

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR - PMBqBM

LAÍS CORRÊA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA PEÇONHA DE *Tityus*  
*confluens***

CAMPO GRANDE - MS

MARÇO - 2023

LAIS CORRÊA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA PEÇONHA DE *Tityus*  
*confluens***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular -PMBqBM, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena

CAMPO GRANDE - MS

MARÇO - 2023

TERMO DE APROVAÇÃO

LAÍS CORRÊA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA PEÇONHA DE *Tityus*  
*confluens***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

20 de março de 2023

**Comissão Examinadora**

---

Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Suely Gomes  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Manuela Pucca  
Universidade Federal de Roraima

Dedico esse trabalho a pessoa que mais amo no mundo, meu porto seguro durante toda a minha vida, mas especialmente durante esses dois anos de mestrado, minha maior fonte de inspiração e força, minha mãe Emirene de Fátima Corrêa.  
A você dedico.

*A journey of thousand miles begins with a single step.*

***Lao Tse***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo privilégio de viver essa experiência.

Desejo expressar meus mais sinceros agradecimentos às seguinte pessoas e instituições.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena por ter aceitado me guiar e acompanhar nessa jornada, mesmo sem me conhecer anteriormente, agradeço pela confiança, apoio e ensinamentos.

Agradeço aos colaboradores, Prof. Dr. Ludovico Migliolo da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) pela contribuição do meu trabalho através da doação da peçonha e pelo auxílio nas análises cromatográficas, Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos – INBIO (UFMS), pela doação de amostras de rim para realização de experimentos e a Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Trentin Perdomo – Laboratório Culturas Celulares, FACFAN(UFMS), pela contribuição com a realização e análises de viabilidade celular.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Aos órgãos de fomento por apoiar e ceder recursos para a realização desta pesquisa, especialmente à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço aos colegas feito durante esse período, Henrique Covali, Romário Portilho, Luiza Calastro e Mila Fernandes pela amizade, aprendizado pessoal e acadêmico, e pelas boas risadas. Em especial, agradeço ao Henrique por toda ajuda nos experimentos, pela paciência em me treinar e ensinar tanto.

Aos amigos que carrego comigo desde a graduação, a todo o grupo intitulado Foras da Casinha, agradeço pelo apoio e força para superar todas as barreiras e desânimos, compartilhar essa fase da pós-graduação junto a vocês foi fundamental para a minha não desistência nas horas difíceis. Agradeço a minha família, aos meus pais e irmão pelo apoio pessoal e financeiro, as minhas primas Carla e Claudia, tia Marilene e tio Aparecido, e minha avó Acinete pelos braços abertos que me receberam de volta a Campo Grande, obrigada por todo apoio, sem vocês eu não estaria completando mais esse ciclo.

E por fim, agradeço a todos que me ajudaram e torceram por mim, ao longo dessa caminhada!

## RESUMO

Os escorpiões são artrópodes da ordem Scorpiones, distribuídos em diversos ecossistemas, são animais peçonhentos que apresentam estrutura inoculadora de peçonha, ocasionando acidentes em humanos. Esses acidentes, são considerados um problema de saúde pública em diversos países, como o Brasil, entretanto, apenas 50 espécies das mais de 2700 já descritas, são responsáveis pelos acidentes, e no Brasil todos do gênero *Tityus*. As peçonhas são misturas complexas, composta de moléculas bioativas, com potencial promissor para a prospecção de novos produtos biotecnológicos e farmacoterápicos. Entretanto, ainda existem poucos estudos a respeito da peçonha de diversos escorpiões como *Tityus confluens*, que ocorre no cerrado brasileiro. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar bioquimicamente e biologicamente a peçonha do *Tityus confluens*. Foi verificado o perfil proteico através de ensaios de eletroforese (SDS-PAGE) e cromatografia, foram investigadas atividades enzimáticas, como fosfolipásica, amilolítica e proteolítica, assim como, o efeito da peçonha sobre a atividade de ATPases de membrana e avaliar a citotoxicidade sobre células normais e tumorais. A peçonha de *T. confluens* demonstrou um perfil proteico diverso, apresentando bandas de proteínas com massas moleculares entre 50-100 kDa, bandas menores que 10kDa podendo corresponder a peptídeos e, compostos de natureza hidrofílica moderada fracionadas entre 18 – 25 min de tempo de retenção (RT) e o um composto hidrofóbico, de maior abundância, eluido ao 41 min de RT. Em relação a atividade de enzimas de membranas, a peçonha provocou um aumento na atividade de enzimas ATPases quando incubado à 30 e 50 min, referindo-se a possibilidade de peptídeos moduladores de canais iônicos, além disso, a demonstrou atividade amilolítica, atividade pouco discutida na composição de peçonhas escorpiônicas. *T. confluens* não apresentou atividades fosfolipásica e proteolítica, através dos métodos utilizados, e não foi citotóxica contra células normais e neoplásicas. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para a caracterização inicial da composição da peçonha de *Tityus confluens*, possibilitando ampliar a visão a respeito das peçonhas escorpiônicas e do conhecimento acerca de um escorpião amplamente distribuído no estado do Mato Grosso do Su. Entretanto se faz necessário novos estudos sobre estes compostos, visando moléculas potenciais para a bioprospecção.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática, Escorpião, Peptídeos.

## ABSTRACT

Scorpions are arthropods from Scorpiones, habit several ecosystems, and are venomous animals with a venom-inoculating structure, causing accidents in humans. These accidents are considered a public health problem in several countries, such as Brazil, however, only 50 species of the more than 2700 that have already been described are responsible for accidents, and in Brazil, all are from the genus *Tityus*. Venoms are complex mixtures, composed of bioactive molecules, with promising potential for prospecting new biotechnological and pharmacotherapeutic products. However, few studies about the venom of several scorpions, such as *Tityus confluens*, occur in the Brazilian savanna. The present study aimed to characterize biochemically and biologically the venom from *Tityus confluens*. The protein and chromatographic profile of the venom was verified, as well as the enzymatic activities, such as phospholipase, amylolytic and proteolytic, the effect of the venom on the activity of membrane ATPases, in addition to evaluating the cytotoxicity on normal and tumor cells. The venom showed a diversity of components by the electrophoretic and chromatographic profile, showing protein bands with molecular masses between 50 -100 kDa, bands smaller than 10kDa, and eluted fractions between 18 - 25 min of RT and the largest fraction at 41 min of RT, possibly corresponding to peptides. The venom caused an increase in the activity of ATPase enzymes when incubated at 30 and 50 min, demonstrated amylolytic activity, did not present phospholipase and proteolytic activities, and was not cytotoxic against normal and neoplastic cells. The results obtained in this study allow an initial characterization of the composition of the venom of *Tityus confluens*, expanding the view of scorpion venoms and further studies on these compounds are necessary to elucidate the potential molecules for bioprospecting.

Keywords: Enzymatic activities; Peptides; Scorpions.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - <i>Eramoscorpius brucensis</i> , escorpião fóssil aquático (Fonte: WADDINGTON; RUDKIN; DUNLOP, 2015). .....	15
<b>Figura 2</b> - Desenho esquemático da morfologia externa do corpo de um escorpião, face dorsal (à esquerda) e ventral (à direita). Fonte: (CANDIDO; FAN, 2019). .....	16
<b>Figura 3</b> - <i>Tityus trivitattus</i> (esquerda) e <i>Tityus confluens</i> (direita). Fonte: (DE ROODOT, 2014). .....	18
<b>Figura 4</b> - <i>Tityus confluens</i> . Foto: Acervo pessoal. ....	18
<b>Figura 5</b> - Perfil eletroforético de 25 µg da peçonha de <i>Tityus confluens</i> (T.c) realizado através de SDS PAGE 15% (A – sistema Laemmli) e 16,5% (B – sistema tricina). Os números e letras em vermelho indicam as bandas.....	33
<b>Figura 6</b> - SDS-PAGE (gel a 20%, corado com prata) sob condições redutoras de <i>Tityus ssp</i> . Peçonha de espécimes do Paraguai (PAR, <i>T. trivitattus</i> ), Argentina (ARG, <i>T. trivittatus</i> ), Venezuela (VEN, <i>T. discrepans</i> ) e Brasil (BRA, <i>T. serrulatus</i> ) (BORGES et al., 2020). ....	34
<b>Figura 7</b> - Perfil cromatográfico obtido através da eluição de 600 µg da peçonha liofilizada de <i>Tityus confluens</i> , separado por CLAE em coluna de fase reversa C18, com absorvância em 216 nm e separada com um gradiente de 5% a 95% de solução B em 50 min. ....	36
<b>Figura 8</b> - Zimograma de atividade proteolítica (gelatinolítica - figura A e caseinolítica - figura B) em SDS- PAGE 12 %, 25µg da peçonha de <i>T. confluens</i> . O gel foi corado com coomassie blue R-250.....	38
<b>Figura 9</b> - Gel de ágar contendo gema de ovo como substrato, para atividade fosfolipásica da peçonha bruta de <i>T. confluens</i> , peçonha nas concentrações de 10, 25 e 50 µg. Controle negativo (água destilada). ....	39
<b>Figura 10</b> - Atividade amilolítica. na peçonha bruta de <i>T. confluens</i> . O controle negativo (tampão fosfato de sódio 0,02M) e as três concentrações de proteína da peçonha (1, 5 e 10 µg). .....	41
<b>Figura 11</b> - Atividade pNPPase da peçonha de T.c, expressa em nmol de Pi/min/mg. A barra representa o desvio padrão dos experimentos, a letra ‘a’ indica diferença estatística em relação ao controle, e a letra ‘b’ indica diferença estatística em relação a letra ‘a’ (p≤0.05). Todos os experimentos realizados em triplicatas. ....	41
<b>Figura 12</b> - Atividade citotóxica em linhagens tumorais 786-0 e MCF-7 e linhagem celular normal 3T3.em diferentes concentrações da peçonha de Tc. ....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de casos notificados de escorpionismos nos últimos 15 anos, em nível nacional, regional e estadual. <b>Fonte:</b> DATASUS – Ministério da Saúde, 2022. ....	20
<b>Tabela 2.</b> Nível de gravidade, manifestações clínicas e tratamento soroterápico de acidentes com escorpião. <b>Fonte:</b> Modificado de Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (FUNASA, 2001) .....	21
<b>Tabela 3 -</b> Frações recuperadas, dados de altura do pico (mAU), tempos de retenção e gradiente de 5% a 95% de solução B, das frações de maior relevância da peçonha bruta de <i>Tityus confluens</i> . ....	37
<b>Tabela 4.</b> Inibição de crescimento celular pela peçonha de Tc sobre células tumorais das linhagens 786-0 e MCF-7 e linhagem celular normal 3T3. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BPF	Fator de potencialização da bradicinina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Da	Dalton
DBP	Peptídeo com ponte de dissulfeto
DMEM	Modificação do meio Eagle Basal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DP	Desvio padrão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
e-SUS VS Saúde	Estratégia de Informatização-Sistema Único de Saúde Vigilância em Saúde
IC50	Concentração inibitória de 50%
IG50	Concentração necessária do composto para obter 50% na redução de células viáveis
INBIO	Instituto de Biociências
kDa	KiloDalton
LAO	L-Amino ácido oxidase
M	Molar
mAU	Miliunidades de Absorbância
MCE	Eletroforese capilar microfluídica
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
MS	Mato Grosso do Sul
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NDBP	Peptídeo sem ligação de dissulfeto
nm	Nanômetro
nmol	Nanomols
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrogênio iônico
Pi	Fosfato inorgânico
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato
®	Registrado
SAAr	Soro antiaracnídio.
SAEE	Soro antiescorpiônico
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SNARE	Ligação de fator sensível a N-etilmaleimida solúvel
sPLA2	Fosfolipases da família A2 secretadas
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tc.	<i>Tityus confluens</i>
Td.	<i>Tityus discrepans</i> ,
Ts.	<i>Tityus serrulatus</i>
Tt.	<i>Tityus trivittatus</i>
U	Unidade enzimática
V	Voltz
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µm	Micrometro
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1. Escorpiões .....	15
2.2. Escorpionismo .....	18
2.3. Toxinas da Peçonha .....	21
2.3.1. Peptídeos .....	22
2.3.2. Enzimas .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1. Objetivos Geral .....	27
3.2. Objetivos Específicos .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1. Obtenção e Preparo da Peçonha .....	28
4.2. Dosagem de Proteínas .....	28
4.3. Eletroforese .....	28
4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	29
4.5. Ensaio Proteolítico .....	29
4.6. Ensaio Amilolítica .....	30
4.7. Ensaio Fosfolipásica .....	30
4.8. Ensaio Sobre Enzimas de Membrana (ATPases) .....	31
4.9. Ensaio de Citotoxicidade .....	31
4.10. Análise Estatística .....	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1. Perfil proteico .....	33
5.1.1. Perfil Eletroforético .....	33
5.1.2. Perfil Cromatográfico .....	35
5.2. Atividades Proteolítica .....	38
5.3. Atividade Fosfolipásica .....	39
5.4. Atividade Amilásica .....	40
5.5. Atividade Sobre Enzimas de Membrana (ATPases) .....	41
5.6. Citotoxicidade .....	43
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões são animais ancestrais, que por serem peçonhentos, despertam interesse devido a ocorrência de acidentes com envenenamento em humanos (BRAZIL; PORTO, 2010). Já foram identificadas cerca de 2700 espécies de escorpiões, apresentando ampla distribuição geográfica, concentrando-se em áreas tropicais e subtropicais, sendo o Brasil um dos países com maior diversidade de espécies (CARVALHO et al., 2017; REIN, 2022).

