasse e apoiasse o braço sobre a mesa, de modo a mantê-lo confortável e facilitar a visualização das veias. Em seguida, um profissional da saúde (Romário da Silva Portilho) calçou as luvas, palpou e selecionou a veia a ser puncionada no antebraço, prendeu o garrote aproximadamente 5 cm acima do local da punção e pediu ao participante que feche a mão. Foi realizada então a antissepsia da área com algodão embebido em álcool 70% no sentido do retorno venoso. O profissional puncionou a veia segurando a agulha horizontalmente com a mão dominante e introduzindo a agulha com o bisel voltado para cima, mantendo um ângulo de aproximadamente 15 graus. Em seguida, a seringa foi aspirada e, após a coleta 5 mL de sangue, foi solicitado que o participante abrisse a mão. O garrote foi então desprendido e a agulha removida suavemente, um algodão foi colocado sobre o local da punção com leve pressão e a agulha desconectada da seringa, e a amostra de sangue foi colocada nos tubos, escorrendo pela parede dos mesmos, e agitando-os levemente. Logo após, se observou a hemostasia no local da punção, a seringa e agulha foram descartadas no local apropriado, mantendo sempre o ambiente limpo e organizado.

O material biológico coletado foi processado, armazenado, analisado e descartado no próprio laboratório, após as análises, seguindo as normas de biossegurança.

4.4. Separação da fração de células mononucleadas ricas em linfócitos (PBMC) e do plasma rico em plaquetas (PRP)

Para obtenção do PBMC, ao sangue total coletado foi adicionado EDTA e separado por gradientes de densidade de Ficoll-Hystopaque como descritos por (BOYUM, 1968). O material foi então centrifugado a $400 \times g$ por 30 minutos. Após a centrifugação há a formação de uma camada intermediária composta por células mononucleares entre as camadas de plasma e Histopaque™ (Ficoll). A camada intermediária foi removida para outro tubo e homogeneizada com

solução fisiológica 0,9%. Este material foi novamente centrifugado por 10 minutos $250 \times g$. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento celular (pellet) foi ressuspensionado em solução fisiológica 0,9% (400 μ L). Em seguida o PBMC foi armazenado à - 20°C para as análises enzimáticas.

Já o plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado conforme descrito por (LUNKES et al., 2004), com pequenas modificações (JAQUES et al., 2011). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a $203 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado com cuidado para não pipetar a camada intermediária de leucócitos e hemácia, e posteriormente, transferido para um tubo de vidro identificado. O sobrenadante tratado foi então homogeneizado com tampão HEPES (400 μ L, 10 mM) e novamente centrifugado $2786 \times g$ por 10 minutos. Após esta última etapa, o sobrenadante é desprezado e o pellet foi ressuspensionado e homogeneizado novamente com HEPES (400 μ L), e congelado para as análises enzimáticas.

4.5. Coleta de escorpiões

Os escorpiões (SISGEN: AE2EA94) utilizados no presente estudo, foram coletados na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (RPPN-UFMS) localizada no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°30'25.6"S e 54°37'1.2"W), sob a licença ambiental nº 15382-2. Exemplares dos espécimes coletados foram identificados pelo Prof. Dr. Leonardo Sousa Carvalho e depositados na Coleção Zoológica ZUFMS - UFMS, número de tombo ZUFMS-CHE00534. As coletas foram realizadas em período noturno (19h-21h), em metodologia ativa com o auxílio de lanternas LED-UV 395 nm. Após as coletas, os escorpiões foram mantidos no Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos – INBIO (UFMS) em caixas plásticas com água “ad libitum” e alimentados semanalmente com dípteros da espécie *Drosophila melanogaster*, até as extrações.

4.6. Extração de peçonha

As extrações de peçonha foram realizadas semanalmente por meio de um estímulo elétrico (12 V) aplicado diretamente sobre o télson de cada indivíduo, junto ao acoplamento de um capilar de vidro ao agulhão do animal para sucção da peçonha expelida, que posteriormente foi depositada em microtubos de 500 μ L. A peçonha extraída foi diluída em 500 μ L de água

destilada e centrifugada a $10.500 \times g$ por 10 minutos a 4°C para retirada de materiais insolúveis. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, liofilizado e armazenado a -20°C até o momento dos ensaios.

4.7. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas de plaquetas e linfócitos foi determinada conforme descrito por BRADFORD (1976), empregando-se a soroalbumina bovina como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas SpectraMax Plus 384 em comprimento de onda de 595 nm.

