



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

**Uma abordagem peptidômica do veneno do escorpião**  
*Tityus serrulatus*

**ANALLY RIBEIRO DA SILVA MENEGASSO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
São Paulo - Brasil  
Dezembro/2012

**ANALLY RIBEIRO DA SILVA MENEGASSO**

**Uma abordagem peptidômica do veneno do escorpião**  
*Tityus serrulatus*

**Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma**

**Rio Claro - 2012**

595.44 Menegasso, Anally Ribeiro da Silva  
M541a Uma abordagem peptidômica do veneno do escorpião  
Tityus serrulatus / Anally Ribeiro da Silva Menegasso. - Rio  
Claro : [s.n.], 2013  
127 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Mario Sergio Palma  
Co-Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

1. Aracnídeo. 2. Peptidômica. 3. Tityus serrulatus. 4.  
Venômica. 5. ESI-MS. 6. Toxinologia. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

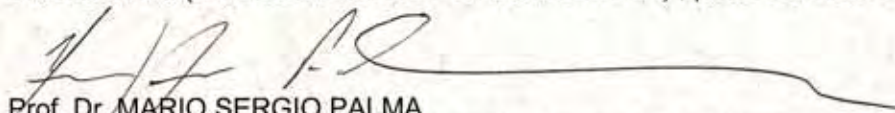
**TÍTULO:** Uma abordagem peptidômica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

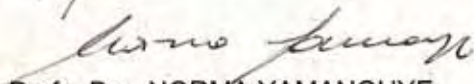
**AUTORA:** ANALLY RIBEIRO DA SILVA MENEGASSO

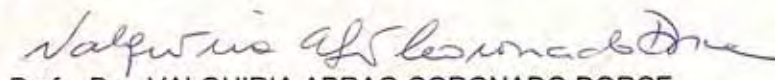
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

  
Profa. Dra. NORMA YAMANOUYE  
Laboratório de Farmacologia / Secretaria do Estado de São Paulo / Instituto Butantan

  
Profa. Dra. VALQUIRIA ABRAO CORONADO DORCE  
Laboratório de Farmacologia / Divisão de Desenvolvimento Científico / Instituto Butantan

Data da realização: 27 de fevereiro de 2013.

É difícil exprimir em palavras o tamanho da gratidão e a intensidade do que sinto por vocês.  
É inexplicável...

E ao longo de meus 24 anos só consegui encontrar uma expressão que chegue perto de traduzir o que sinto por vocês: amor incondicional!

Com vocês aprendi que o amor chega na hora exata. Que a maturidade vem aos poucos. Que família é tudo e está acima de qualquer coisa, vocês são meu refúgio.

Aprendi que amigos bons e sinceros são poucos. Que cuidar da sua vida é sempre a melhor opção.

Aprendi que dias melhores sempre virão. Que na vida, nem tudo vale a pena, pois a maior parte das coisas vem e vão sem que possamos controlar.

E aprendi, principalmente, que minha felicidade depende das escolhas que eu faço e que independente de quais sejam essas escolhas, vocês estarão sempre comigo...

Nesta vida nada se leva... Só se deixa... Então, busco sempre meu melhor sorriso... Meu maior abraço... Minha melhor história... Minha melhor intenção... e Toda minha compreensão...!

Para minha família... este trabalho.

## Agradecimentos

Agradeço a minha família: por todo o amor e a dedicação; por transmitirem a mim os valores mais preciosos, valores estes que me permitiram chegar até aqui.

Agradeço a minha mãe, Lilian, por todo seu amor incondicional e pelo exemplo de vida que você representa para mim. Sem dúvida alguma você é minha razão de viver. Ao meu step-father, Sandro, que como grande amigo e companheiro está sempre zelando por meu bem-estar e minha felicidade.

Agradeço aos meus avós, Dirce e Raimundo, pelo apoio e o incentivo aos estudos. Por serem para mim além de avós: pais e amigos. Espero sempre corresponder a todas as expectativas que depositam em mim e espero poder cuidar de vocês, assim como cuidam de mim.

Aos meus tios/padrinhos e primo, Ligia, Marcos e Júnior, por todo o amor e dedicação; por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me dando força. Mostrando que não importa o quanto a queda seja dura, sempre estarão ao meu lado para me ajudar a levantar. Vocês são para mim como pais e irmão.

Ao meu tio Laércio e minhas primas Laís e Isabella, pela alegria contagiante e pela doçura dos cuidados. Amo vocês exatamente como são. Minhas princesas: sempre estarei disposta a tudo: por vocês e para vocês.