Apesar da toxicidade e da grande quantidade de acidentes, as espécies que causam acidentes de importância à saúde representam cerca de 25% do escorpiões já descritos (QUINTERO-HERNÁNDEZA et al., 2013). No Brasil, existem cerca de 160 espécies de escorpiões, os de maior relevância, devido ao número de acidente e a gravidade que causam nas vítimas, são da família Buthidae, pertencentes ao gênero *Tityus* (BRASIL, 2009). As espécies de maior importância médica são *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo), *Tityus bahiensis* (escorpião-marrom), *Tityus stigmurus* (escorpião-amarelo-do-nordeste) e *Tityus obscurus* (escorpião-preto-amazônico) (ARAÚJO et al., 2017; TORREZ et al., 2019). Há também espécies brasileiras que devido sua semelhança morfológica com outras mais conhecidas, podem ser subnotificadas e mal identificadas, como é o caso do *Tityus confluens* que tem grande semelhança morfológica com *T. serrulatus* (escorpião-amarelo).

Os acidentes com escorpiões são considerados um problema de saúde pública em vários países devido à alta incidência e a capacidade de algumas espécies provocarem um quadro clínico grave, podendo levar ao óbito (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008). No Brasil, é expressivo o aumento de números de casos de acidentes por picada por escorpião, tendo sido registrado um aumento de 8% do ano de 2018 para 2019. Embora devido a subnotificação durante os dois primeiros anos da pandemia de COVID-19, houve um declínio nos números de casos registrados que diminuíram para 162 mil e 159 mil, esta diminuição não foi observada no estado de Mato Grosso do Sul, apresentando um aumento de 35% do número de notificações no ano de 2020 em relação ao ano de 2019, passando de 2519 casos em 2019 para 2895 registros em 2020(SINAN, 2022).

Além do interesse para a saúde pública, o estudo com escorpiões cresce no que diz respeito ao potencial farmacológico e biotecnológico das moléculas de suas peçonhas e hemolinfas. As peçonhas apresentam grande complexidade, sendo identificados diversos componentes, como lipídios, nucleotídeos, mucoproteínas, enzimas, amins biogênicas, compostos heterocíclicos, sais inorgânicos, aminoácidos livres e a classe mais abundante, os peptídeos (ORTIZ et al., 2015).

A diversidade das peçonhas não se restringe apenas nas diversas classes de moléculas, mas também por apresentar variações entre as espécies. Destacam-se os peptídeos que possuem diversos alvos biológicos, como por exemplo, tem-se a stigmurina, peptídeo isolado da peçonha de *T. stigmurus*, que apresenta atividades antimicrobianas e antiproliferativas (DE MELO et al., 2015; PARENTE et al., 2018), e a serrulina, um AMP (peptídeos antimicrobiano) que apresentou ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, identificado na hemolinfa de *T. serrulatus* (*T.s.*) (DE JESUS OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA JUNIOR, 2019).

Outras moléculas da peçonha são as enzimas, como a hialuronidase (51 kDa) encontrada na peçonha de *T. serrulatus* que atua como um fator de espalhamento, visto que foi observada alteração dos níveis séricos de TsTX-I, após a injeção de TsTX-I na presença ou ausência dessa hialuronidase (PESSINI et al., 2001). As metaloproteínas também são amplamente encontradas nas peçonhas escorpiônicas, como a Antarease, uma Zn-metaloprotease identificada em diversas espécies da família Buthidae e associada com casos de pancreatite aguda em acidentes com escorpiões (ORTIZ et al., 2014).

A identificação dos componentes das peçonhas de escorpiões do cerrado sul mato-grossense ainda é pouca estudada e, desta forma, faz-se necessário conhecer a composição das peçonhas e caracterização bioquímica e biológica, visando explorar o potencial biotecnológico da espécie *T. confluens*.

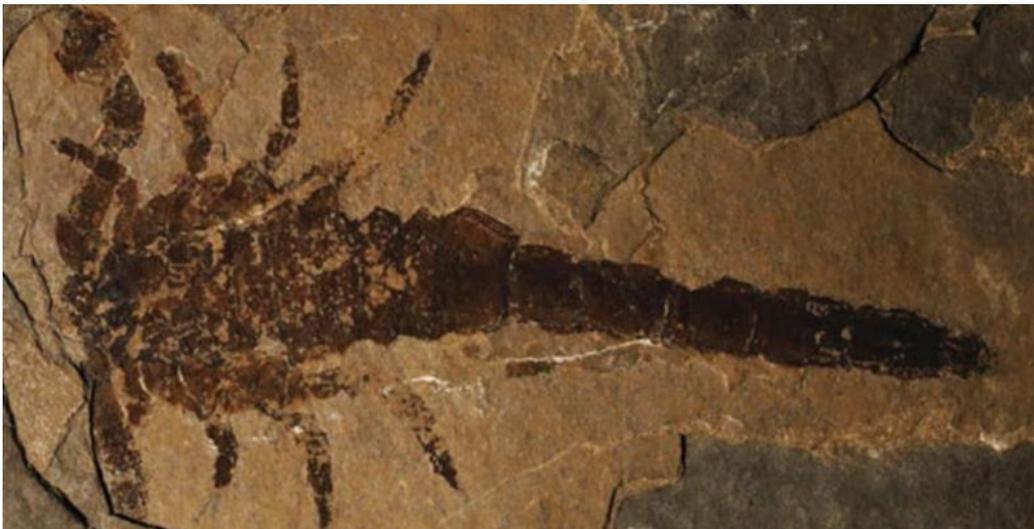
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ESCORPIÕES

Os escorpiões são artrópodes quelicerados que pertencem a classe dos aracnídeos (Arthropoda, Chelicerata, Arachnida, Scorpiones). São animais de hábitos noturnos, abrigando-se durante o dia, e habitam os mais diversos locais, como florestas, cerrados, desertos, campos e regiões urbanizadas (MARCUSI; ARANTES; SOARES, 2011). Scorpiones apresentam ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada praticamente em todos os ecossistemas terrestres, não ocorrendo apenas nas regiões polares, e com maior concentração em áreas tropicais e subtropicais (BLANCO; MELO, 2014; BRAZIL; PORTO, 2010). Apesar de sua ampla distribuição, os escorpiões representam uma pequena porcentagem (1,5%) dos aracnídeos já identificados, sendo cerca de 2710 espécies descritas em 163 gêneros e 18 famílias (PORTO et al, 2014; CARVALHO et al., 2017; REIN, 2022).

Os escorpiões são considerados os artrópodes mais antigos, datando do período Siluriano (443-438 milhões de anos) e, atualmente, são encontrados somente no ambiente terrestre. Entretanto, há suposições de que surgiram no ambiente aquático, uma vez que existem evidências fósseis procedentes do solo marinho do período Siluriano (Figura 1) (WADDINGTON; RUDKIN; DUNLOP, 2015). Apesar de indicar um animal aquático, o fóssil da espécie *Eramoscorpius brucensis* apresentava membros com o potencial de locomoção terrestre, com pernas anatomicamente modernas, demonstrando como esse táxon sofreu poucas alterações morfológicas externas ao longo dos anos (BRAZIL; PORTO, 2010; PORTO et al, 2014; LOURENÇO, 2018).

**Figura 1** - *Eramoscorpius brucensis*, escorpião fóssil aquático.



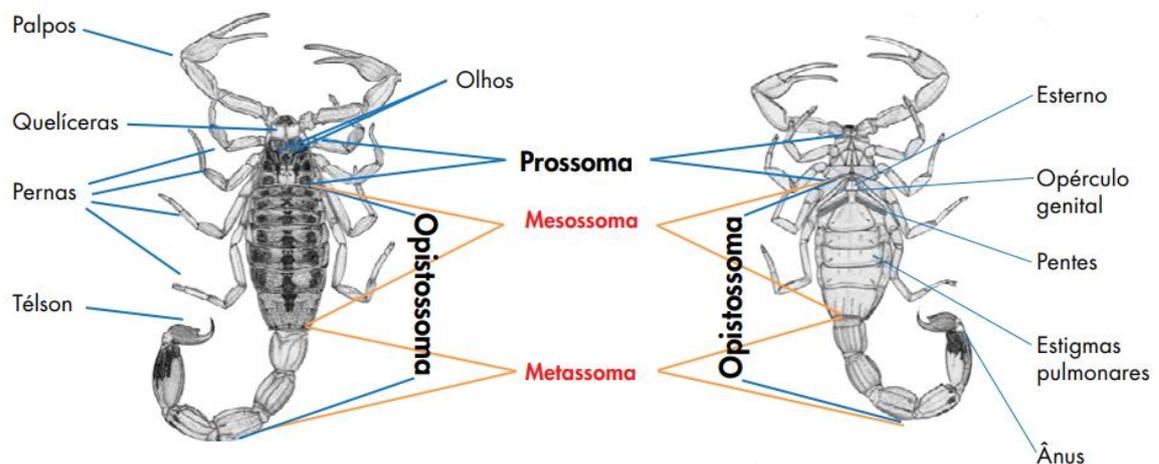
**Fonte:** WADDINGTON; RUDKIN; DUNLOP, 2015.

Como todos os artrópodes, os escorpiões possuem um exoesqueleto de quitina revestindo seu corpo e, seu crescimento é por ecdise (muda). Como membro do subfilo Chelicerata e classe Arachnida, apresentam quatro pares de patas torácicas e um par de pedipalpos, sem a presença de antenas. Seu corpo é dividido em duas partes, o prossoma (cefalotórax) e o opistossoma (abdômen), esta segunda parte por sua vez é dividida em mesossoma e metassoma (Figura 2) (STOCKMANN, 2015).

No prossoma localizam-se os seis pares de apêndices, sendo: um par as quelíceras, órgãos pré-buciais utilizados para triturar os alimentos; os pedipalpos terminados em quelas usadas para manusear suas presas; e, quatro pares de apêndices locomotores. Os escorpiões também apresentam na parte dorsal um par de olhos medianos e laterais menores, dependendo da espécie podem chegar a ter seis pares de olhos (STOCKMANN, 2015; MARCUSSI, ARANTES E SOARES, 2011).

No opistossoma, sete tergitos (placas dorsais) formam a parte dorsal do mesossoma, sendo unidos por tecidos flexíveis denominados membranas (pleuras) intersegmentares. Na face ventral, apresenta dois opérculos genitais fundidos, aberturas respiratórias (espiráculos) distribuídas em pares nos quatro primeiros tergitos ventrais, além de um par de pectíneas (pentes), órgãos sensitivos presentes apenas em escorpiões. O metassoma é a região comumente conhecida como cauda, formado por cinco tergitos arredondados sem membranas pleurais interligando-os. Na extremidade do metassoma está o télson, estrutura onde está localizada o par de glândulas de peçonha, que termina no aguilhão ou acúleo, semelhante a uma agulha oca, por onde a peçonha é expelida. A abertura anal se localiza entre o último tergito e o télson (STOCKMANN, 2015).

**Figura 2** - Desenho esquemático da morfologia externa do corpo de um escorpião, face dorsal (à esquerda) e ventral (à direita).



Fonte: (CANDIDO; FAN, 2019).

Devido a sua capacidade de produzir e inocular peçonha, aliada a presença de órgãos sensoriais eficazes e fortes pedipalpos, os escorpiões se tornam um exímio predador, principalmente de outros artrópodes, como insetos e outros aracnídeos, podendo ocorrer também canibalismo. Entretanto, não são animais agressivos, tornam-se perigosos ao ser humano quando pressionados, conseguindo apoio para inocular a peçonha, constituindo um reflexo de defesa (STOCKMANN, 2015; MARCUSSI, ARANTES E SOARES, 2011).

O Brasil é um dos países com maior diversidade de escorpiões, com 131 espécies distribuídas em 23 gêneros e 4 famílias. No estado do Mato Grosso do Sul, foram registradas 16 espécies e uma subespécie, distribuídos em 5 gêneros e 2 famílias. Bothriuridae é representada por quatro espécies, e Buthidae representada por 12 espécies e uma subespécie (CARVALHO et al., 2017).

Buthidae é a família de escorpiões mais distribuída pelo mundo, sendo *Tityus* o gênero mais abundante no Brasil e de igual forma no estado do Mato Grosso do Sul. Entre as 12 espécies encontradas no estado, 10 são pertencentes ao gênero *Tityus* C. L. Koch: *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. paraguayensis*, *T. mattogrossensis*, *T. lutzii*, *T. costatus*, *T. indecisus*, *T. trivittatus*, *T. confluens* e a subespécie *T. confluens bodoquena* (PORTO et al, 2014; CARVALHO et al., 2017)

*T. confluens* é típico da escorpiofauna do Chaco, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Paraguai e no Brasil, sendo no último apenas encontrado nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Inicialmente foi descrito por Borelli (1899) como uma subespécie de *T. trivittatus*. Posteriormente, Maury (1974) publicou um estudo mais completo, concluindo que *T. confluens* era uma espécie distinta de *T. trivittatus* e tal decisão foi corroborada por Lourenço em 1980 através de características morfológicas que distinguiam *T. confluens* das demais subespécies de *T. trivittatus*. De fato, verificou-se a ausência de ornamentos pretos no prossoma, faixas ornamentais longitudinais nos tergitos de I a VI do mesossoma ou pedipalpos providos de manchas escuras (Figura 3) (LOURENÇO; CABRAL; BRUEHMUELLER RAMOS, 2004).

**Figura 3** - *Tityus trivittatus* (esquerda) e *Tityus confluens* (direita).



**Fonte:** (DE ROODT et al., 2014)

*T. confluens* (Figura 4) é um escorpião de tamanho mediano em relação às outras espécies da família, variando de 50-60 mm de comprimento total, com coloração geral em tons de amarelo e marrom, porém, diferenças na coloração foram observadas entre populações dos diferentes países em que está distribuído (BRASIL, 2009; SEITER, 2012).