4.8. Atividades enzimática da CD39 e CD73

A CD39 é uma enzima capaz de hidrolisar ATP em ADP e ADP em AMP. Enquanto a enzima CD73 hidrolisa AMP à adenosina. Desta forma, as atividades de hidrólise dos nucleotídeos foram monitoradas por meio da liberação de fosfato inorgânico utilizando o método de CHAN (1986).

4.8.1. Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos como: grupo controle, atividade enzimática com peçonha de *T. confluens* (Tc) e atividade enzimática com peçonha de *T. paraguayensis* (Tp).

4.8.2. Meio de reação

Os ensaios foram feitos na presença e ausência da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*, na concentração de 0,2 mg/mL. As reações foram iniciadas pela adição do substrato ATP, ADP (para CD39) ou AMP (para a CD73) (FISKE; SUBBAROW, 1925).

Para a análise em amostras de PBMC foi usado a concentração de 0,2 mg/mL de proteína. As amostras foram pré-incubadas por 10 minutos com NaCl (120mM), KCl (5mM), Glicose (60mM), Tris pH 8,0 (50 mM) e CaCl_2 (0,5 mM).

Após a pré incubação foi adicionado o substrato ATP (20mM) ou ADP (20 mM) e então as amostras foram incubadas por 70 minutos.

As amostras de PRP foram incubadas em placas de 96 poços contendo, NaCl (100mM), KCl (4mM), Glicose (50mM), Tampão Tris (100mM) pH 7,4; CaCl₂ (5 mM) para quantificação da atividade das CD39 ou MgCl₂ (10 mM) para quantificação da atividade de CD73. Após a pré incubação foi adicionado o substrato ATP (20mM), ADP (20 mM) e AMP (20 mM) e então as amostras foram incubadas por 60 minutos.

Ao fim do tempo de incubação foi adicionado TCA 10% em uma placa espelho, 40µL do analito foi transferido para a placa espelho e a reação foi parada. As amostras então foram homogeneizadas, coradas com o reagente colorimétrico Verde de Malaquita e lidas em leitor de microplacas no comprimento de 630 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de Pi/ minuto/ mg de proteína.

4.9. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram avaliados de acordo com a natureza de sua distribuição dos dados (teste paramétrico - ANOVA/Tukey e não paramétricos - Kruskal-Wallis/Dunn). As análises foram realizadas através do programa InStat e os gráficos construídos no programa graphpadprism7 e os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da peçonha de *Tc* e *Tp* sobre a atividade enzimática de CD39 em linfócitos de sangue periférico humano

A atividade da hidrólise de ATP e ADP em linfócitos foi quantificada na ausência e na presença de peçonha de *Tc* e *Tp* (0,2 mg/mL). Os resultados apresentados na Figura 3a. e Tabela 1. demonstram haver diferença significativa entre a hidrólise de ATP na presença de peçonha de *Tc* quando comparado ao controle. O mesmo dado para o efeito da peçonha de *Tp* mostra não haver diferença significativa entre a atividade com peçonha e controle. A média para a

hidrólise de ATP com peçonha de *Tc* é $0,1 \pm 0,006$ nmol de Pi/ minuto/ mg de proteína. Esta atividade é significativamente menor ($P < 0,05$) comparada ao resultado encontrado no grupo controle ($0,17 \pm 0,04$ nmol de Pi/ minuto/ mg de proteína).

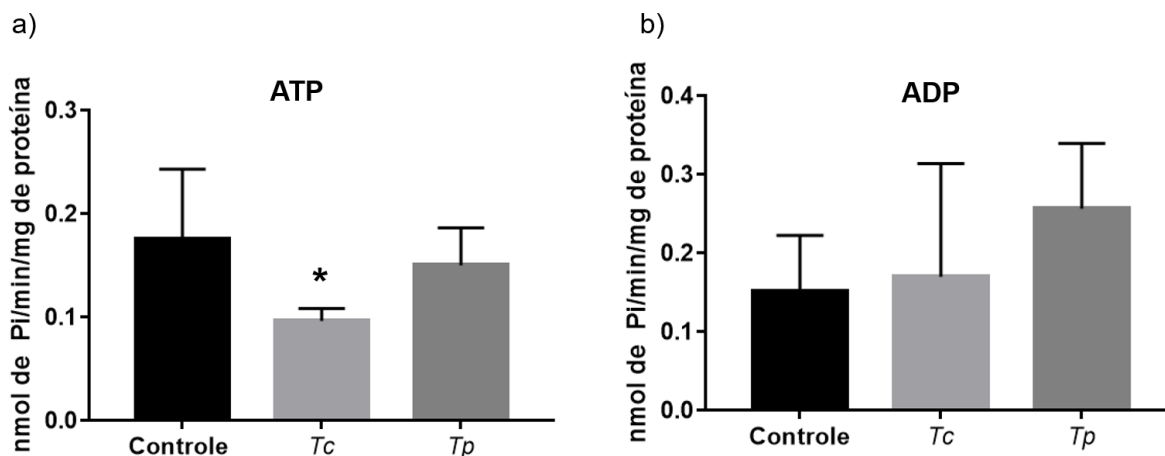


Figura 3. Efeito da peçonha de *Tc* e *Tp* sobre hidrólise de ATP (a) e ADP (b) em linfócitos do sangue periférico humano. * indica que $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis/Dunn).