Ao meu irmão Arthur... você é nossa alegria e nossa felicidade. Meu pequeno anjo, amor incondicional.

Ao meu pai, madrasta e irmão: obrigada por me admirarem e torcerem tanto por mim.

Aos meus tios Dirceu e Regina, Neide e Luís, Irene e Ari, Vanderci e Rubens, e aos meus primos Rosely, Marli, Marcos, Vanessa, Nina, Tica, Ricardo: muito obrigada pelo carinho e por acreditarem em meu potencial.

**AMO DEMAIS TODOS VOCÊS!**

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela oportunidade cedida e por todo o conhecimento transmitido; pelas longas histórias e por todas as risadas. Agradeço por transferir a mim o amor pela ciência, a seriedade, o profissionalismo e a responsabilidade que exigem os cargos acadêmicos, sejam eles quais forem. Você é para mim um grande exemplo a ser seguido.

Ao grupo LBEZ (Ana Maria, Marcel, Fernando, Franciele, Diego, Nathália, Bibiana, Paulo, Virginia, Helen, Nathália Calzado, Eduardo, Keni e Patrícia) por toda a ajuda, direta ou indiretamente concedida. Acredito profundamente que "Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina" (Cora Coralina).

Neste ponto, agradeço especialmente à Dra. Lucilene Delazari por me ensinar a maior parte do que sei e, principalmente, por ser amiga e irmã. Você é uma pessoa fantástica e muito especial. O Mundo seria muito melhor se houvessem mais Lucilenes! Te amo...!

Agradeço também, carinhosamente e do fundo do meu coração à Ana Maria e ao Marcel. Vocês tornam meus dias melhores. Vocês permitem que as dificuldades encontradas na bancada sejam transponíveis de forma engraçada, não deixando de ser profissional. Considero ter sorte por ter colegas de trabalho que saibam ser amigos, sem jamais deixar de aceitar as críticas e os puxões de orelha. Espero transmitir a vocês o que eu sei e que a troca de conhecimento se estenda por muitos anos. Contem sempre comigo. Obrigada pelo apoio e pela ENORME ajuda. Vocês são parte deste trabalho.

A meus amigos Cibele, Marina, Nelore, Beatriz, Ana Maria, Marcel, Lucilene e Muryllo por toda a paciência e apoio que me concederam ao longo destes dois anos. Por todas as "farofas" e bagunças. Por me fazerem sorrir nos momentos em que essa seria a última coisa que eu faria na ausência de vocês. Sem dúvida vocês tiveram um papel fundamental neste percurso.

A meus velhos amigos e que não estão tão próximos fisicamente (Mayara, Sidney, Flávia, Fawne, Victor, Gabriela, Ana Carolina, Rosely, Felipe, Wilsom Cláudia, Gustavo, Lucilene, Daniel, Nicoli, Markus, Felipe, Thiago e Danillo) o que tenho a dizer a vocês é que: "Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações". (Vinícius de Moraes)

Agradeço ao Instituto Butantan pelo material biológico fornecido e ao Projeto CAPES Toxinologia pelo incentivo e ajuda concedida.

Agradeço à Universidade pela infraestrutura e pelo apoio acadêmico. Agradeço aos funcionários por todos os serviços prestados e ao CEIS pela infraestrutura e materiais cedidos.

Agradeço também aos órgãos de fomento (CAPES, FAPESP e CnPq) pelo suporte financeiro.

## Epígrafe

“Você nasceu no lar que precisava. Vestiu o corpo físico que merecia. Mora onde melhor Deus te proporcionou de acordo com suas posses. Possui os recursos financeiros coerentes com suas necessidades, nem mais, nem menos. Mas o justo para suas lutas terrenas.

Seu ambiente de trabalho é o que você elegeu espontaneamente e para sua realização, seus parentes e seus amigos são as almas que você atraiu com sua afinidade. Portanto, seu destino está constantemente sob seu controle. Você escolhe, elege, atrai, busca, expulsa, modifica tudo aquilo que te rodeia a existência.

Teus pensamentos e vontades são a chave de seus atos e atitudes. São as fontes de atração e repulsão na sua jornada. Não reclame nem se faça de vítima. Antes de tudo, analise e observe.