**Figura 4:** *Tityus confluens*.



**Foto:** Acervo pessoal.

## 2.2. ESCORPIONISMO

Apesar de todo escorpião apresentar glândulas produtoras de peçonha e possuir a capacidade de inocular sua peçonha, menos de 50 espécies no mundo provocam acidentes graves ou que necessitem de intervenção médica e cerca de 95% desses escorpiões pertencem à família Buthidae, as exceções são algumas espécies de duas outras famílias, Hemiscorpiidae e Scorpionidae. No Brasil, os escorpiões de importância médica pertencem exclusivamente ao gênero *Tityus* (BRASIL et al., 2009; CARVALHO et al., 2017; LOURENÇO, 2018).

Os acidentes com animais peçonhentos se tornaram um relevante problema de saúde pública devido a incidência de casos nos últimos anos, sendo incluído na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública por meio da portaria nº 264 de 17 de fevereiro de 2020 (BRASIL, 2020; DIAS et al., 2020).

O alto nível de plasticidade ecológica e a irregularidade nos padrões de distribuição do gênero *Tityus* são fatores que influenciaram no aumento do número de acidentes, pois encontram condições favoráveis em ambientes modificados pela ação humana, podendo encontrar abrigo e alimentos nas residências (CARDOSO et al., 2009). A maior ocorrência de escorpionismo é na zona urbana, sendo aproximadamente 70% dos casos no intra ou peridomicílio, com uma disposição sazonal nos estados das regiões Sul e Sudeste nos meses quentes e chuvosos, e de forma quase uniforme durante o ano nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste (BRASIL, 2009).

Anualmente, cerca de 1,5 milhão de acidentes e aproximadamente 2.600 óbitos são registrados por acidentes com escorpiões no mundo (CARMO et al., 2019). No Brasil, em relação a acidentes com escorpiões, o Ministério da Saúde vem registrando um aumento no número de casos. Em 2018, o número de notificações foi de 158 mil casos em todo o país, já no ano de 2019 esse número aumentou para 170 mil caso, um aumento de 8%. Nos anos seguintes (2020-2021), os números casos notificados diminuíram para 162 mil e 159 mil, respectivamente, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Esta diminuição nos últimos dois anos pode estar intimamente ligada a pandemia de COVID-19, uma vez que era recomendação do Ministério da Saúde evitar unidades básicas de saúde e hospitais em casos não urgentes, a fim de evitar a exposição ao vírus.

Em relação a região do Centro-Oeste, em 2018 foram notificados 8.279 acidentes com escorpiões, sendo 25% (2.134) registrados no estado do Mato Grosso do Sul, colocando-o como o segundo estado com maior número de acidentes, ficando atrás apenas de Goiás. Entretanto, diferente do observado nacionalmente, os números de acidentes foram crescentes nos anos de 2020 e 2021, com 2.895 casos em 2020, um aumento de 35% em relação a 2019 (Tabela 1) (SINAN, 2022).

O surgimento da sintomatologia geralmente é rápido em virtude da presença de toxinas de baixa massa molecular, chamados também por neurotoxinas, presentes na peçonha dos escorpiões. A maioria dos envenenamentos por escorpião apresenta como principal manifestação clínica a dor intensa localizada, podendo ser acompanhada de edema e eritema discretos, sem risco de morte. Eventualmente, casos mais graves, principalmente em crianças e idosos, causam um quadro sistêmico, podendo sobrevir tremores, náuseas, vômitos, distúrbios neurológicos, cardiovasculares, respiratórios e até a morte (RIBEIRO; RODRIGUES; JORGE, 2001; BRASIL, 2010). Apesar da baixa taxa de letalidade, cerca de 0,58% de mortalidade de pessoas hospitalizadas, os acidentes escorpiônicos são preocupantes, principalmente para as crianças onde a gravidade é significativamente maior e a taxa de mortalidade é de até dez vezes

maior que em adultos (MARCUSSE, ARANTES E SOARES, 2011; DIAS, 2020; CHIPPAUX, 2012).

**Tabela 1** - Número de casos notificados de escorpionismos nos últimos 15 anos em nível nacional, regional e estadual.

<b>Ano</b>	<b>Brasil</b>	<b>Centro-oeste</b>	<b>Mato Grosso do Sul</b>
<b>2021</b>	149.134	9.911	2.510
<b>2020</b>	157.029	10.398	2.895
<b>2019</b>	167.112	10.190	2.519
<b>2018</b>	157.278	8.279	2.134
<b>2017</b>	124.142	6.308	1.599
<b>2016</b>	91.009	4.592	1.008
<b>2015</b>	85.908	3.983	1.099
<b>2014</b>	86.584	4.249	1.086
<b>2013</b>	77.920	3.703	876
<b>2012</b>	63.732	3.593	1.067
<b>2011</b>	59.036	2.424	682
<b>2010</b>	51.469	2.116	394
<b>2009</b>	50.111	1.961	330
<b>2008</b>	40.086	1.482	283
<b>2007</b>	37.186	1.121	115

**Fonte:** DATASUS – Ministério da Saúde, 2022.

O nível clínico apresentado em cada caso é variável, e diversos fatores influenciam, tais como: idade do paciente, o tempo entre a picada e o início do tratamento, a quantidade de peçonha inoculada e a espécie e tamanho do escorpião. Em relação ao quadro clínico dos acidentes escorpiônicos, são classificados em grau leve, moderado e grave, sendo que o quadro pode evoluir de nível (Tabela 2) (ARAÚJO et al., 2017; CARMO et al., 2019; CHIPPAUX, 2012). Em quadros leves, o tratamento é da sintomatologia, que consiste no alívio da dor com administração local de anestésico sem vasoconstritor (Lidocaína a 2%) ou analgésicos sistêmicos, como dipirona na dose de 10 mg/kg a cada seis horas (FUNASA, 2001; BRASIL, 2009; FERREIRA; SOUZA ROCHA, 2019). Nos casos moderados e graves, o Ministério da Saúde padroniza um protocolo de tratamento soroterápico, sendo administrado o soro antiescorpiônico (SAEE) ou soro antiaracnídeo polivalente na forma de 2 a 3 ampolas para casos moderados e 4 a 6 para acidentes graves. A aplicação é via intravenosa e o paciente deve

permanecer na unidade de tratamento para o monitoramento das funções vitais (BRASIL, 2009; SILVA; DE MORAES; SANTOS, 2020)

**Tabela 2** - Nível de gravidade, manifestações clínicas e tratamento soroterápico de acidentes com escorpião.

Nível	Manifestações Clínicas	Soroterapia (SAEEs ou SAAR)
Leve	Dor e parestesia locais	-
Moderado	Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, como náuseas, vômitos, sudorese, sialorreias, agitação, taquipneia e taquicardia.	2 a 3 ampolas
Grave	Sintomas do nível moderado acrescido de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorreia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque.	4 a 6 ampolas

**Fonte:** Modificado de Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (FUNASA, 2001).

O SAEE é um soro heterólogo e hiperimune, contendo fração F(ab')<sub>2</sub> de imunoglobulinas purificadas do plasma de equinos hiperimunizados com peçonhas de *T. serrulatus* (MONTEIRO et al., 2019). Além do soro antiescorpiônico, por vezes é utilizado o soro antiaracnídico (SAAR) como intervenção terapêutica para casos graves, entretanto não apresenta especificidade, visto que é um soro polivalente contra aranhas (*Loxosceles e Phoneutria*) e escorpião do gênero *Tityus*, padronizados e produzidos pelos três laboratórios nacionais (Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil) e distribuído gratuitamente pelo Ministério da Saúde (HUI WEN et al., 2015; MONTEIRO et al., 2019). A administração do soro é segura, apresentando pouca frequência e gravidade de reações de hipersensibilidade (FUNASA, 2001; CANDIDO; FAN, 2019; FUNED, 2018).

### 2.3. TOXINAS DA PEÇONHA

Moléculas bioativas utilizadas na predação e/ou defesa estão presentes em uma ampla gama de filos, aprimorados por milhões de anos de evolução, sendo uma fonte para a bioprospecção de fármacos e outros produtos biotecnológicos (CHEN et al., 2018; COLE;

BREWER, 2019). As peçonhas e venenos, são misturas complexas ricas em proteínas, enzimas, peptídeos, e componentes que atuam em diversos alvos biológicos, como canais iônicos, receptores acoplados à proteína G, neurotransmissores, transportadores e enzimas, tornando-os fontes para novas ferramentas farmacológica. Entretanto devido ao grande número de espécies, uma enorme diversidade bioquímica destas toxinas ainda permanece inexplorada (BORDON et al., 2020; CHEN et al., 2018; COLE; BREWER, 2019).

A diferença entre ‘veneno’ e ‘peçonha’, está no método de entrega, ou seja, na forma que essas toxinas são recebidas por outro organismo. Os venenos podem ser sintetizados ou adquiridos pela dieta, causam toxicidade por ingestão ou contato. Por outro lado, as peçonhas são produzidas por um tecido ou órgão específico e inoculado por um aparato especializado (BORDON et al., 2020; DUTRA, 2020).

Essa complexidade e fonte de substâncias biologicamente ativas torna o estudo das peçonhas uma ferramenta importante no desenvolvimento biotecnológico e farmacológico. Como exemplos temos os fármacos Captopril<sup>®</sup> e o Batroxobin<sup>®</sup>, ambos procedentes de peçonhas ofídicas. O Captopril<sup>®</sup> é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) utilizado no tratamento de hipertensão, foi o primeiro medicamento comercializado derivado de um peptídeo isolado da peçonha de *Bothrops jararaca*. O Batroxobin<sup>®</sup>, é uma hemocoagulase, uma enzima *trombin-like* isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, utilizado no tratamento e prevenção de hemorragias (SANTOS et al., 2017)

A peçonha escorpiônica é uma mistura de origem apócrina, complexa e heterogênea de moléculas bioativas tais como uma série de sais inorgânicos, aminoácidos livres, nucleotídeos, lipídeos, amins, compostos heterocíclicos, mucoproteínas, peptídeos, enzimas outras substâncias ainda desconhecidas (AHMADI et al., 2020; CHEN et al., 2018; QUINTERO-HERNÁNDEZA et al., 2013). A composição varia entre as diferentes espécies de escorpiões e até mesmo entre uma mesma espécie de regiões distintas. A quantidade de diferentes componentes conhecidos na peçonha varia de 72 (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*) a mais de 600 (*Mesobuthus tumulus e Tityus serrulatus*), sendo os peptídeos os componentes mais estudados, devido a sua diversidade, propriedades farmacológicas e à sua importância clínica como neurotoxinas (ORTIZ et al., 2015; QUINTERO-HERNÁNDEZA et al., 2013).

### 2.3.1. PEPTÍDEOS

Os peptídeos encontrados nas peçonhas de escorpiões podem ser classificados por diversos critérios, como tamanho da cadeia proteica, mecanismo de ação, especificidade e mais comumente por apresentar ou não ligações dissulfeto. Os peptídeos com ligação de dissulfeto

(DBPs), conhecidos como peptídeos neurotóxicos, são os responsáveis pelos efeitos neurotóxicos nos acidentes escorpiônicos e têm como alvo os canais iônicos de membranas celulares do sistema neural. Estas moléculas são protótipos consideráveis para o tratamento de doenças, especialmente as que afetam o sistema neuronal (AHMADI et al., 2020; DA MATA et al., 2017).

Os DBPs podem ser classificados de acordo com os canais iônicos específicos sobre os quais atuam. Os DBPs que interagem com os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) são considerados os mais importantes no ponto de vista médico, são polipeptídeos de 61 a 76 resíduos de aminoácidos, com sua estrutura sendo fortemente ligada por quatro ligações de dissulfeto, podem ser divididos quanto seu efeito no controle do canal ou suas propriedades de ligação, os alfa-toxinas ( $\alpha$ -NaScTx), exemplo são as Aah2, Aah1 e Aah3 de *Androctonus australis*, interagem com a superfície extracelular, se ligando ao sítio receptor 3 do canal e inibem o rápido processo de inativação; e as beta-toxinas ( $\beta$ -NaScTx), por exemplo, a Cn2 de *Centruroides noxius* e Css4 de *Centruroides suffusus suffusus*, que se ligam ao receptor 4 e mudam o limiar da ativação do canal para potenciais de membrana mais negativos (HOUSLEY et al., 2017; QUINTERO-HERNÁNDEZA et al., 2013).

Os peptídeos moduladores de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) podem ser calcinas que atuam como agonistas dos receptores de rianodina (RyRs) induzindo um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular sarcoplasmático, provocando paralisia contrátil, ou também distinto de RyRs, como a CPP-Ts, peptídeo identificado por análise do transcriptoma de *T. serrulatus*, o possui 45 aminoácidos, que ativa a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio dos receptores nucleares (AHMADI et al., 2020; OLIVEIRA-MENDES et al., 2018; QUINTERO-HERNÁNDEZA et al., 2013).

Os peptídeos moduladores de canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) podem interferir em funções fisiológicas como modulação de atividade neural, liberação de neurotransmissores e secreção hormonal. Como exemplo tem-se o Ts19 isolado de *Tityus serrulatus*, possui 49 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e foi classificado como membro da família dos  $\beta$ -KTx, (CERNI et al., 2016).

As toxinas moduladoras de canais de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) são peptídeos pequenos, com 30-40 resíduos de aminoácidos, formando quatro ligações dissulfeto e com um motivo  $\text{Cs}\alpha\beta$ , estas toxinas possuem semelhanças estruturais com toxinas da família  $\alpha$ -KTx que modulam canal de potássio (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015). O primeiro peptídeo foi identificado na peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, denominado clorotoxina (DEBIN; STRICHARTZ, 1991). Outras clorotoxinas foram identificadas, exemplo, o BS-TX7, isolado e

sintetizado a partir da peçonha do escorpião *Buthus indicus*, com 35 resíduos de aminoácidos (ALI et al., 2016).