A Enzima CD39 é responsável pela hidrólise de ATP em ADP e de ADP em AMP. A Figura 3b. e os resultados expressos na Tabela 1. demonstram a hidrólise de ADP (em nmol de Pi/ minuto/ mg de proteína) pela CD39 na presença de toxinas da peçonha de *Tc* e *Tp*. Os resultados demonstram não haver alteração significativa ($P > 0,05$) na atividade de CD39 de linfócitos causada pela peçonha de *Tc* e *Tp* em relação ao grupo controle.

Tabela 1. Efeito das peçonhas sobre a atividade enzimática da CD39 sobre a hidrólise de ATP e ADP em linfócitos do sangue periférico humano.

<u>Linfócitos</u>						
	<u>Controle</u>		<u><i>Tc</i></u>		<u><i>Tp</i></u>	
ATP	$0,17 \pm 0,04$	$n=3$	$0,10 \pm 0,006^*$	$n=4$	$0,15 \pm 0,02$	$n=2$
ADP	$0,15 \pm 0,03$	$n=5$	$0,17 \pm 0,07$	$n=4$	$0,26 \pm 0,06$	$n=2$

5.2. Efeito da peçonha de *Tc* e *Tp* sobre a atividade enzimática de CD39 e CD73 em plaquetas de sangue periférico humano

A peçonha de *Tp* causou um aumento na hidrólise de ATP pela CD39 ($0,16 \pm 0,12$ nmol de Pi/ minuto/ mg de proteína) (Figura 4.a), no entanto esse resultado não foi estatisticamente diferente do controle ($P>0,05$) (Tabela 2.). A peçonha de *Tc* também não apresentou diferença estatística em relação ao controle ($P>0,05$).

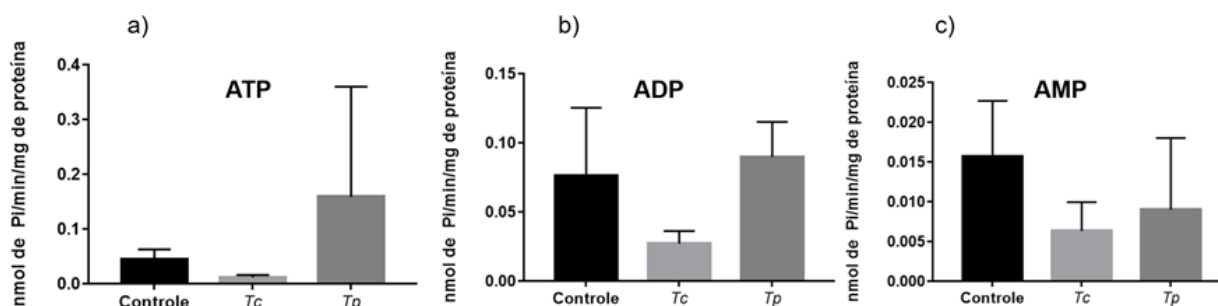


Figura 4. Efeito da peçonha de *Tc* e *Tp* sobre hidrólise de ATP (a), ADP (b) e AMP (c) em plaquetas do sangue periférico humano. (Kruskal-Wallis/Dunn).

A atividade da CD39 de hidrólise de ADP foi menor na presença de peçonha de *Tc* e maior com a peçonha de *Tp* quando comparados aos do controle (Figur4b), porém esses resultados não apresentam diferença estatística ($P>0,05$) (Tabela2.).

Tabela 2. Efeito das peçonhas escorpiônicas sobre a atividade enzimática da CD39 e CD 73 sobre a hidrólise de ATP e ADP em plaquetas do sangue periférico humano.

Plaquetas						
	Controle		<i>Tc</i>		<i>Tp</i>	
ATP	0,04 ± 0,01	n=6	0,01 ± 0,002	n=5	0,16 ± 0,12	n=3
ADP	0,08 ± 0,02	n=8	0,03 ± 0,01	n=3	0,09 ± 0,01	n=3
AMP	0,01 ± 0,003	n=6	0,01 ± 0,002	n=4	0,01 ± 0,005	n=3

A atividade da CD73 (hidrolise de AMP) em plaquetas não foi diferente entre os grupos controle *Tc* e *Tp* ($P>0,05$) (Tabela 2.) Os resultados estão mostrados na Figura 4c.