A mudança está em suas mãos. Reprograme sua meta. Busque o bem e você viverá melhor.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

*Chico Xavier*

“Desejo ver um mundo melhor, mais fraternal, em que as pessoas não queiram descobrir os defeitos das outras, mas, sim, que tenham prazer de ajudar o outro”.

*Oscar Niemeyer*

## RESUMO

O aumento populacional de animais peçonhentos em áreas urbanizadas ou de atividades relacionadas à exploração de áreas naturais vem favorecendo um aumento significativo na ocorrência de acidentes devido ao contato do homem com estes animais. Dessa forma, o envenenamento por toxinas animais tem sido objeto de muitos estudos pelo homem por se revelarem úteis no desenvolvimento de novos fármacos e de novas abordagens metodológicas ou técnicas resolutivas. Os acidentes por escorpiões são os que apresentam o maior número de registro de casos dentre todos os animais peçonhentos no Brasil. Ao longo dos mais de cem anos de pesquisas com venenos destes animais, o foco toxicológico tem se concentrado quase que exclusivamente nas proteínas, responsáveis pela difusão do veneno nos tecidos das presas e/ou vítimas de ferroadas, e principalmente nos peptídeos longos (apresentando entre 30 e 70 resíduos de amino ácidos) responsáveis pelas ações neurotóxicas. Apesar da existência de pequenos peptídeos lineares nesses venenos são raros os estudos que visam elucidar a estrutura molecular e funcional dos pequenos peptídeos. O presente estudo teve como objetivo investigar peptídeos deste grupo (negligenciados) no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Para isto, o veneno bruto deste escorpião foi submetido a extração diretamente em acetonitrila 50 % (v/v), e a fração solúvel foi fracionada, e cada fração individual foi submetida à análise por espectrometria de massas ESI-IT-TOF-MS e MS<sup>n</sup> a fim obter as sequências completas de novos peptídeos. A estratégia utilizada permitiu a identificação de cinco novos peptídeos, estruturalmente diferenciados daqueles já descritos na literatura. Os peptídeos caracterizaram-se por serem lineares e não possuírem cisteínas. Desta forma, eles ampliam a classe de peptídeos de escorpiões que não possuem pontes dissulfeto intramoleculares. Dois destes peptídeos foram sintetizados em fase sólida (Fração 14 e Fração 18) e ensaiados para uma série de atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*. O peptídeo da Fração 18 apresentou efeito antinociceptivo e edematogênico, além de ação antibiótica. Os estudos e resultados apresentados comprovam o potencial biotecnológico e farmacêutico de produtos naturais, enfatizando a relevância do estudo de venenos animais como fonte de novas moléculas, como por exemplo dos venenos de escorpiões. Deste modo, a estratégia experimental utilizada colabora para se compreender um pouco mais a composição e os mecanismos de ação do veneno do escorpião de *T.serrulatus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** peptidômica; *Tityus serrulatus*; venômica; ESI-MS; toxicologia.

## ABSTRACT

The increasing population of venomous animals in urbanized areas or activities related to the exploitation of natural areas has favored significant accidents due to human contact with these animals. Thus, the toxins from animal venoms has been the subject of many studies prove useful in developing new drugs and new methodological approaches or high-resolution techniques. Scorpions's accidents are those with the highest number of reported cases among all venomous animals. More than a hundred years of research with these poisons animals, the principal focus toxinology is on proteins, responsible for the spread of the venom in tissues prey or victims, especially in neurotoxic peptides (presenting between 30 and 70 amino acid residues). Despite on the existence of small and linear peptides in these venoms are few studies exploring the molecular structure and function of small peptides. The present study aimed to the study of this peptides group (at moment is neglected) from scorpion venom *Tityus serrulatus*. For this, the venom were fractionated by chromatography, posteriorly each fraction was subjected to individual analysis by mass spectrometry (LC-MS IT-ToF) in order to obtain the complete sequence about novel peptides. This strategy promoted the detection of five undiscovered peptide sequences highly differentiated those previously described at literature. The peptides were characterized like non-disulfide-bridged peptides it is contributed to expanding the class of scorpions peptides with similar physicochemical characteristic. Two peptides were synthesized on solid phase (fraction 14 and fraction 18) and tested by biological activity *in vivo* and *in vitro*. The fraction 18 showed us antinociceptive and edematogenic effect, in addition to antibiotic effect. These results has been demonstrated the large biotechnology potential and pharmaceutical relevance mean of natural products, emphasizing the study of animal venoms, including scorpions. The large amount of molecules present in these complex biological samples represents a challenging in scientific and academic by presenting diverse methodological parameters and natural variables. Therefore, this strategy contributes for better understanding of the mechanism action venoms and, the advances in molecular toxinology.