Os NDBPs (peptídeos sem ligações dissulfeto) são pequenos peptídeos que possuem de 13 a 56 aminoácidos com sequências heterogêneas, geralmente são moléculas catiônicas com uma significativa flexibilidade estrutural. Diferentemente dos DBPs não expressam uma relação estrutura-função conservada e nem possuem um alvo molecular específico conhecido. Esta característica possibilita amplos alvos biológicos e, além disso, já foram descritas várias atividades para os NDBPs, como antibacterianas, antifúngicas, citolíticas, antivirais, antimaláricas, antitumoral e imunomoduladoras, podendo ser considerados AMPs (peptídeos antimicrobianos) e sendo consideráveis como candidatos para drogas terapêuticas (AHMADI et al., 2020; ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; ORTIZ et al., 2015).

Apesar de ainda não está claro o papel dos AMPs nas peçonhas, essas moléculas vêm despertando o interesse de vários pesquisadores. O primeiro NDBP antibacteriano identificado foi a hadrunina (isolada do escorpião *Hadrurus gertschi*), que também demonstrou ação hemolítica para eritrócitos humanos. Essa dualidade está presente em quase todos os AMPs identificados em escorpiões, porém, técnicas de engenharia de proteínas vêm sendo usadas para melhorar a potência antimicrobiana e até mesmo pra projetar antibióticos mais específicos, como é o caso dos peptídeos análogos. Além disso, foi demonstrado que o sinergismo de AMPs e antibióticos clássicos promove um efeito na inibição do crescimento de bactérias resistentes (AHMADI et al., 2020; ORTIZ et al., 2015). O conhecimento de novos AMPs de fontes naturais é relevante para a saúde pública, uma vez que essas moléculas demonstram potencial farmacológico, podendo ser uma alternativa aos antibióticos convencionais (DE JESUS OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA JUNIOR, 2019).

Algumas pequenas moléculas não peptídicas foram identificadas na peçonha de escorpiões, como um alcalóide descrito de *Megacormus gertschi*, dois derivados de 1,4-benzoquinona de *Diplocentrus melici*, adenosina de *Heterometrus laoticus* e ácido cítrico de *Centruroides sculpturatus* (EVANS et al., 2020). Embora ainda existam lacunas no conhecimento em seus efeitos, sabe-se que tais moléculas potencializam a toxicidade ou a eficácia da peçonha e podem ter ação de manutenção e produção de toxinas dentro da glândula.

### 2.3.2. ENZIMAS

Como mencionado anteriormente, a peçonha possui uma composição complexa e apesar dos peptídeos serem os componentes mais estudados e majoritários, vêm sendo identificadas e caracterizadas enzimas em diferentes espécies de escorpiões, como fosfolipases,

hialuronidases, metaloproteinasas, serino proteases, cisteíno proteases e L-aminoácido oxidases (CHEN et al., 2018).

As fosfolipases (PLA) são enzimas que catalisam a clivagem de fosfolipídios, componentes das membranas biológicas, à vista disto, são conhecidas por suas propriedades hemolíticas e também podem causar hemorragias e necrose tecidual. As PLA foram identificadas em espécies como *Opisthacanthus cayaporum* e *Heterometrus laoticus* (AHMADI et al., 2020). Em acidentes escorpiônicos ainda não se conhece totalmente os efeitos causados ou potencializados pelas fosfolipases, entretanto, sabe-se que podem estar envolvidas em efeitos cardiotoxícos, miotóxicos, inflamatórios, dentre outros (KRAYEM; GARGOURI, 2020).

As hialuronidases foram identificadas em escorpiões de famílias como Buthidae, Bothriuridae e Urodacidae. Essa classe de enzimas tem como substrato o ácido hialurônico, componente importante da matriz extracelular. Logo, sabe-se que as hialuronidases potencializam a toxicidade da peçonha, rompendo a integridade da matriz e tecidos conjuntivos ao redor da picada, possibilitando uma maior difusão sistêmica das toxinas (AHMADI et al., 2020; VIANNA; GOULART; DUARTE, 2021).

Enzimas proteolíticas, como metalo-, serino- e cisteínoproteases hidrolisam ligações peptídicas, estão presente em diversas peçonhas e considera-se que estas proteases desempenhem parte fundamental na ativação de precursores de toxinas através de modificações pós-traducionais (AHMADI et al., 2020).

As metaloproteases necessitam de um cofator metálico que auxilie a sua atividade de clivagem, geralmente um átomo de zinco. Em estudos de proteases de escorpião com mecanismo de ação patogênico, uma Zn-metaloprotease chamada antarease foi purificada do escorpião *T. serrulatus*. Além disso, as sequências de cDNA que codificam Zn-metaloproteases foram amplificadas em diversas espécies de Buthidae (ORTIZ et al., 2014).

As serinoproteases possuem um resíduo de serina central em sua estrutura que atua como sítio catalítico de clivagem, dando nome a essa classe de enzimas. Exemplo dessa protease em peçonha de escorpião é a identificada em *Tityus discrepans*, apresentando atividade fibrinogenolítica (BRAZÓN et al., 2014). As cisteínoproteases apresentam cisteína em seu sítio catalítico, e já foram relatadas em escorpiões de dois gêneros, *T. bahiensis*, *T. serrulatus*, *T. obscurus* e *Hadrurus. spadix* (CID-URIBE et al., 2020).

As L-aminoácido oxidases (LAAO) são flavoenzimas, geralmente glicoproteínas homodímeras com massa molar ente 110-150 kDa, catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos, formando  $\alpha$ -cetoácido correspondente, amônia e peróxido de hidrogênio e são

amplamente encontradas nas peçonhas de serpente (ZHANG et al., 2004). Entretanto, a presença e a função de LAAO em peçonhas escorpiônicas ainda não estão bem elucidadas. A peçonha de *Rhopalurus agamemnon* apresentou esta atividade e apresentou homologia com a sequência com a LAAO da serpente *Daboia russelii* (MAGALHÃES et al., 2021).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar atividades bioquímicas e biológicas da peçonha do escorpião *Tityus confluens*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o perfil eletroforético da peçonha de *T. confluens*.
- Obter o perfil cromatográfico dos componentes presentes na peçonha de *T. confluens*.
- Investigar a presença das atividades protease, amilase e fosfolipase A<sub>2</sub> na peçonha de *T. confluens*.
- Avaliar o efeito da peçonha de *T. confluens* sobre ATPase de membrana.
- Avaliar a atividade citotóxica da peçonha de *T. confluens* sobre a viabilidade celular de células tumorais.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA PEÇONHA**

A peçonha dos escorpiões *Tityus confluens* foi fornecida pelo grupo de pesquisa da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) sob a supervisão do Prof<sup>o</sup>. Dr. Ludovico Migliolo. Os espécimes foram coletados de forma ativa no período noturno com auxílio de lanternas de LED-UV 395 nm na cidade universitária da Universidade Federal de Mato Grosso Sul em Campo Grande.

A extração da peçonha foi feita no laboratório de Bioquímica e Purificação de Compostos Bioativos da UCDB, através de estímulo elétrico (15V) aplicado no télson dos escorpiões, previamente molhados com solução salina 0,9%. Após a extração, a peçonha foi mantida a -20° C e enviada para o Laboratório de Bioquímica Geral e Microorganismos da UFMS, onde a peçonha foi centrifugada a  $10.500 \times g$  por 10 minutos a 4° para retirada de materiais insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e liofilizado a -50 °C e 30 mBar e armazenado a -20 °C (BORGES et al., 2004; FERREIRA et al., 2016).

### **4.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

O sobrenadante liofilizado foi ressuspendido em água destilada e o conteúdo proteico quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina bovina como padrão, em uma leitora de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devises<sup>®</sup>) a 595 nm. Posteriormente, a concentração das amostras foi ajustada a 1 mg/mL para utilização nos ensaios.

### **4.3. ELETROFORESE**

O perfil proteico foi obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS), sendo a concentração do gel de corrida 15% e o gel de empilhamento 5%. Para a preparação dos géis foram utilizadas as seguintes soluções: acrilamida 30% (bis-acrilamida/acrilamida), Tris-HCl (gel 15%: 3 M pH 8,9; gel 5%: 1,5 M pH 6,8), SDS 1%, tetrametiletlenodiamina (TEMED) 0,2%, persulfato de amônia 10% e água destilada (LAEMMLI, 1970). O tampão de corrida continha Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, com pH 8,3. As amostras foram preparadas em condições redutoras, com 25 µg de peçonha, 25 µL de SDS 10%, 4 µL de azul de bromofenol e 2 µL de β-mercaptoetanol. A eletroforese foi conduzida por 2 horas e 30 minutos a 100 V, em seguida o gel foi corado por 30 minutos em uma solução de azul brilhante de Coomassie R-250 (Coomassie 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%) e descorado em uma solução de ácido

acético 10%; etanol 30%, para revelação das bandas. A massa molecular das várias proteínas da peçonha foi estimada pela migração relativa das bandas obtidas com um marcador de massa molecular (Precision Plus Protein Standards – BioRad®).

Foi realizada também uma eletroforese com tricina para a detecção de proteínas de menor massa molecular, com as seguintes condições; um gel de empilhamento 5% e de corrida 16,5%, feitos com acrilamida 49,5% (bis-acrilamida/acrilamida), Tris 2 M pH 8,45, SDS 0,3%, glicerol, tetrametiletenodiamina (TEMED) 0,1%, persulfato de amônia 20% e água destilada, como descrito por (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). Foi preparado um tampão ânodo pH 8,9 (Tris 0,2 M) e um tampão cátodo pH 8,25 (Tris 0,1 M; Tricina 0,1 M; SDS 0,1%). A corrida eletroforética foi realizada por 5 horas a 85 V. As mesmas condições já descritas foram realizadas para as amostras, coloração e descoloração.

#### **4.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DA PEÇONHA**

Para realização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa, foi utilizado um equipamento modelo UltiMate 3000 XRS (Thermo Scientific®) com sistema de injeção automático e uma coluna analítica C18 Symmetry (6 x 75 mm e 3,5 µm). Duas soluções de trabalho foram preparadas, sendo a solução A composta de ácido trifluoroacético 0,1% e a solução B uma mistura de 90% acetonitrila e 10% solução A.

Um total de 3 mg de peçonha liofilizada foi solubilizada em 2 ml de solução A. 300 µL foi depositado em um tubo apropriado e colocado na bandeja de injeção. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 1 mL por minuto e acompanhada a 216 nm, iniciando com 5% de solução B por 5 minutos, seguido de um gradiente de 5% a 95% de solução B em 50 minutos, posteriormente permaneceu em 95% de solução B por mais 5 minutos e por fim mais 5 minutos de 5% de solução B, totalizando 60 minutos de corrida cromatográfica. Este ensaio foi realizado com a supervisão do Dr. Breno Emanuel Farias Frihling, no Laboratório de Bioquímica e Purificação de Compostos Bioativos - Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

#### **4.5. ENSAIO PROTEOLÍTICO**

A atividade proteolítica foi avaliada por meio de zimografia utilizando gelatina e caseína como substratos.

Foram utilizados gel de empilhamento 5% e de separação 12% foi preparado com acrilamida 30% (bis-acrilamida/acrilamida), Tris-HCl (gel 12%: 1,5 M pH 8,9; gel 5%: 1,5 M pH 6,8), SDS 1%, tetrametiletenodiamina (TEMED), persulfato de amônia 10% e água destilada (LAEMMLI, 1970), com a adição de 0,25 mg/ml de gelatina ou caseína ao gel de

separação, e realizada com amostras em condições não redutoras, sem adição de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Após a eletroforese, o gel foi lavado por uma hora em solução de Triton X-100 1% e posteriormente incubado a 37°C por 24 horas em um tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), contendo CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Após incubação o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 e descorado em uma solução descorante, para observação das bandas de degradação (DÍAZ et al., 2019)

#### **4.6. ENSAIO AMILOLÍTICO**

A determinação da atividade amilolítica foi realizada segundo (MILLER, 1959) com adaptações.

Para a atividade amilolítica, foi utilizado uma solução de amido solúvel (1% p/v) em tampão fosfato de sódio com NaCl 6,7mM, pH 6,9. A reação ocorre pela mistura da solução de amido 50 $\mu$ L e três concentrações de peçonha (1, 10 e 20  $\mu$ g). A mistura foi incubada a 25 °C por 5 ou 10 minutos, foi adicionado DNS (acidodinitrosalicílico) 100 $\mu$ L e fervida por 5 minutos. Após esfriamento, a mistura é lida em leitor de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devises®) a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade enzimática por mililitro (U/mL).

#### **4.7. ENSAIO FOSFOLIPÁSICO**

A atividade da fosfolipase foi avaliada em placas de Petri, utilizando a técnica da gema de ovo incorporada ao ágar (HABERMANN; HARDT, 1972). Para preparar o substrato, a gema foi separada da clara do ovo, peneirada e posteriormente diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a pH 7,2 na proporção 1: 3 (v / v).

O gel foi preparado contendo CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, 1% de ágar bacteriológico e 0,005% de azida de sódio, solubilizado em 30 ml de PBS, submetida ao microondas. Após a temperatura da solução diminuir para 50 °C foi adicionado 10 mL da gema de ovo, e distribuída em placa de Petri e, após a solidificação, foram feitos 5 orifícios de 5 mm de diâmetro no gel, para a aplicação das amostras. Foi aplicado 40  $\mu$ L de soluções contendo de 10, 25 e 50  $\mu$ g de peçonha, 40 uL de água destilada como controle.