5. DISCUSSÃO

A peçonha do escorpião é uma fonte biológica que possui potencial para prospecção de fármacos. Isso porque uma série de peptídeos encontrados em peçonhas de escorpião possuem afinidade por canais iônicos, e portanto, a peçonha pode ser usada para produção de drogas com potencial farmacológico (UZAIR B et al., 2018).

Nossos resultados demonstram que a peçonha (20mg/ml) de *Tc* exerceu efeito sobre a atividade enzimática da CD39 (Tabela1), a presença da peçonha causou diminuição na atividade enzimática, especificamente na hidrólise de ATP, quando comparada ao controle. Este efeito pode ser explicado dada a composição das moléculas bioativas presentes na peçonha do escorpião.

Em 2020, Costal-Oliveira e colaboradores verificam efeitos da peçonha do escorpião *Hadruroides lunatus* (aproximadamente 1mg/ml) sobre parâmetros sorológicos do sangue de ratos. A peçonha de *H. lunatus* causou aumento na produção de células do sangue e do sistema imune, como por exemplo linfócitos. Esse mesmo efeito foi observado após o envenenamento de ratos por escorpiões do gênero *Tityus*. Guimarães et al (2011), relatam policitemia relativa e leucocitose com linfocitose. Outros estudos corroboram para este resultado demonstrando o efeito da peçonha de escorpião sobre parâmetros hematológicos (CASELLA-MARTINS, et al., 2015; COSTAL-OLIVEIRA et al., 2015; KHOSRAVI et al., 2017; COTA-ARCE, et al., 2020; HOROZ ÖÖ et al., 2020).

Conceição e colaboradores (2005) estudaram o efeito da toxina TsTX-I de *Tityus serrulatus* em nervos sinápticos. Os resultados do estudo demonstram que o contato com a peçonha desencadeia uma liberação de nucleotídeos de purinas em torno de 42 vezes maior que no controle. Neste sentido, as enzimas CD39 e CD73 são essenciais no controle da atividade inflamatória e de nucleotídeos, pois são elas quem convertem os nucleotídeos extracelulares (ATP, ADP e AMP) em adenosina. Esta última é uma molécula que também está implicada na sinalização anti-inflamatória (REUTERSHAN et al., 2009; JUNGER, W.G., 2011).

Em um processo inflamatório o ATP age como uma molécula pró-inflamatória e exerce efeito sobre a liberação de histaminas, aumentando a

produção de prostaglandinas, além da liberação de citocinas (DI VIRGILIO F. 2001). Assim, a inibição da hidrólise de ATP observada em linfócitos com peçonha de *Tc* é um mecanismo que interfere no processo inflamatório diminuindo a fosforilação de ATP, aumentando o processo pró - inflamatório.

Por outro lado, a peçonha de escorpião tem poucos efeitos na coagulação e em plaquetas. Em muitos casos, a peçonha possui neurotoxinas que podem ter efeito sobre neurotransmissores, como norepinefrina e epinefrina. A epinefrina é um pró-agregante que tem ação sobre plaquetas (LONGENECKER, G. L; LONGENECKER H. E. 1984). A sinalização purinérgica possui um papel crítico na agregação plaquetária. As plaquetas armazenam moléculas de adenina em seu interior e essas moléculas são liberadas como um sinal de ativação plaquetária. Na membrana celular, as plaquetas expressam CD39 e CD73 que regulam a agregação plaquetária (CHAURASIA et al., 2020).

Um estudo relata que a peçonha de *T. serrulatus* (0,5 - 0,67 mg/kg) injetada em ratos causou aumento na percentagem de volume ocupado pelos eritrócitos, número total de células vermelhas e concentração de hemoglobina (CUSINATO, et al., 2010). Os resultados do presente estudo (figuras 3b e 4a, b e c) demonstram que a peçonha de *Tc* e *Tp* (0,2mg/ml) não exerceram efeito sobre a atividade de CD39 ou CD73 em plaquetas, e especificamente na hidrólise de ADP em linfócitos. Esses resultados são reflexo da concentração da peçonha usadas em nosso método, uma vez que em outras pesquisas a peçonha de *Tityus* (em concentrações próximas as utilizadas 0,24 mg/mg) não causou efeito nos parâmetros hematológicos (CASELLA-MARTINS, et al., 2015).