**KEY-WORDS:** peptidomics; *Tityus serrulatus*; venomics; ESI-MS; toxinology.

### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Atividade de LDH do Calibrador
<b>AM</b>	Peptídeo antimicrobiano
<b>AT</b>	Atividade de LDH do Teste em U/L
<b>ATDB</b>	<b>Animal Toxin Database</b>
<b>BLAST</b>	<b>Basic Local Alignment Search Tool</b>
<b>BP</b>	Bradicinina
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>C-18</b>	Octadecil
<b>CID</b>	Dissociação induzida por colisão
<b>C.E.I.S.</b>	Centro de Estudos de Insetos Sociais
<b>Cg</b>	Carragenina
<b>COX-2</b>	Ciclo-oxigenase-2
<b>Da</b>	Daltons
<b>DC</b>	Dicroísmo circular
<b>DHPr</b>	Di-hidropiridina
<b>DMF</b>	N-N-Dimetilformamida
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECD</b>	Electron Capture Dissociation
<b>ED50</b>	Dose efetiva
<b>e/g</b>	Equivalente/Grama
<b>ESI-MS</b>	Espectrometria de Massas com fonte de ionização do tipo Eletrospray
<b>ETD</b>	Electron Transfer Dissociation
<b>FC</b>	Fator de Calibração
<b>Fmoc</b>	N-9-fluorenilmetoxicarbonil
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>hab.</b>	Habitantes
<b>HL</b>	Peptídeo hemolítico
<b>HOBt</b>	<i>N-hydroxybenzotriazoel.H2O</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta Performance
<b>IAA</b>	Iodoacetamida
<b>icv</b>	Intracerebroventricular
<b>IM</b>	Peptídeo modulador de resposta imune
<b>i.pl.</b>	Via intraplantar
<b>IT</b>	“ <i>ion trap</i> ” ou armadilha de elétrons
<b>Katal (Kat)</b>	1mol/s/L
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>kHz</b>	Kiloheartz
<b>kV</b>	Kilovolts
<b>LBEZ</b>	Laboratório de biologia estrutural e zooquímica
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
<b>LC-MS IT</b>	Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas com analisador de tipo <i>ion trap</i>
<b>LDH</b>	Enzima lactato desidrogenase
<b>LD50</b>	Dose letal mediana

<b>Liquemine</b>	Heparina sódica
<b>L/h</b>	Litros por hora
<b>M</b>	Molar
<b>MALDI</b>	Ionização a laser assistida por Matriz
<b>MCM-1</b>	" <i>mast cell médium</i> "
<b>MeCN</b>	Acetonitrila
<b>MIC</b>	Concentração inibitória mínima
<b>Min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>MS</b>	Espectrometria de Massas
<b>MS/MS ou MS2</b>	Espectrometria de massas sequencial ( <i>in Tandem</i> )
<b>msec</b>	Milisegundo
<b>m/z</b>	Relação Massa/carga
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
<b>NDBPs</b>	Peptídeos sem pontes dissulfeto
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NNM</b>	N-Metilmorfolina
<b>U</b>	Unidade internacional
<b>UM</b>	Peptídeo sem função conhecida
<b>U/L</b>	1 mol/min/L
<b>u.m.a.</b>	Unidade de massa atômica
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Phenylmethanesulfonylfluoride
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>PyBOP</b>	Hexafluorofosfato Benzoitriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfinio
<b>rcf</b>	Relative centrifugal force
<b>RF</b>	Radio frequência
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance sob fase reserva
<b>RYr</b>	Receptor de Rianodina
<b>s</b>	Segundo
<b>SDS-PAGE 1D</b>	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-sódio-dodecilsulfato
<b>SH</b>	Solução contendo p-nitrofenil-Nacetil-β-glucosaminidina em Citrato trissódico
<b>spp.</b>	Espécies
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TOF</b>	" <i>Time of flight</i> " ou tempo de voo
<b>Tris</b>	Hidroximetilaminometano
<b>Triton X-100</b>	T-octilfenoxipolietanol
<b>TTC</b>	Trifeniltetrazolium

<b>u.m.a</b>	Unidade de massa atômica
<b>V</b>	Volts/Volume
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>Δ</b>	Delta
<b>ΔA/minuto médio</b>	Varição média da absorbância por minuto
<b>%</b>	Por cento
<b>°C</b>	Graus Celsius