Após a aplicação das amostras, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 20h. A formação de halos translúcidos ao redor dos poços corresponde a atividade fosfolipásica.

#### 4.8. ENSAIO SOBRE ENZIMA DE MEMBRANA (ATPases)

O efeito da peçonha sobre a atividade de enzimas de membrana, foi observado através da atividade de enzimas ATPase sobre o substrato sintético *p*-nitrofenil fosfato. Foram utilizados rins de ratos como fonte das enzimas de membrana, os homogenatos de rim foram doados pelo Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques (INBIO/UFMS). Estes foram preparados a partir da maceração dos tecidos com tampão de membrana pH 7,4 (imidazol 12,9 mM; EDTA 0,625 mM; sacarose 250 mM), em seguida foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 35 minutos a 4°C e o sobrenadante foi denominado como frações de membrana. Para os ensaios, as frações de membranas foram quantificadas e ajustadas a 1,25 mg/mL de proteínas pelo método de Bradford.

O meio reacional continha EDTA 1 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, *p*-nitrofenil fosfato 10 mM e Tris-HCl 30 mM (pH 7,4). Foi adicionado aos microtubos do ensaio: 1 mL do meio reacional, 1, 5, 10, 15 e 20 µg de peçonha e 40 µg de proteínas dos homogenatos de rins contendo enzima, imediatamente incubados por 50 minutos a 37°C. Os controles foram preparados sem adição de peçonha e o ensaio foi realizado em triplicata. Após o tempo de incubação, o conteúdo foi analisado em uma leitora de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devices®) em 410 nm. Os resultados foram expressos como nmol de *p*-nitrofenol liberado por minuto e miligrama de proteína (nmol/mim/mg).

#### 4.9. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi baseado no método colorimétrico sulforodamina B (SRB). SRB é um aminoxanteno rosa brilhante, que em condições fracamente ácidas, é capaz de se ligar a resíduos básicos de proteínas por meio de seus dois grupos sulfônicos, que permite quantificar indiretamente o número de células e a proliferação celular (SKEHAN et al., 1990).

Foram utilizadas três linhagens celulares, carcinoma de células renais, linhagem 786-O (RRID:CVCL\_1051), carcinoma de mama invasivo de nenhum tipo especial, linhagem MCF-7 (RRID:CVCL\_0031) e fibroblasto não tumoral, linhagem NIH/3T3 (RRID:CVCL\_0594). As células foram semeadas em placas de 96 poços (T0 – placas controle, e T1 – placa que foi incubada com as concentrações de peçonhas), usando  $5 \times 10^3$  células neoplásicas e não neoplásicas por poço, e foram incubadas por 24 h. Após incubação, a placa T0 foi lida em 540 nm em espectrofotômetro de microplacas, ao mesmo tempo em que as células da placa T1 foram expostas às quatro concentrações (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL) da peçonha, e reincubadas por mais 48 h.

Após 48 h, o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com ácido tricloroacético a 20% e coradas com SRB (0,4%, p:v dissolvido em ácido acético a 1%). O excesso de corante foi removido com ácido acético a 1%. Os corantes ligados a proteínas foram solubilizados com tampão Trizma Base (Sigma) a 10 mM, pH 10,5. O controle positivo foi o cloridrato de doxorrubicina (2 mg/mL) utilizado em concentração 10 vezes menor que as amostras testes. Os valores de IC<sub>50</sub> (50% de inibição de crescimento) foram calculados por análise de regressão não linear a partir das porcentagens de crescimento, usando o software Origin 6.0. Este ensaio foi realizado com a supervisão da Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo – Laboratório Culturas Celulares, FAFAN(UFMS).

#### **4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A significância dos dados foi determinada segundo análise de variância (ANOVA) para comparações de múltiplos grupos, seguido do pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.00, GraphPad, San Diego, CA, EUA, 2007), um valor de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo.

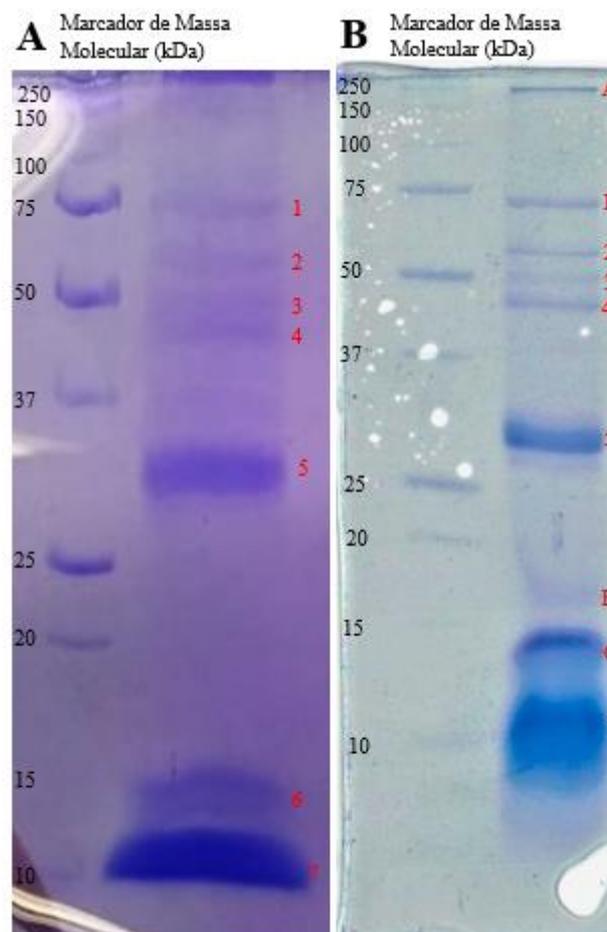
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. PERFIL PROTEICO

#### 5.1.1 PERFIL ELETROFORÉTICO

O perfil proteico da peçonha de *Tc* foi obtido a partir da técnica eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), permitindo visualizar e estimar a massa das proteínas presentes na peçonha, através da comparação com um padrão de massa molecular de proteínas (Figura 5).

**Figura 5** - Perfil eletroforético de 25 µg da peçonha de *Tityus confluens* (T.c) realizado através de SDS PAGE 15% (A- sistema Laemmli) e 16,5% (B – sistema tricina). Os números e letras em vermelho indicam as bandas.



O perfil obtido a partir do gel com concentração de 15% (Figura 5-A) demonstrou a presença de proteínas de massas variando de 100 a que 10 kDa. Identificou-se 7 bandas bem evidentes na peçonha de *T. confluens*, com massas de aproximadamente: 75 kDa (1), 60 kDa (2), 50 kDa (3), 45 kDa (4), 30 kDa (5), 15 kDa (6) e a (7) uma banda difusa, sendo a banda 5 de maior intensidade (30 kDa).

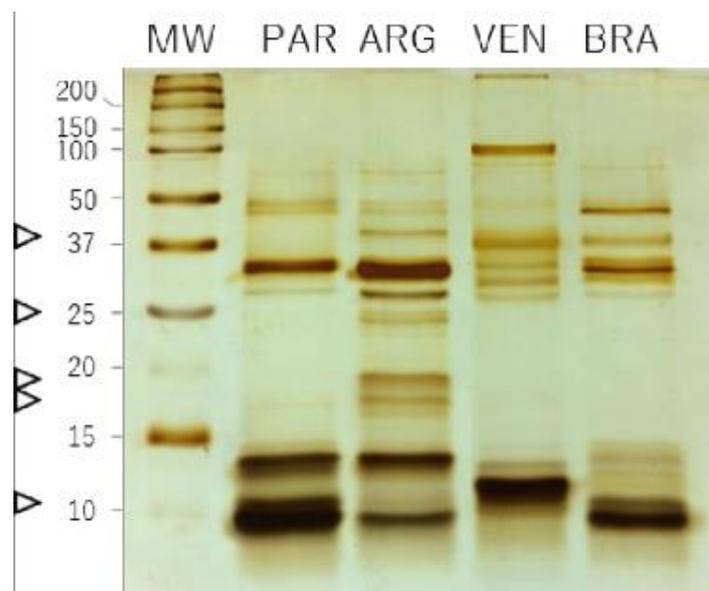
A partir do gel de concentração 16,5% (Figura 5-B) observam-se bandas entre 70 e 10 kDa e a visualização de uma banda de alta massa molecular em 250 kDa. Pode-se visualizar 9

bandas, sendo identificadas com números 1 a 7 as bandas também observadas no gel 15% e com letras A e B as bandas que foram reveladas no gel de 16,5%. As bandas apresentam massas de aproximadamente: 250 kDa (A), 70 kDa (1), 55 kDa (2), 50 kDa (3), 45 kDa (4), 30 kDa (5), 18 kDa (B), 14 kDa (6) e 10 kDa (7). As bandas de maior intensidade foram 5, 6 e 7, 5 e C, indicando uma maior abundância destes componentes na peçonha.

É possível visualizar nos dois géis expostos a presença de três banda (2,3 e 4) entre 55 – 45 kDa, através da peçonha de *T. serrulatus* foi descrita uma hialuronidase purificada de 51 kDa (PESSINI et al., 2001). Por outro lado, a banda 1 (70 kDa) correspondente com massa molecular de hemocianinas, composto proteico abundante na hemolinfa de artrópodes e que podem ser encontradas na peçonha de escorpiões (OUKKACHE et al., 2013), além disso, uma metaloproteases do tipo antarease, foi isolada de *T. serrulatus* com massa determinada de 25.5 kDa (FLETCHER et al., 2010).

O perfil proteico da peçonha de *T. confluens* (Tc.) obtido neste trabalho foi comparado com o perfil proteico da peçonha de outros escorpiões do gênero *Tityus*: *Tityus trivittatus* (Tt.) (populações do Paraguai e Argentina), *Tityus discrepans* (Td.) (Venezuela) e *Tityus serrulatus* (Ts.) (Brasil) afim de elucidação (Figura 6) (BORGES et al., 2020).

**Figura 6** - SDS-PAGE (gel a 20%, corado com prata) sob condições redutoras de *Tityus ssp.* Peçonha de espécimes do Paraguai (PAR, *T. trivittatus*), Argentina (ARG, *T. trivittatus*), Venezuela (VEN, *T. discrepans*) e Brasil (BRA, *T. serrulatus*)



Fonte: (BORGES et al., 2020).

É possível observar que as quatro espécies possuem perfis proteicos diferentes, mas com bandas de massa molecular semelhantes e intensidades diferentes. O componente proteico de

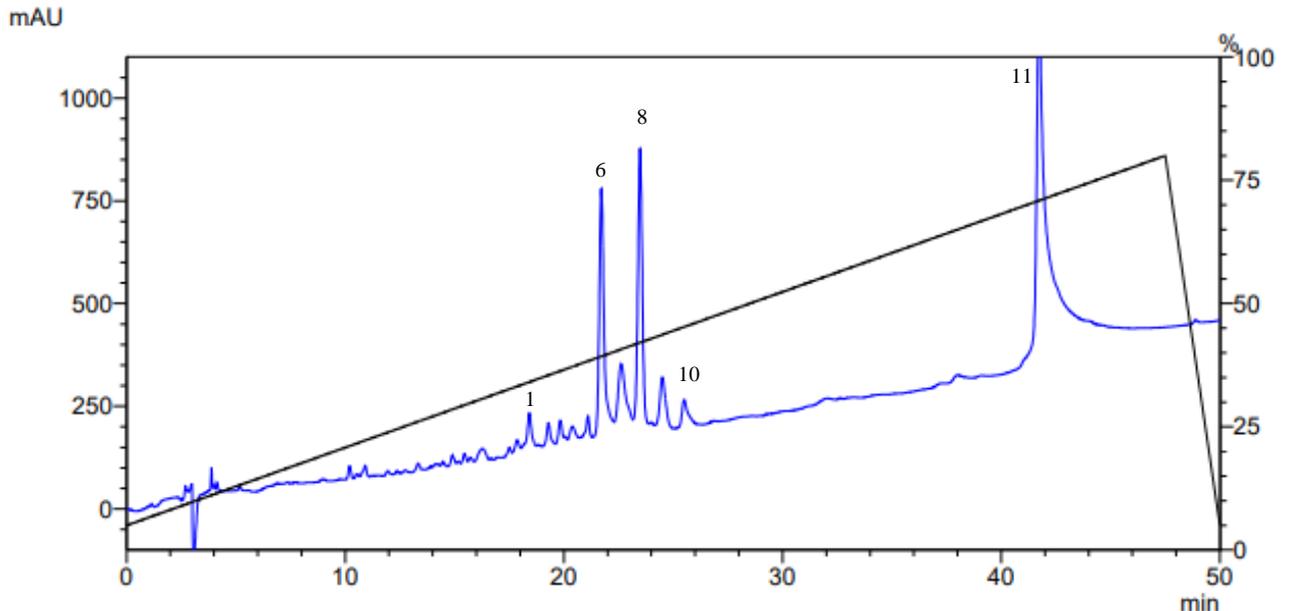
maior massa de Tc (figura 5-B, banda A - 250 kDa) é semelhante a primeira banda intensa observada no perfil de Td., apresentando massa molecular superior a 200 kDa; as bandas 3 e 4 de Tc (50 e 45 kDa) estão presentes em Tt e Ts; já a banda 5 de Tc corresponde a banda de cerca de 30 kDa presente em todas as espécies, com maior intensidade em Tt; a banda 6 (15 kDa) apresenta correspondentes no perfil de Tt. e Ts.; e, há a presença de banda difusa (7) de baixa massa molecular em todos os perfis, sendo visualizado bandas de migração na altura de 10 kDa.