Vale ressaltar que o presente estudo foi um trabalho experimental conduzido durante a pandemia de Covid-2019. Esse fato implicou em restrições sanitárias, como o distanciamento social. Desta forma houve impacto na quantidade voluntários que compreendiam os critérios de inclusão (alunos e servidores da UFMS). Além disso, essas mesmas medidas restritivas impactaram os horários de acesso aos pontos de coleta de escorpiões e consequentemente a quantidade de peçonha disponível para os experimentos.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo traz pela primeira vez o efeito da peçonha de duas espécies de escorpiões do gênero *Tityus* sobre a atividade das enzimas CD39 e CD73 em linfócitos e plaquetas do sangue periférico de humanos. Os resultados demonstram que a peçonha de *Tc* possui moléculas que tem efeito inibitório sobre a atividade CD39 em linfócitos. No entanto não há efeito sobre a CD39 e a CD73 em plaquetas. Este resultado agrega dados e conhecimento sobre o efeito inflamatório da peçonha de *Tc* e sobre o papel da CD39 nas células do sangue periférico. Futuros estudos, com maiores concentrações de peçonhas, número amostral de voluntários, e com diferentes frações de cada peçonha contribuirão para elucidar o efeito do envenenamento nas enzimas do sistema purinérgico CD39 e CD73 em linfócitos e plaquetas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C; SOUTO-PADRÓN, T. Venoms as Sources of Novel Anti-Parasitic Agents. **Toxins and Drug Discovery**, 1–31. 2015.

ALGARS, A; KARIKOSKI, M; YEGUTKIN, G. G; STOITZNER, P; NIEMELA, J; SALMI, M; JALKANEN, S. Different role of CD73 in leukocyte trafficking via blood and lymph vessels. **Blood**, 117(16), 4387–4393. 2011.

ALMAAYTAH, A; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**. 51. 2013.

ARAÚJO, KAM; TAVARES, AV; MARQUES, MRV; VIEIRA, AA; LEITE, RS. Epidemiological study of scorpion stings in the Rio Grande do Norte State, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 59, 58. 2017.

BAHLOUL, M; CHABCHOUB, I; CHAARI, A; CHTARA, K; KALLEL, H; DAMMAK, H; KSIBI, H; CHELLY, H; REKIK, N; CHOKRI, BH; BOUAZIZ, M. Scorpion Envenomation Among Children: Clinical Manifestations and Outcome

(Analysis of 685 Cases). **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 83. 1084-92. 2010.

BAVARESCO, L. Estudo do papel da Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 na proliferação de gliomas. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/12713>. 2008.

BENMOSBAH, M; GUEGUENIAT, P; MAYENCE, C; EGMANN, G; NARCISSE, E; GONON, S; HOMMEL, D; KALLEL, H. Epidemiological and clinical study on scorpionism in French Guiana. **Toxicon**. 73:56-62. 2013.

BOREA, P; GESSI, S; MERIGHI, S; VINCENZI, F; VARANI, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological reviews**. 98. 1591-1625. 2018.

BORGES, A; ALFONZO MJ; GARCÍA, C; WINAND, N; LEIPOLD, E; HEINEMANN, S. "Isolation, Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel β -Toxin from the Venezuelan Scorpion, Tityus Zulianus." **Toxicon**. 43 (6):671–84. 2004.

BÖYUM, A.J. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**. Supplementum. 97. 77-89. 1968.

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

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. **Purinergic signalling**. 11(4): 411-34. 2015.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. **Pharmacological Reviews**, 58(1), 58–86. 2006.

CAIAZZO, E; BILANCIA, R; ROSSI, A; IALENTI, A; CICALA, C. 2020. Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1/CD39 Affects the Response to ADP of Female Rat Platelets. **Frontiers in Pharmacology**, 31;10:1689. 2020.

CASELLA-MARTINS, A; AYRES, L. R; BURIN, S. M; MORAIS, F. R; PEREIRA, J. C; FACCIOLI, L. H. PEREIRA-CROTT, L. S. Immunomodulatory

activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 21(1). 2015.

CHAN, K M; DELFERT, D; JUNGER, KD . A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v.157, n.2, p.375-380. 1986.

CHAPARRO, E; DA SILVA, P.I. Lacrain: The first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 48, 277–285. 2016.

CHAURASIA, S. N; KUSHWAHA, G; PANDEY, A; DASH, D. Human platelets express functional ectonucleotidases that restrict platelet activation signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 527(1), 104–109. 2020.

CHIPPAUX, JP. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug design, development and therapy**. 6. 165-73. 2012.

CHIPPAUX, JP; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. **Acta tropica**. 107. 71-9. 2008.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M; CACCIN, P; CHIAVEGATO, A; PIZZO, P; CARMIGNOTO, G; ANGULO, Y; LOMONTE, B; GUTIÉRREZ, J; MONTECUCCO, C. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 107. 14140-5. 2010.