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Panorama dos peptídeos sem pontes dissulfeto descritas até 2005. BP, peptídeo potencializador de bradicinina; AM, peptídeo antimicrobiano; HL, peptídeo hemolítico; IM, peptídeo modulador de resposta imune e UM, peptídeo sem função conhecida. Modificado de Zeng e colaboradores (2005).....	16
<b>Tabela 2:</b> Principais toxinas descritas para o veneno de <i>T. serrulatus</i> . Modificado de Cologna et al., 2009.....	21
<b>Tabela 3:</b> Procedimento e reagentes adotados na Síntese em Fase sólida.....	47
<b>Tabela 4:</b> Sequência primária dos peptídeos sintetizados.....	76
<b>Tabela 5:</b> Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para os dois peptídeos estudados no presente trabalho, peptídeos de referência (IsCT, BmKb1 e BmKn2) e para o padrão do experimento (Cloranfenicol), frente às bactérias Gram <sup>+</sup> e Gram <sup>-</sup> .....	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Morfologia externa de um escorpião.....	4
<b>Figura 2:</b> Espécies do gênero <i>Tityus</i> responsáveis pelos acidentes humanos: <b>A.</b> <i>Tityus serrulatus</i> (Arquivo Instituto Butantan); <b>B.</b> <i>Tityus bahiensis</i> (Arquivo Instituto Butantan); <b>C.</b> <i>Tityus stigmurus</i> ( <a href="http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/escorpionideos.htm">http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/escorpionideos.htm</a> ); <b>D.</b> <i>Tityus trivittatus</i> ( <a href="http://200.189.113.52/Saudeambiental/animais/galeria/escorpioes.html">http://200.189.113.52/Saudeambiental/animais/galeria/escorpioes.html</a> ) e <b>E.</b> <i>Tityus obscurus</i> (retirado de <a href="http://scorpionforum.darkbb.com">http://scorpionforum.darkbb.com</a> ).....	5
<b>Figura 3:</b> Alinhamento de seqüências de $\beta$ -toxinas que representam quatro diferentes grupos farmacológicos. Todos os resíduos de cisteína estão sombreados e estão todos envolvidos na formação de pontes dissulfeto. Os traços indicam espaços introduzidos para maximizar o alinhamento. CN2 e CN3, $\beta$ -toxinas de <i>Centruroides Noxius</i> ; CSS2 e Css4, $\beta$ -toxinas de <i>Centruroides suffusus suffusus</i> ; Bj-xtrIT de <i>Buthus judaicus</i> toxina excitatória para células de inseto; AahIT1 de <i>Androctonus australis</i> toxina que atua em células de insetos; LqqIT1 de <i>Leiurus quinquestriatus</i> ; Lqh-xtrIT de <i>Leiurus quinquestriatus</i> ; BMK TI-AP, toxina excitatória de <i>Buthus martensii Karsch</i> ; LqhIT2, toxina depressora de <i>L. q. Hebraeus</i> ; LqhdprIT3a, toxina depressora de <i>L. q. Hebraeus</i> ; BjIT2, toxina depressora de <i>B. judaicus</i> ; BaIT2, toxina depressora de <i>Buthacus arenicola</i> ; LqqIT2, toxina depressora de <i>Leiurus quinquestriatus</i> ; BoIT2, toxina depressora de <i>Buthus occitanus tunetanus</i> ; Lqhb1, de <i>L. q. Hebraeus</i> ; Ts1, $\beta$ -toxina de <i>Tityus serrulatus</i> ; TZ1, $\beta$ -toxina de <i>Tityus zulianus</i> (BORGES et al., 2004). Todas as seqüências citadas aparecem em Possani e colaboradores (1999).....	12
<b>Figura 4:</b> Classificação simplificada para os peptídeos sem ponte dissulfeto, com base em suas atividades farmacológicas e similaridade de comprimento dos peptídeos. Gaps foram introduzidos para melhorar o alinhamento. Resíduos de aminoácidos idênticos são destacados em preto, os resíduos comuns apenas para os membros parciais da subfamília estão destacados em cinza. O Peptídeo T isolado de <i>Tityus serrulatus</i> (FERREIRA et al., 1993), Peptídeo K12 isolado de <i>B. occitanus</i> (MEKI et al., 1995), Bs10 isolado de <i>B. indicus</i> (ALI et al., 1998), Pandinin 1 e 2 isolados de <i>P. imperator</i> (CORZO et al., 2001), Hadrurin isolado de <i>H. aztecus</i> (TORRES-LARIOS et al., 2000), IsCT e IsCT2 isolados de <i>O. madagascariensis</i> (DAI et al., 2000; DAI et al., 2001), Parabutoporin isolado de <i>P. schlechteri</i> , Opistoporin 1 e 2 isolados de <i>O. carinatus</i> (VERDONCK et al., 2001; MOERMAN et al., 2002) e BmKbpp, BmKn1, BmKn2, BmKa1, BmKa2 e BmKb1 isolados de <i>B. martensii</i> (ZENG et al., 2000; ZENG et al., 2001; ZENG et al., 2004).....	17
<b>Figura 5:</b> A descoberta de novos peptídeos biologicamente ativos. Modificado de NICOLAS et al., 2003.....	26