A intensidade da banda difusa e a fração migratória abaixo de 10 kDa sugere a presença de componentes proteicos de baixa massa molecular. Essa característica é observada em diversas peçonhas escorpiônicas, por exemplo, o escorpião indiano *Mesobuthus tamulus* possui toxinas de ligação ao canal iônico Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> com peso molecular de 3-15 kDa (DAS; PATRA; MUKHERJEE, 2020); *T. serrulatus* apresenta toxinas que afetam os canais de Na<sup>+</sup> (NaScTxS), polipeptídeos de 6500 a 8500 Da (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005). Essas bandas de menor massa molecular indicam a presença de peptídeos, pois a massa molecular da maioria dos peptídeos está na faixa de 3,0 a 5,0 kDa ou 6,0 a 8,0 kDa, tendo importante papel da toxicidade das peçonhas (SANTHOSH et al., 2022).

### 5.1.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO

A peçonha de *T. confluens* foi fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou HPLC (high-performance liquid chromatography). Foram realizadas dez cromatografias, alíquotas de 300 µL à 2 mg/mL, e o perfil foi semelhante para todas as análises cromatográficas, sendo identificadas 31 frações, sendo 11 picos de maior altura relativa, que foram recuperados para estudos futuros. (Figura 7).

**Figura 7** - Perfil cromatográfico obtido através do fracionamento de 600 ug de peçonha liofilizada de *Tityus confluens*, separado por CLAE em coluna de fase reversa C18, com absorvância em 216nm e separada com um gradiente de 5% a 95% de solução B em 50 min.



Das 31 frações detectadas no perfil, poucas de altura relativa significantes foram eluidas entre o tempo de retenção (RT) de 5 -15 min e mais de 45 min, foi entre o RT de 17 – 25 min onde houve o maior número de frações (10 frações), sendo compostos eluidos entre 30% e 45% de solução B, indicando uma natureza hidrofílica moderada. Além disso, uma fração de maior intensidade ótica foi eluida ao RT de 41 min em 70% de solução B, indicando ser um composto de natureza hidrofóbico. As onze frações representando compostos de maior abundancia foram recuperadas (Tabela 3).

Perfis cromatográficos de peçonhas escorpiônicas variam quanto ao número de frações observadas. A peçonha de *Urodacus yaschenko* apresentou 74 frações, sendo entre RT de 20-32 min o maior número de frações, sendo encontrado que os componentes mais abundantes possuíam massas moleculares entre 4,0 e 6,0 kDa, como apenas um componente de com maior massa molecular (43kDa) que elui em 44,26 min, semelhante ao perfil de *T. confluens* (LUNARAMÍREZ et al., 2013).

Em estudos com escorpiões das famílias Buthidae (*Androctonus amoreuxi*, *Babycurus jacksoni*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili* e *Tityus fuhrmanni*) e Scorpionide, (*Pandinus imperator*) foi observado um perfil distinto para cada espécie, entretanto a maioria dos compostos eluem entre 20% e 40 % de ACN (acetonitrila) indicando uma natureza hidrofóbica moderada, onde *T. fuhrmanni* apresentou maior concentração de compostos eluindo entre 30% e 35% de ACN (ESTRADA-GÓMEZ et al., 2017).

**Tabela 3** - Frações recuperadas, dados de altura do pico (mAU), tempos de retenção e gradiente de 5% a 95% de solução B, das frações de maior relevância da peçonha bruta de *Tityus confluens*.

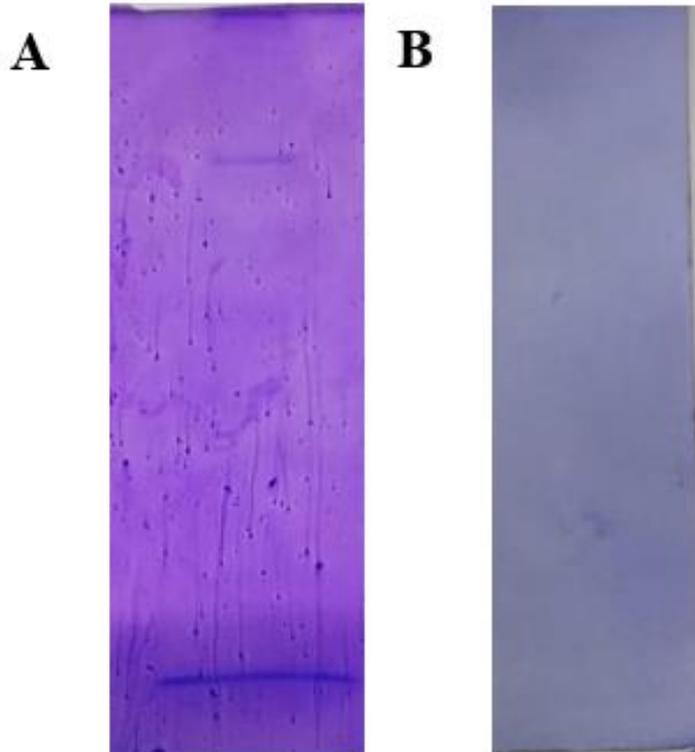
FRAÇÕES	mAU	TEMPO	% SOLUÇÃO B
1	233	18:30	32,00
2	219	18:47	32,63
3	222	19:15	33,00
4	215	19:39	33,50
5	226	20:54	37,44
6	776	21:30	39,90
7	350	22:21	40,39
8	882	23:12	41,58
9	320	23:18	44,33
10	264	24:18	44,83
11	1210	41:24	70,44

No perfil proteico da peçonha de *T. trivittatus*, os componentes de maior abundância foram separados entre os 30 – 40 min de RT, região onde já foram identificadas toxinas que reconhecem canais de Na<sup>+</sup> em peçonha de outros escorpiões (DE ROODT et al., 2010). Em um estudo com a peçonha de *T. stigmurus*, foram identificadas 65 frações, sendo que um componente eluído a 41,84 min de RT foi purificado e caracterizado estruturalmente. Esse peptídeo (TstyKTx) tem a mesma massa molar e sequência idêntica ao peptídeo TsTX-K beta de *T. serrulatus* pertencente à família beta das toxinas escorpiônicas específicas para canais de K<sup>+</sup> (ÿ-KTx) (BATISTA et al., 2007).

### 5.1. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Os ensaios para atividade gelatinolítica e caseinolítica, através de zimograma, revelou ausência de atividade para as condições testadas, como apresentados na figura 8.

**Figura 8** - Zimograma de atividade proteolítica (gelatinolítica - figura A e caseinolítica - figura B) em SDS-PAGE 12 %, 25µg da peçonha de *T. confluens*. O gel foi corado com coomassie blue R-250.



Para ambos os substratos testados (gelatina e caseína) não foi observado banda de degradação, este resultado pode ser atribuído a diferentes fatores, como a incompatibilidade da enzima com os substratos utilizados, uma baixa concentração enzimática, não havendo unidades enzimáticas suficiente para produzir bandas de degradação ou a degradação da enzima durante os procedimentos e armazenamento laboratorial.

Entretanto, estudos realizados com escorpiões já identificaram atividade proteolítica em zimograma, Magalhães (2021) em estudos com a peçonha bruta do escorpião brasileiro *Rhopalurus agamenon* demonstrou atividade proteolítica no substrato caseína, revelando uma banda degradada de aproximadamente 23 kDa. Em um estudo com populações de *T. trivittatus* oriundos do Paraguai e Argentina, observou-se na presença do substrato gelatina, bandas de atividade proteolíticas de 37 kDa e 110 kDa, respectivamente (BORGES et al., 2020). Em estudos anteriores, (ALMEIDA et al., 2002) já foram identificadas enzimas proteolíticas com atividade gelatinolítica nas peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Em análise proteômica da glândula de peçonha de *T. serrulatus*, foram identificadas proteases do tipo serino- e metaloproteases (AMORIM et al., 2019).

Enzimas proteolíticas podem ter papel importante no agravamento dos acidentes escorpiônicos, visto que clivam proteínas e peptídeos, influenciando assim no metabolismo do organismo. Casos de pancreatite aguda foram observados em vítimas de acidente com

escorpiões e foram relacionados à anterases. As anterases são enzimas do tipo metaloproteases, comumente descritas em escorpiões *Tityus* sp. e sua atividade está relacionada a alterações no transporte de vesículas celulares no pâncreas (ORTIZ et al., 2014; PETRICEVICH, 2010). Outra classe de proteases encontradas em escorpiões, como o *Centruroides hirsutipalpus*, são as serinoproteases, que em peçonha de serpentes estão relacionadas a processos pró-inflamatório e coagulação sanguínea (ESTRADA-GÓMEZ et al., 2017; MENALDO et al., 2013).

## 5.2. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

No ensaio para atividade fosfolipásica não foi observada atividade para as condições testadas, como apresentados nas figuras 9,

**Figura 9** - Gel de ágar contendo gema de ovo como substrato, para atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *T. confluens*, peçonha nas concentrações de 10, 25 e 50 µg. Controle negativo (água destilada).



Apesar do resultado negativo para este ensaio, visto que não foram observados halos translúcidos envolta dos poços em que foram inseridas as concentrações de peçonha. A presença de fosfolipases em peçonha escorpiônicas é estudada, uma vez que efeitos neurotóxicos, inflamatórios, cardiotoxicos e miotóxicos já foram relacionados as fosfolipases encontradas em escorpiões (KRAYEM; GARGOURI, 2020).

Fosfolipases hidrolisam os fosfolipídios rompendo as membranas plasmáticas, logo, sua presença em peçonhas pode promover a difusão das toxinas nos tecidos durante a intoxicação.

Além disso, as fosfolipase estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico do hospedeiro, produzindo prostaglandinas, sinalizando os efeitos fisiopatológicos, como o edema pulmonar, um dos sintomas graves do acidente escorpiônico (KANOO; DESHPANDE, 2008; MAGALHÃES et al., 2021).

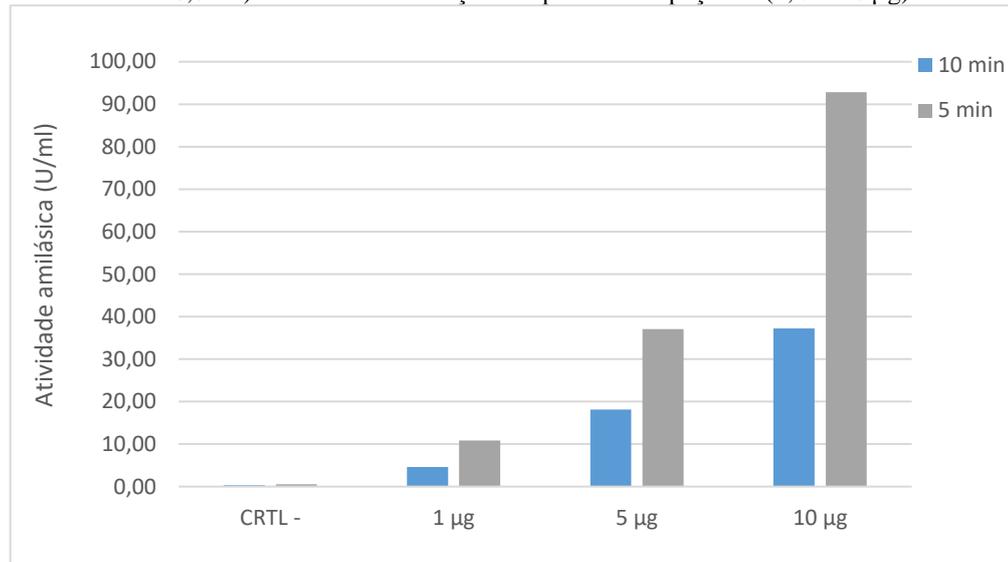
Estudos com a peçonha de serpentes *Daboia russelii russelii* sugerem que a atividade anticoagulante esteja relacionada com uma fosfolipase (Neupholipase, fosfolipase A<sub>2</sub> de 13kDa), uma vez que teve uma maior afinidade com fosfatidilserinas, em relação a outros fosfolipídios testados e a hidrólise de fosfatidilserinas plasmática pró-coagulante é importante no processo de coagulação (SAIKIA; MAJUMDAR; MUKHERJEE, 2013).

Diversas espécies de animais apresentam fosfolipases em suas peçonhas e venenos, sendo as fosfolipases da família A<sub>2</sub> secretada (sPLA<sub>2</sub>) as mais encontradas. As sPLA<sub>2</sub> de peçonha de escorpião apresentam uma estrutura heterodimérica com 5 a 8 ligações dissulfeto e são enzimas de baixa massa molecular (14-18 kDa). Apenas 9 sPLA<sub>2</sub> foram identificadas em peçonha de escorpiões (KRAYEM; GARGOURI, 2020). Foram identificadas fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), como a hemilipina, a primeira fosfolipase A<sub>2</sub> secretada purificada da peçonha do escorpião *Hemiscorpius lepturus* (JRIDI et al., 2015), e também foram identificadas PLA<sub>2</sub> na peçonha de *Centruroides hentzi* e *Hadrurus spadix* através de proteoma e transcriptoma (ROKYTA; WARD, 2017; WARD; ELLSWORTH; ROKYTA, 2018).

### **5.3.ATIVIDADE AMILÁSICA**

A atividade amilolítica foi avaliada pela conversão do amido em açúcares, dosados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A Figura 10 apresenta a quantidade de produto (U/ml - unidade enzimática por mililitro) formado após 5 e 10 minutos de incubação da peçonha em uma solução de 1% amido.

**Figura 10** - Atividade amilolítica. na peçonha bruta de *T. confluens*. O controle negativo (tampão fosfato de sódio 0,02M) e as três concentrações de proteína da peçonha (1, 5 e 10 µg).