CONCEIÇÃO, I. M; JURKIEWICZ, A; FONSECA, D. R; OPPERMAN, A. R; FREITAS, T. A; LEBRUN, I; GARCEZ-DO-CARMO, L. Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **British Journal of Pharmacology**, 144(4), 519–527. 2005.

COSTAL-OLIVEIRA, F; GUERRA-DUARTE, C; CASTRO, K. L. P; TINTAYA, B; BONILLA, C; SILVA, W. e CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Toxicon**, 103, 129–134. 2015.

COTA-ARCE, J. M; ZAZUETA-FAVELA, D; DÍAZ-CASTILLO, F; JIMÉNEZ, S; BERNÁLDEZ-SARABIA, J; CARAM-SALAS, N. L; DE LEÓN-NAVA, M. A. Venom components of the scorpion *Centruroides limpidus* modulate

cytokine expression by T helper lymphocytes: Identification of ion channel-related toxins by mass spectrometry. **International Immunopharmacology**, 84, 106505. 2020.

CUPO, P; AZEVEDO-MARQUES, M. M; HERING, S. E; Acidentes por animais peçonhentos: escorpiões e aranhas. **Medicina** (Ribeirao Preto. Online), disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-400408>, 36(2/4), 490. 2003.

CUSINATO, D. A. C; SOUZA, A. M; VASCONCELOS, F; GUIMARÃES, L. F. L; LEITE, F. P; GREGÓRIO, Z. M. O; ARANTES, E. C. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with Tityus serrulatus scorpion venom. **Toxicon**, 56(8), 1477–1486. 2010.

DA SILVA JR, P; DAFFRE, S; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider Acanthoscurria gomesiana hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **Journal of Biological Chemistry**. 275, 33464–33470. 2000.

DE LA VEGA, R.R; GARCIA, B.I; D'AMBROSIO, C; DIEGO-GARCIA, E; SCALONI, A; POSSANI, L.D. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion Centruroides limpidus limpidus in response to septic injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**; 61, 1507–1519. 2004.

DE QUEIROZ MR, DE SOUSA BB, DA CUNHA PEREIRA DF, MAMEDE CCN, MATIAS MS, DE MORAIS NCG, DE OLIVEIRA COSTA J, DE OLIVEIRA F. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. **Toxicon**. 2017.

DE ROODT, A. R; LAGO, N. R; SALOMÓN, O. D; LASKOWICZ, R. D; NEDER DE ROMÁN, L. E; LÓPEZ, R. A; VEGA, V. DEL V. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: Tityus confluens. **Toxicon**, 53(1), 1–8. 2009.

DHANANJAYA, BL; D'SOUZA, CJM. The Pharmacological Role of Phosphatases (Acid and Alkaline Phosphomonoesterases) in Snake Venoms related to Release of Purines - a Multitoxin. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**. 108. 79-83. 2011.

DHANANJAYA, BL; D'SOUZA, CJM. Purinergic Mechanisms of Prey Acquisition by Venomous Organisms. In: Gopalakrishnakone P; Calvete J. (eds) *Venom Genomics and Proteomics*. **Toxinology**. Springer, Dordrecht. 381-392. 2016.

DINIZ, L.C.L; MIRANDA, A; DA SILVA, P.I; Jr. Human Antimicrobial Peptide Isolated from *Triatoma infestans* Haemolymph, *Trypanosoma cruzi*-Transmitting Vector. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 8, 354. 2018.

DI VIRGILIO, F. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, 97(3), 587–600. 2001

DWYER, K; DEAGLIO, S; GAO, W; FRIEDMAN, D; STROM, T; ROBSON, S. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**. 3. 171-180. 2007.

EBERHARDT, NATALIA BERGERO, GASTÓN YANINA, · MAZZOCCO MARIOTTA, L; AOKI, · M PILAR. Purinergic modulation of the immune response to infections. **Purinergic Signalling**. 1. P1-21. 2022.

FERREIRA, F.; SILVA, P; SOARES, T; GONÇALVES-MACHADO, L; ARAÚJO, L; GONÇALVES-SILVA, T; MELLO, G; PITTA, M; RÊGO, M; PONTUAL, E; ZINGALI, R; NAPOLEÃO, T; PAIVA, P. “Evaluation of Antimicrobial, Cytotoxic, and Hemolytic Activities from Venom of the *Spider Lasiodora* Sp. **Toxicon**. 122:119–26. 2016.

FISKE, CH; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**; 66: 375-400. 1925.