<b>Figura 6:</b> Estratégias aplicadas ao estudo e caracterização de peptídeos.....	27
<b>Figura 7:</b> Estrutura química geral de um peptídeo apresentando as possibilidades de fragmentação, com a nomenclatura proposta por Roepstorff e Fohlman (1984) dos fragmentos formados devido à transferência de energia para o peptídeo; íons formados são enumerados a partir do lado N-terminal.....	28
<b>Figura 8:</b> Resolvendo a ambiguidade isoleucina/leucina por meio do uso de CID; formação de séries $-d$ e $-w$ .....	30
<b>Figura 9:</b> (I) Mecanismo de racionalização da formação de íons $-d_n$ via intermédio de $(a_n + 1)$ . (II) Fragmentação secundária de íon $-z$ para produzir íon $-w$ de um peptídeo que contém (a) resíduo de leucina e (b) resíduo de isoleucina.....	30
<b>Figura 10:</b> Derivatização: acetilação do N-terminal e dos resíduos de lisina (K).....	31
<b>Figura 11:</b> Formação de cistina a partir da oxidação de duas moléculas de cisteínas. Produto apresenta ponte dissulfeto.....	31
<b>Figura 12:</b> Esquema mostrando o aumento de massa após cada evento das reações de redução e alquilação de uma molécula peptídica hipotética.....	32
<b>Figura 13:</b> LCMS-IT-ToF: acoplando ionização a pressão atmosférica com as tecnologias de Ion Trap (IT) e Tempo de vôo (ToF), permite obter alta exatidão de massa e alta resolução (10.000 a 1000 $m/z$ ) em todos os modos MS. Disponibiliza a capacidade de $MS^n$ (MS/MS, MS/MS/MS, MS/MS/MS/MS.) utilizando o método de ion-trap e também a capacidade de realizar medições de massa de alta resolução e alta precisão utilizando o método TOF.....	35
<b>Figura 14:</b> Fluxograma geral de estratégias metodológicas aplicadas ao estudo de peptídeos em venenos animais para a busca por moléculas bioativas. Modificado de PIMENTA et al., 2005a.....	39
<b>Figura 15:</b> Método de extração de veneno de escorpiões por estimulação elétrica. Retirado de: <a href="http://www.incttox.com.br/noticias/alunos-desenvolvem-equipamento-para-extracao-de-veneno-de-aranhas-e-escorpioes/">http://www.incttox.com.br/noticias/alunos-desenvolvem-equipamento-para-extracao-de-veneno-de-aranhas-e-escorpioes/</a> em 16/07/2012.....	43
<b>Figura 16:</b> Espectro de massas ESI no modo positivo, do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> extraído em MeCN 50% (v/v) . <b>A:</b> Íon de $m/z$ 937,4; <b>B:</b> Íon de $m/z$ 1363,07 (B1. Íon na forma $[M+H]^+$ e B2. Íon na forma $[M+2H]^{+2}$ ).....	59

**Figura 17:** Em linha azul: perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno do escorpião *T. serrulatus* RP-LCMS (SHIMADZU, Kyoto), utilizando-se de uma coluna TOSOH TSK-Gel ODS-80 Tm (C18 - 7,8 x 3000 mm) e um fluxo constante de solventes de 1 ml/min. Linha tracejada: gradiente de MeCN (%B): a eluição foi realizada inicialmente a 20% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA), seguida por um gradiente linear de 20 a 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 0,1 a 60,0 min, seguido de condição isocrática de 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 60,1 a 70,0 min, seguido por gradiente linear de 60 a 70% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 70,1 e 80 min e por fim gradiente linear de 70 a 80% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 85,1 a 90,0 min. a 28 °C. 60