As amilases são enzimas que hidrolisam amido a açúcares redutores. Essas enzimas são encontradas em diversas amostras biológicas, como extrato de trigo, malte, saliva humana e sangue. Embora não existam descrições do possível papel desta enzima na peçonha, em estudos com *Rhopalurus agamenon* foi identificado amilase através de ensaio bioquímico colorimétrico, zimograma e proteômica, tendo sido identificado por proteômica como o segundo componente enzimático mais abundante (23% do total) encontrado na peçonha de *R. Agamenon* (MAGALHÃES et al., 2021).

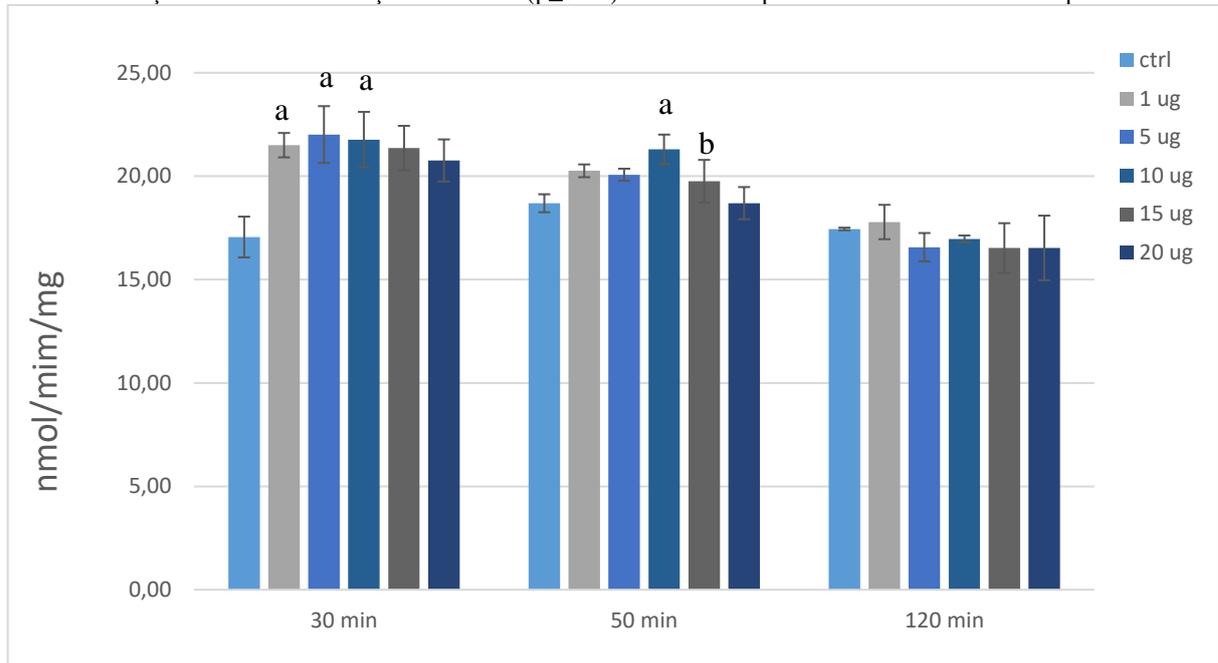
Em análise proteômica, outros escorpiões apresentaram amilases como componente de suas peçonhas, sendo identificada uma alfa-amilase em *Centruroides limpidus*, e amilase de sequências semelhantes em *Tityus serrulatus* e *Tityus obscurus* (CID-URIBE et al., 2020).

#### 5.4. ATIVIDADE SOBRE ENZIMAS DE MEMBRANA - ATPases

O efeito da peçonha sobre as enzimas do tipo ATPases presentes no homonegato de rins de ratos, foi testada em cinco concentrações (1, 5, 10, 15 e 20 µg) da peçonha de *T. confluens* em três tempos diferente de incubação (Figura 11).

O efeito foi medido através da atividade pNPPase, visto que ATPases hidrolisam o substrato sintético pNPP (p-nitrofenilfosfato), um inibidor exógeno que interage com a enzima na conformação E2 (TANOUE et al., 2006)

**Figura 11** - Atividade pNPPase da peçonha de T.c, expressa em nmol de Pi/min/mg. A barra representa o desvio padrão dos experimentos, a letra 'a' indica diferença estatística em relação ao controle, e a letra 'b' indica diferença estatística em relação a letra 'a' ( $p \leq 0.05$ ). Todos os experimentos realizados em triplicatas.



Quando incubado por 30 min, foi observado um aumento significativo na atividade pNPPase na presença de três concentrações de peçonha testada, 1  $\mu\text{g}$  ( $p = 0,04597$ ), 5  $\mu\text{g}$  ( $p = 0,02841$ ) e 10  $\mu\text{g}$  ( $p = 0,03558$ ) quando comparado ao controle, sendo esses aumentos de aproximadamente 26%, 29% e 27%, respectivamente. Entretanto, as concentrações de 15 e 20  $\mu\text{g}$ , não provocaram aumento significativo, sendo assim, o ápice da atividade foi aos 10  $\mu\text{g}$  e decaiu em concentrações maiores. No que se refere a incubação por 50 min, houve novamente um aumento na atividade na presença de 10  $\mu\text{g}$  ( $p = 0,04909$ ) em relação ao controle, cerca de 14% de aumento, e uma queda na atividade na concentração 20  $\mu\text{g}$  ( $p = 0,04949$ ) cerca de 12%, quando comparada a atividade de 10  $\mu\text{g}$ . Em contrapartida, quando incubado por 120 min, não houve diferença significativa na atividade em nenhuma das cinco concentrações., desta forma, é possível sugerir que quanto maior o tempo de incubação, menor foi a atividade, visto que três das cinco concentrações testadas apresentaram aumento em 30 min e nenhuma em 120 min. Por fim, é necessário aumentar as repetições com amostras de rins, bem como verificar se os resultados não apresentam um viés metodológico no sentido de que a quantidade de substrato foi insuficiente para estimular as ATPases em todos os tempos de ensaio.

Os componentes das peçonhas escorpionicas mais estudados são os moduladores de canais iônicos, especialmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Cl}^-$ . As ATPases são enzimas de membranas que catalisam a hidrólise do grupo fosfato terminal do ATP, presentes em ampla gama de células,

o ATP é a principal molécula energética das células, e juntamente com seu produto de degradação o ADP, o AMP (produto da hidrólise do ADP) e a adenosina, nucleotídeos e nucleosídeos da purina estão relacionados com processos biológicos, como transmissão nervosa, contração muscular, câncer, dor, inflamação, entre outros (BATTASTINI; ZANIN; BRAGANHOL, 2011).

Dentre as ATPases, destaca-se a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, conhecida também como bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , principal proteína carreadora de íons nas células eucarióticas. Estudos com toxinas animais demonstram a capacidade de modulação da atividade desta enzima ATPase, como por exemplo, a melitina, peptídeo isolado da peçonha de abelhas *Apis mellifera*. A melitina inibe a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (CHEN; LIN-SHIAU, 1985). A arenobufagina é uma toxina isolada do veneno do anuro *Peltophryne fustiger* também inibiu a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase semelhantemente à outros bufadienolídeos, como a bufalina e telocinobufagina (PERERA CÓRDOVA et al., 2016; SOUSA et al., 2017).

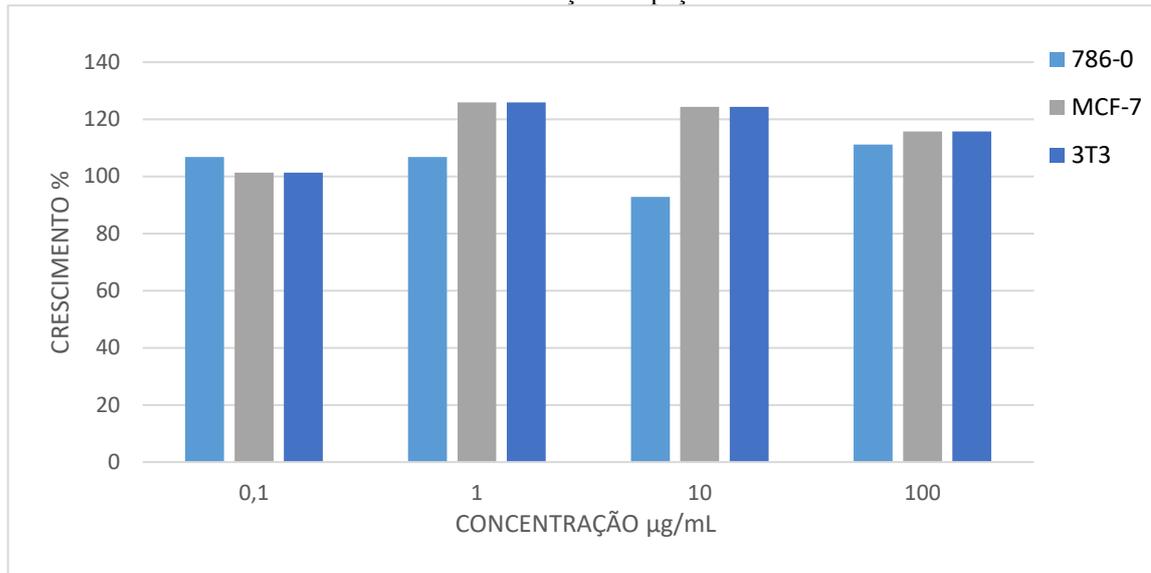
Semelhante ao observado neste trabalho, a peçonha da serpente *Bothrops alternatus* aumentou a atividade enzimática de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase renal (LINARDI et al., 2011). Dessa forma, pode-se sugerir um possível efeito da peçonha de *T. confluens* sobre a isoforma renal da enzima.

A regulação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase contribui para a homeostase do sódio corporal, e uma mudança no equilíbrio pode ocasionar retenção de sal e processos hipertensivos (APERIA, 2001). Nesta perspectiva, é interessante correlacionar que uma fração polipeptídica neurotóxica da peçonha do escorpião israelense, *Scorpio maurus palmatus*, provocou um efeito hipertensivo em ratos, com duração de cerca de 50-80min (ETTINGER et al., 2013).

## 5.5. CITOTOXICIDADE

Os resultados obtidos por meio do ensaio em células cultivadas (Figura 12) não se mostraram significativos, indicando ausência de um potencial citotóxico nas concentrações de peçonha avaliadas (0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre os três tipos celulares testados; carcinoma de células renais, linhagem 786-O (RRID:CVCL\_1051), carcinoma de mama invasivo de nenhum tipo especial, linhagem MCF-7 (RRID:CVCL\_0031) e fibroblasto não tumoral, linhagem NIH/3T3 (RRID:CVCL\_0594).

**Figura 12** - Atividade citotóxica em linhagens tumorais 786-0 e MCF-7 e linhagem celular normal 3T3 em diferentes concentrações da peçonha de Tc.



Em relação ao IG50 (concentração necessária para obter 50% na redução de células viáveis) (Tabela 3), não foi possível conhecer, visto que a maior concentração usada da peçonha do *T. confluens* não reduziu o número de células.

**Tabela 4** - Inibição de crescimento celular pela peçonha de Tc sobre células tumorais das linhagens 786-0 e MCF-7 e linhagem celular normal 3T3.

	MCF-7	3T3	786-0
	IG <sub>50</sub> (µg/mL)	IG <sub>50</sub> (µg/mL)	IG <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Tityus confluens</i>	>100	>100	>100
<b>Doxorubicina</b>	<b>0,19</b>	<b>2,89</b>	<b>0,26</b>

Os resultados encontrados demonstram que após 24 hora de tratamento com as concentrações (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL) de peçonha bruta de *T. confluens* não houve efeito antiproliferativo. Entretanto, estudos com o peptídeo stigmurina da peçonha do *T. stigmurus* revelaram atividade antiproliferativa sobre células HeLa (linhagem celular imortal de câncer de colo de útero) e a linhagem celular normal NIH/3T3, sendo que para a linhagem NIH/3T3 o IC<sub>50</sub> foi o dobro em relação a linhagem cancerosa, demonstrando que o peptídeo foi menos tóxico para essa linhagem celular normal (PARENTE et al., 2018).

A peçonha do escorpião brasileiro *Rhopalurus agamenon* também apresentou efeito citotóxico de modo dose-dependente para células MCF7 (carcinoma de mama), porém nas

linhagens B16F10 (melanoma pulmonar de camundongo) e NIH/3T3 (fibroblasto não tumoral), não foram observados efeitos (MAGALHÃES et al., 2021).

As peçonhas escorpiônicas apresentam diversas atividades biológicas, principalmente devido aos NDBP's, como, o peptídeo Mauriporina, identificado na peçonha do escorpião *Androctonus mauritanicus* que apresentou potencial citotóxico seletivo contra linhagens de câncer de próstata, e não apresentou atividade hemolíticas contra eritrócitos (ALMAAYTAH et al., 2013).

Outros peptídeos sem ligação dissulfetos, os AMPs naturais e modificados da peçonha dos *escorpiões Urodacus yaschenkoi* e *Urodacus manicatus*, foram levemente citotóxicos contra células normais BHK-21 (LUNA-RAMIREZ et al., 2017). Não apresentar citotoxicidade sobre a linhagem normal pode ser um fator de interesse de estudo, visto que na terapia antineoplásica é de suma importância evitar efeitos nocivos a células saudáveis (SOUSA et al., 2017).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribui para a caracterização inicial proteica e das atividades enzimáticas e biológicas da peçonha de *Tityus confluens*. Através da obtenção do o perfil proteico eletroforético cromatográfico, observou-se a presença de bandas de baixa massa molecular no perfil eletroforético e por CLAE onze frações de altura relativa significativa, apresentando a fração de maior abundância um componente hidrofóbico. Foi observado também que a peçonha de *Tityus confluens* foi capaz de estimular a atividade de enzimas ATPase de isoformas renal e demonstrou atividade amilásica.