FRANCO, R; CASADÓ, V; CIRUELA, F; SAURA, C; MALLOL, J; CANELA, E; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**. 52. 283-294. 1997.

GIUSTI G, GALANTI B. Colorimetric method. In **HU Berg-meyer, Methods of Enzymatic Analysis**, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, p. 315-323. 1984.

GUIMARÃES, P. T. C; PINTO, M. C. L; MELO, M. M. Hematological and clinical profiles of mice submitted to experimental poisoning with *Tityus fasciolatus* venom. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; 63(6): 1382-1390. 2011.

GWEE, M. C. E; NIRTHANAN S; KHOO, H.-E; GOPALAKRISHNAKONE, P; KINI, R. M; CHEAH, L.-S. 2002. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, vol. 29, no. 9, pp. 795–801.

HOROZ ÖÖ, Y. D; ASLAN N; GÖKAY S. S; EKINCI F; ERDEM S; HAYTOĞLU Z; SERTDEMİR Y; YILMAZ HL. Is there any relationship between initial hematological parameters and severity of scorpion envenomation? **Turkey Journal of Pediatrics**;62(3):394-404. 2020.

IDZKO, M; FERRARI, D; ELTZSCHIG, H. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**. 509. 310-7. 2014.

ISBISTER, G; BAWASKAR, H. Scorpion Envenomation. **The New England journal of medicine**. 371. 457-63. 2014.

JAQUES, J; RUCHEL, J; SCHLEMMER, K; CAMERA, V; BAGATINI, M; SOUZA, V; MORETTO, M; MORSCH, V; SCHETINGER, M; LEAL, D. Effects of curcumin on the activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from cigarette smoke-exposed rats. **Cell biochemistry and function**. 29. 630-5. 2011.

JI, YH; MANSUELLE, P; TERAOKAWA, S; KOPEYAN, C; YANAIHARA, N; HSU, KE; ROCHAT, H. Two neurotoxins (BMK I and BMK II) from the venom of the scorpion *Buthus martensi* Karsch: Purification, amino acid sequences and assessment of specific activity. **Toxicon**. 34. 987-1001. 1996.

JOHNSTON-COX, H; YANG, D; RAVID, K. Physiological Implications of Adenosine Receptor-Mediated Platelet Aggregation. **Journal of cellular physiology**. 226. 46-51. 2010.

JUNGER, WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature reviews. Immunology**, 11(3), 201–212. 2011.

KAWASHIMA, Y; NAGASAWA, T; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5V-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**. 96. 2157-62. 2000.

KHOSRAVI, M; MAYAHI, M; JALALI, S; REZAIE, A; TAGHAVI MOGHADAM, A; HOSSEINI, Z; BARZEGAR, S; AZADMANESH, S. Effects of experimental *Mesobuthus eupeus* scorpion envenomation on chicken. **Archives of Razi Institute**; 72(1): 23-31. 2017.

LONGENECKER, G. L; LONGENECKER, H. E. Interactions of Venoms and Venom Components with Blood Platelets. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 3(2-3), 223–251. 1984.

LOURENÇO, WR. Scorpion diversity and distribution: Past and present patterns. **Scorpion Venoms**. 3-23. 2015.

LUNKES, G; LUNKES, D; MORSCH, V; MAZZANTI, C; MORSCH, A; MIRON, V; SCHETINGER, M. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes research and clinical practice**. 65. 1-6. 2004.

MIGLIOLO, L; MIGLIOLO, L; DE MORAES, L. F. R. N; GONÇALVES, R. M. Caracterização do potencial antibiofilme e antitumoral da peçonha de *Tityus confluens*. **Editores Atena**. 1-388. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN. Casos escorpionismo no Brasil de 2000 a 2018. **Banco SINAN**. 2019.

MORENO GUILLÉN, E; CANET-PONS, J; GRACIA, E; LLUÍS, C; MALLOL, J; CANELA, E; CORTES, A; CASADÓ, V. Molecular Evidence of Adenosine Deaminase Linking Adenosine A2A Receptor and CD26 Proteins. **Frontiers in Pharmacology**. 9. 106. 2018.

OLIVEIRA, T; OLIVEIRA, U; SILVA JUNIOR, P. Serrulin: A Glycine-Rich Bioactive Peptide from the Hemolymph of the Yellow *Tityus serrulatus* Scorpion. **Toxins**. 11. 517. 2019.

ORTIZ, E; GURROLA, G; SCHWARTZ, E; POSSANI, L. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**. 93. 2014.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, 1–16. 2020.