**Figura 18:** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvoluído na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência do peptídeo presente na fração 10. Foi selecionado o íon precursor de *m/z* 469,5 na forma [M+2H]<sup>+2</sup>..... 63

**Figura 19:** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvoluído na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência para o peptídeo presente na fração 12. Foram selecionados os íons precursores de *m/z* 661,70 na forma [M+2H]<sup>+2</sup> e de *m/z* 1362, 43 na forma [M+H]<sup>+</sup>..... 65

**Figura 20:** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID, no modo positivo já desconvoluído na forma forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência do peptídeo presente na fração 14. Foram selecionados os íons precursores de *m/z* 681,85 na forma [M+4H]<sup>+4</sup> e o íon molecular de *m/z* 908,74 na forma [M+3H]<sup>+3</sup>..... 69

**Figura 21:** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvoluído na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência do peptídeo presente na fração 18. Foram selecionados os íons precursores de de *m/z* 920,51 na forma [M+3H]<sup>+3</sup>, *m/z* 690,39 na forma [M+4H]<sup>+4</sup> e *m/z* 551,33 na forma [M+5H]<sup>+5</sup>..... 72

**Figura 22:** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvoluído na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência para o peptídeo presente na fração 20; foi selecionado o íon precursor de *m/z* 782,45 na forma [M+3H]<sup>+3</sup>..... 74

**Figura 23:** Alinhamento entre o peptídeo da Fração 10 e o inseticida U3-plectoxin-Pt1a isolado da aranha *Plectreurys tristi*..... 75

<b>Figura 24:</b> Perfil de cromatografia de fase reversa de amostra sintética do peptídeo presente na fração 14 em coluna SHIMPACK PREP-ODS(K) 30x200 mm (Shimadzu), em fluxo de 10 mL/min, de forma isocrática em MeCN 25 (v/v), com eluição monitorada em 214 nm.....	76
<b>Figura 25:</b> Perfil de cromatografia de fase reversa de amostra sintética do peptídeo presente na fração 18, em coluna SHIMPACK PREP-ODS(K) 30x200 mm (Shimadzu) em fluxo de 10 mL/min, sob gradiente de MeCN entre 30-70% (v/v), com eluição monitorada em 214 nm.....	77
<b>Figura 26:</b> Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos presentes nas frações 14 e 18, incubados à 37°C.....	78
<b>Figura 27:</b> Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelo peptídeo da Fração 14 e pelo peptídeo Fração 18.....	79
<b>Figura 28:</b> Atividade da medida da enzima lactato desidrogenase dos peptídeos presentes nas frações 14 e 18.....	80
<b>Figura 29:</b> Efeito do peptídeo presente na fração 18 sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta ( $\Delta$ ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração do Peptídeo 4 (1, 5 e 10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação à Salina; # $p < 0,001$ em relação à Carragenina.....	85
<b>Figura 29:</b> Efeito do peptídeo presente na Fração 14 sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta ( $\Delta$ ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (C). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (D). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração do Peptídeo 3 (1, 5 e 10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação à Salina; # $p < 0,001$ em relação à Carragenina.....	87

**TABELA DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS**

Nome (Símbolo)	Composição	Massa Média	Massa Monoisotópica	Íon Imonium
Alanina Ala ou A	$C_3H_5NO$	71,0788	71,03711	44
Arginina Arg ou R	$C_6H_{12}N_4O$	156,1876	156,10111	129 (112, 100, 87, 73, 70, 59)
Asparagina Asn ou N	$C_4H_6N_2O_2$	114,1039	114,04293	87 (70)
Ácido Aspártico Asp ou D	$C_4H_5NO_3$	115,0886	115,02694	88
Cisteína Cys ou C	$C_3H_5NOS$	103,1448	103,00919	76
Ácido Glutâmico Glu ou E	$C_5H_7NO_3$	129,1155	129,04259	102
Glutamina Gln ou Q	$C_5H_8N_2O_2$	128,1308	128,05858	101 (84, 129)
Glicina Gly ou G	$C_2H_3NO$	57,0520	57,02146	30
Histidina His ou H	$C_6H_7N_3O$	137,1412	137,05891	110 (166, 138, 123, 121, 82)
Isoleucina Ile ou I	$C_6H_{11}NO$	113,1595	113,08406	86 (72)
Leucina Leu ou L	$C_6H_{11}NO$	113,1595	113,08406	86 (72)
Lisina Lys ou K	$C_6H_{12}N_2O$	128,1742	128,09496	101 (129, 112, 84, 70)
Metionina Met ou M	$C_5H_9NOS$	131,1986	131,04049	104 (61)
Fenilalanina Phe ou F	$C_9H_9NO$	147,1766	147,06841	120 (91)
Prolina Pro ou P	$C_5H_7NO$	97,1167	97,05276	70
Serina Ser ou S	$C_3H_5NO_2$	87,0782	87,03203	60
Treonina Thr ou T	$C_4H_7NO_2$	101,1051	101,04768	74
Triptofano Trp ou W	$C_{11}H_{10}N_2O$	186,2133	186,07931	159
Tirosina Tyr ou Y	$C_9H_9NO_2$	163,1760	163,06333	136
Valina Val ou V	$C_5H_9NO$	99,1326	99,06841	72