A peçonha bruta de *T. confluens* também não apresentou citotoxicidade em células normais e duas linhagens celulares tumorais, além disso, foram testadas, mas não se obteve resultados positivos com os métodos utilizados, a presença de atividades proteolítica e fosfolipásica, apesar destas enzimas serem comumente identificadas nas peçonhas escorpiônicas.

Como há lacunas no conhecimento acerca da composição da peçonha de *Tityus confluens* e as toxinas animais são grandes fontes de possíveis aplicações biotecnológicas, novos estudos são necessários, tais como a avaliação das frações obtidas pelo HPLC por meio de espectrometria de massa MALDI-TO, além de proteômica, transcriptômica para caracterização e isolamento de moléculas e investigação das possíveis atividades biológicas e a importância destas moléculas no envenenamento.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHMADI, S. et al. Scorpion venom: Detriments and benefits. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, p. 1–31, 2020.
- ALI, S. A. et al. Structure-activity relationship of chlorotoxin-like peptides. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 1–18, 2016.
- ALMAAYTAH, A. et al. Mauriporin, a novel cationic  $\alpha$ -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *androctonus mauritanicus*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 281–293, 2013.
- ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.
- ALMEIDA, F. M. et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1041–1045, 2002.
- AMORIM, F. G. et al. Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, n. July 2018, p. 1–11, 2019.
- APERIA, A. Regulation of sodium/potassium ATPase activity: Impact on salt balance and vascular contractility. **Current Hypertension Reports**, v. 3, n. 2, p. 165–171, 2001.
- ARAÚJO, K. A. M. DE et al. Epidemiological study of scorpion stings in the Rio Grande do Norte State, Northeastern Brazil. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 7, n. April, p. 23–30, 2017.
- BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 147–157, 2007.
- BATTASTINI, A. M. O.; ZANIN, R. F.; BRAGANHOL, E. Recentes avanços no estudo das enzimas que hidrolisam o ATP extracelular. **Ciência e Cultura**, v. 63, n. 1, p. 26–28, 2011.
- BLANCO, B. S.; MELO, M. M. Acidentes por Sapos. **Cadernos técnicos: Animais peçonhentos**, p. 42–50, 2014.
- BORDON, K. DE C. F. et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. July, 2020.
- BORGES, A. et al. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel  $\beta$ -

- toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. **Toxicon**, v. 43, n. 6, p. 671–684, 2004.
- BORGES, A. et al. Genetic and toxinological divergence among populations of *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 (Scorpiones: Buthidae) inhabiting Paraguay and Argentina. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 12, p. e0008899, 2020.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 278–254, 1976.
- BRASIL. **Manual de Controle de Escorpiões**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. PORTARIA Nº 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020. Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. 2020. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>>. Acesso em: 6 ago. 2022
- BRAZIL, T. K. et al. Escorpiões De Importância Médica Do Estado Da Bahia, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. supl.1, p. 38–42, 2009.
- BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os escorpiões**. Salvador: EDUFBA, 2010.
- BRAZÓN, J. et al. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 168, n. 1, p. 62–69, 2014.
- CANDIDO, D. M.; FAN, H. W. Escorpião: Controle de escorpiões de importância em saúde. p. 1–16, 2019.
- CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. In: 2. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 468.
- CARMO, É. A. et al. FACTORS ASSOCIATED WITH THE SEVERITY OF SCORPIO POISONING. **Text & Context Nursing**, p. 1–14, 2019.
- CARVALHO, L. S. et al. Checklist dos escorpiões (Arachnida, Scorpiones) do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 107, p. 1–7, 2017.
- CERNI, F. A. et al. Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 9–17, 2016.
- CHEN, C. C.; LIN-SHIAU, S. Y. Mode of inhibitory action of melittin on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity of the rat synaptic membrane. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 13, p. 2335–2341, 1985.
- CHEN, N. et al. Animal protein toxins: origins and therapeutic applications. **Biophysics**

**Reports**, v. 4, n. 5, p. 233–242, 2018.

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

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

CID-URIBE, J. I. et al. Scorpion venomics: a 2019 overview. **Expert Review of Proteomics**, v. 17, n. 1, p. 67–83, 2020.

COLE, T. J.; BREWER, M. S. TOXIFY: A deep learning approach to classify animal venom proteins. **PeerJ**, v. 2019, n. 6, 2019.

DA MATA, É. C. G. et al. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 2017.

DAS, B.; PATRA, A.; MUKHERJEE, A. K. Correlation of Venom Toxinome Composition of Indian Red Scorpion (*Mesobuthus tamulus*) with Clinical Manifestations of Scorpion Stings: Failure of Commercial Antivenom to Immune-Recognize the Abundance of Low Molecular Mass Toxins of This Venom. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 4, p. 1847–1856, 2020.

DE JESUS OLIVEIRA, T.; DE OLIVEIRA, U. C.; DA SILVA JUNIOR, P. I. Serrulin: A glycine-rich bioactive peptide from the hemolymph of the yellow tityus serrulatus scorpion. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2019.

DE MELO, E. T. et al. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. **Peptides**, v. 68, p. 3–10, 2015.

DE ROODT, A. R. et al. General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 307–319, 2010.

DE ROODT, A. R. et al. Identification of scorpions with medical importance in Argentina. **Acta toxicol. argent.**, v. 22, p. 5–14, 2014.

DEBIN, J. A.; STRICHARTZ, G. R. Short Communications Chloride Channel Inhibition By the Venom of the. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1403–1408, 1991.

DIAS, R. et al. PROFILE OF SCORPIONIC ACCIDENTS IN THE PERIOD FROM 2007 TO 2019 IN THE MUNICIPALITY OF JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO, BRAZIL. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 97211–97221, 2020.

DUTRA, A. A. A. Animais venenosos e peçonhentos. In: Donato, M. F. et al. Bioprospecção

e inovação tecnológica de produtos naturais e derivados de plantas e animais. João Pessoa: Editora UFPB, p. 266-280, 2020.

ESTRADA-GÓMEZ, S. et al. Characterizing the biological and biochemical profile of six different scorpion venoms from the Buthidae and Scorpionidae family. **Toxicon**, v. 130, p. 104–115, 2017.

ETTINGER, K. et al. The effects of a chactoid scorpion venom and its purified toxins on rat blood pressure and mast cells histamine release. **Toxins**, v. 5, n. 8, p. 1332–1342, 2013.

EVANS, E. R. J. et al. Small molecules in the venom of the scorpion *Hormurus waigiensis*. **Biomedicines**, v. 8, n. 8, 2020.

FERREIRA, F. R. B. et al. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiadora* sp. **Toxicon**, v. 122, p. 119–126, 2016.

FERREIRA, L. C.; SOUZA ROCHA, Y. C. Incidência de acidentes por escorpiões em Januária, Minas Gerais, Brasil. **Journal Health NPEPS**, v. 4, n. 1, p. 228–241, 2019.

FLETCHER, P. L. et al. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Journal of Biological**

**FUNASA**. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed - **Brasília: Fundação Nacional de Saúde**, 2001. Disponível em:

<[https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual-de Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf](https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual-de_Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf)>. Acesso em: 04 ago. 2022.

FUNED (Fundação Ezequiel Dias). Bula com informações ao Profissional de Saúde - soro antiescorpiônico. Belo Horizonte: **FUNED**; 2018.

**Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7405–7416, 2010.

HABERMANN, E.; HARDT, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 163–173, 1972.

HOUSLEY, D. M. et al. Scorpion toxin peptide action at the ion channel subunit level. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 46–78, 2017.

HUI WEN, F. et al. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2015.

JRIDI, I. et al. Hemilipin, a novel *Hemiscorpius lepturus* venom heterodimeric phospholipase A2, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Toxicon**, v. 105, p. 34–44, 2015.

KANOO, S.; DESHPANDE, S. B. Involvement of phospholipase A2 pathway for the Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardiopulmonary reflexes elicited by phenyldiguanide. **Neuroscience Letters**, v. 440, n. 3, p. 242–245, 2008.

- KRAYEM, N.; GARGOURI, Y. Scorpion venom phospholipases A2: A minireview. **Toxicon**, v. 184, p. 48–54, 2020.
- LAEMMLI, U. K. © 1970 Nature Publishing Group. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 726–734, 1970.
- LINARDI, A. et al. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: Expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 9, p. 895–906, 2011.
- LOURENÇO, W.; CABRAL, B.; BRUEHMUELLER RAMOS, E. Confirmation of *Tiyus confluens* Borelli, 1899 (Scorpiones, Buthidae) in Brazil and description of a new subspecies from the State of Mato Grosso do Sul. **Boletín de la SEA**, v. 34, n. 34, p. 27–30, 2004.
- LOURENÇO, W. R. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 2018.
- LUNA-RAMIREZ, K. et al. Bioactivity of natural and engineered antimicrobial peptides from venom of the scorpions *urodacus yaschenkoi* and *U. Manicatus*. **Toxins**, v. 9, n. 1, 2017.
- LUNA-RAMÍREZ, K. et al. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. **Toxicon**, v. 63, n. 1, p. 44–54, 2013.
- MAGALHÃES, A. C. M. et al. Exploring the biological activities and proteome of Brazilian scorpion *Rhopalurus agamemnon* venom. **Journal of Proteomics**, v. 237, n. October 2020, 2021.
- MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. **ESCORPIOES: BIOLOGIA, ENVENENAMENTO E MECANISMOS DE AÇÕES DE SUAS TOXINAS**. 1. ed. São Paulo: [s.n.].
- MENALDO, D. L. et al. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 764–771, 2013.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MONTEIRO, W. M. et al. Perspectives and recommendations towards evidence-based health care for scorpion sting envenoming in the Brazilian Amazon: A comprehensive review. **Toxicon**, v. 169, n. July, p. 68–80, 2019.
- OLIVEIRA-MENDES, B. B. R. DE et al. CPP-Ts: a new intracellular calcium channel modulator and a promising tool for drug delivery in cancer cells. **Scientific Reports**, v. 8, n.

1, p. 1–13, 2018.

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

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125–135, 2015.

OUKKACHE, N. et al. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 5, 2013.

PARENTE, A. M. S. et al. Analogs of the scorpion venom peptide Stigmurin: Structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. **Toxins**, v. 10, n. 4, 2018.

PERERA CÓRDOVA, W. H. et al. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. **Toxicon**, v. 110, p. 27–34, 2016.

PESSINI, A. C. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: Isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1495–1504, 2001.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

QUINTERO-HERNÁNDEZA, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2013.

REIN, J. O. The Scorpion Files. Disponível em: <[https://www.ntnu.no/ub/scorpion\\_files/](https://www.ntnu.no/ub/scorpion_files/)>. Acesso em: 14 jul. 2022

RIBEIRO, L. A.; RODRIGUES, L.; JORGE, M. T. Aspectos clínicos e epidemiológicos do envenenamento por escorpiões em São Paulo e municípios próximos. **Revista de Patologia**, v. 30, n. 1, p. 83–92, 2001.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 831–844, 2005.

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.

SAIKIA, D.; MAJUMDAR, S.; MUKHERJEE, A. K. Mechanism of in vivo anticoagulant and haemolytic activity by a neutral phospholipase A2 purified from *Daboia russellii russellii* venom: Correlation with clinical manifestations in Russell's Viper envenomed patients.

**Toxicon**, v. 76, p. 291–300, 2013.

SANTHOSH, K. N. et al. Protein profile of scorpion venom from *Hottentotta rugiscutis* and its immunogenic potential in inducing long term memory response. **Toxicon**, v. 205, n. October 2021, p. 71–78, 2022.

SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; POSSANI, L. D. Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. **Toxicon**, v. 107, p. 317–326, 2015.

SANTOS, G. C. DOS et al. Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima* 1. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. v. 1, p. 42–53, 2017.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.

SEITER, M. Developmental stages and reproductive biology in *Tityus confluens* BORELLI, 1899 and *Tityus ocelote* (FRANCKE & STOCKWELL, 1987) (Scorpiones, Buthidae). p. 1–16, 2012.

SILVA, R. C.; DE MORAES, A. R. C. S.; SANTOS, E. C. Perfil Epidemiológico Dos Casos De Escorpionismo Na Região Nordeste. **Revista interdisciplinar em saúde**, v. 7, n. Único, p. 123–136, 2020.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SINAN. Acidentes por escorpião. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/acidentes-por-escorpioes-1>> Acesso em 05 ago. 2022

SOUSA, L. Q. DE et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition. **Toxicon**, v. 127, p. 63–76, 2017.

STOCKMANN, R. **Introduction to scorpion biology and ecology**. [s.l.: s.n.].

TANOUE, K. et al. New evidence for ATP binding induced catalytic subunit interactions in pig kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 4, p. 599–607, 2006.

TORREZ, P. P. Q. et al. Scorpionism in Brazil: Exponential growth of accidents and deaths from scorpion stings. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. March, p. 0–2, 2019.

VIANNA, S. R. R. M.; GOULART, P. DA S.; DUARTE, A. C. Atividades biológicas e ação

antitumoral de peptídeos isolados do veneno de escorpião do gênero Tityus: uma revisão.

**Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 3, n. 2, p. 1–14, 2021.

WADDINGTON, J.; RUDKIN, D. M.; DUNLOP, J. A. A new mid-Silurian aquatic scorpion - One step closer to land? **Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2015.

WARD, M. J.; ELLSWORTH, S. A.; ROKYTA, D. R. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the Hentz striped scorpion (*Centruroides hentzi*; Buthidae) reveal high toxin diversity in a harmless member of a lethal family. **Toxicon**, v. 142, p. 14–29, 2018.

ZHANG, H. et al. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 5, p. 974–977, 2004.