PORTO, T. J; CALDAS, E. A; COVA, B. O; SANTO, V. M. N. Primeiro relato de acidentes escorpiônicos causados por *Tityus martinpaechi* Lourenço, 2001 (Scorpiones; Buthidae). **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**, 9(3), 266–269. 2010.

PULTE, E; BROEKMAN, M; OLSON, K; DROSOPOULOS, J; KIZER, J; ISLAM, N; MARCUS, A. CD39/NTPDase-1 Activity and Expression in Normal Leukocytes. **Thrombosis research**. 121. 309-17. 2007.

REUTERSHAN, J; VOLLMER, I; STARK, S; WAGNER, R; NGAMSRI, K.-C; ELTZSCHIG, H. K. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. **The FASEB Journal**. 23(2), 473–482. 2009.

ROBSON, S; SÉVIGNY, J; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic signalling**. 2. 409-30. 2006.

SANSOM, F; NEWTON, H; CRIKIS, S; CIANCOTTO, N; COWAN, P; D'APICE, A; HARTLAND, L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Cellular microbiology**. 9. 1922-35. 2007.

SANTORO, M; VAQUERO, T; LEME, A; SERRANO, S. NPP-BJ, a nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Bothrops jararaca* snake venom, inhibits platelet aggregation. **Toxicon**. 54. 499-512. 2009

SEMPLE, J; ITALIANO, J; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature reviews. Immunology**. 11. 264-74. 2011.

SILVA, JD. Escorpionismo no Brasil. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Trabalho de Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna**. 26 p. 2012.

SILVA, PS; JUNIOR, CTS; ARAÚJO, EG; KANAAN, S; XAVIER AR. Adenosina desaminase: uma enzima extraordinária e onipresente. **Pulmão RJ** ; 25(1): 11-16, 2016.

UZAIR B, BINT-E-IRSHAD S, KHAN BA, AZAD B, MAHMOOD T, REHMAN MU, BRAGA VA. Scorpion Venom Peptides as a Potential Source for Human Drug Candidates. **Protein & Peptide Letters**; 25(7):702-708. 2018.

WILSON R. L; BÉRITIS C. C; EVELLYN C; BRUEHMUELLER R. Confirmation of *tityus confluens borelli*, 1899 (scorpiones, buthidae) in brazil and description of a new subspecies from the state of Mato Grosso Do Sul. **Sociedad Entomológica Aragonesa** ; nº 34: 27 – 30. 2004.

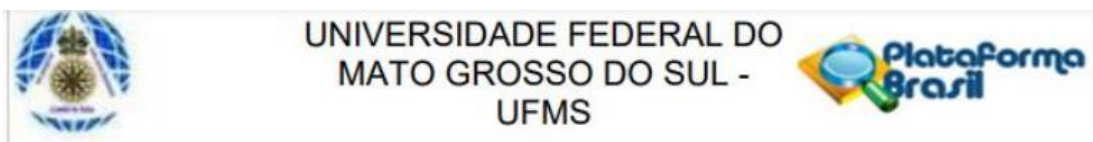
YAMAZAKI, L; MARQUES, M; BRESCOVIT, A; BATTIROLA, L. *Tityus paraguayensis* Kraepelin, 1895 (Scorpiones: Buthidae) em copas de *Callisthene fasciculata* (Spr.) Mart. (Vochysiaceae) no Pantanal de Mato Grosso. **Acta Biológica Paranaense**. 44. 153-158. 2015.

ZHOU, J; ZHANG, X; ZHOU, Y; WU, B; TAN, Z. Up-regulation of P2X7 Receptors Contributes to Spinal Microglial Activation and the Development of Pain Induced by BmK-I. **Neuroscience Bulletin**. 35. 2019.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**. 362, 299-309. 2000.

ZIMMERMANN, H; ZEBISCH, M; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic signalling**. 8. 437-502. 2012.

Anexo I: Parecer Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do efeito da peçonha de *Tityus serrulatus* e *Tityus paraguayensis* sobre as atividades das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos humanos

Pesquisador: TELMA RODRIGUES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 40559420.8.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.588.216

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1666679.pdf	02/03/2021 21:14:46		Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.pdf	02/03/2021 21:13:39	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
Outros	CARTARESPOSTACEP.pdf	29/01/2021 17:13:16	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
Declaração de concordância	DocDiretorINBIO.pdf	29/01/2021 17:12:24	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	AUTORIZACAOPROFDOUGLAS.pdf	29/01/2021 17:03:26	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoBioquimicajan.pdf	29/01/2021 17:01:53	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleatualizado.pdf	29/01/2021 17:00:05	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoASS.pdf	29/01/2021 16:45:54	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.pdf	29/11/2020 12:11:28	TELMA RODRIGUES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não