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
1. 1 Acidentes com animais peçonhentos	23
1. 2 Escorpiões	24
<b>2. VENENOS DE ESCORPIÃO</b>	<b>26</b>
2. 1 Toxinas escorpiônicas	27
2. 2 Classificação das toxinas escorpiônicas	28
2. 2. 1 Toxinas com ação em canais iônicos	28
2. 2. 1. 1 Toxinas que agem nos canais para íons sódio	30
2. 2. 1. 2 Toxinas que agem nos canais para íons potássio	32
2. 2. 1. 3 Toxinas que agem nos canais para íons cloreto	34
2. 2. 1. 4 Toxinas que agem nos canais para íons cálcio	34
2. 2. 2 Peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBPs)	35
2. 3 Análise proteômica de venenos de escorpião	38
2. 4 Nomenclatura de toxinas escorpiônicas	39
<b>3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS</b>	<b>43</b>
3. 1 Espectrometria de Massas Sequencial (MS/MS)	43
<b>4. PEPTIDÔMICA</b>	<b>44</b>
4. 1 Estratégias para o estudo e a caracterização de peptídeos	45
4. 2 Fragmentação de peptídeos	47
4.2.1 Pontes dissulfeto	51
4. 2. 2 Resíduo da posição C-terminal: ácido ou amida	52
4. 3 LCMS-IT-ToF	53
<b>5. VENÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE PEPTÍDEOS</b>	<b>56</b>
5. 1 A evolução no estudo dos venenos	57
5. 2 Estratégias para o estudo de peptídeos em venenos animais	59
5. 3 Peptídeos oriundos de venenos animais e sua aplicação biotecnológica	60
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>62</b>
<b>7. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>63</b>
7. 1 Material biológico	63
7. 2 Metodologias	64
7. 2. 1 Fracionamento do veneno bruto	64
7. 2. 2 Espectrometria ESI-MS	64

7. 2. 3 Interpretação dos Espectros (Desconvolução)	64
7. 2. 4 Acetilação dos Resíduos de Lisina	66
7. 2. 5 Identificações dos peptídeos	66
7. 2. 6 Síntese de peptídeos em Fase Sólida	66
7. 2. 7 Purificação dos peptídeos sintéticos	68
7.3 Atividades Funcionais	68
7. 3. 1 Animais	68
7. 3.2 Atividade Hemolítica	68
7. 3. 3 Atividade Desgranuladora de mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de Ratos Wistar Machos	69
7. 3. 4 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)	71
7. 3.5 Prova de sensibilidade bacteriana (MIC)	73
7. 3.6 Ensaio de Inseto-Toxicidade	74
7. 3.7 Atividade Farmacológica	74
7. 3.7.1 Animais	74
7. 3.7.2 Avaliação da Sensibilidade Dolorosa	75
7. 3.7.3 von Frey Eletrônico	75
7. 3.7.4 Edema de Pata	75
7. 3.7.5 Análise Estatística	76
<b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
8. 1 Análises do veneno bruto em espectrômetro de massas ESI-MS e MS/MS	78
8. 2 Fracionamento do veneno bruto	79
8. 3 Análise das frações cromatográficas por espectrometria de massas ESI- IT-ToF	81
8. 3. 1 Fração 10	82
8. 3. 2 Fração 12	84
8. 3. 3 Fração 14	86
8. 3. 4 Fração 18	90
8. 3. 5 Fração 20	93
8. 4 Síntese de peptídeos	96
8. 5 Purificação dos peptídeos sintéticos	96
8. 6 Análises Funcionais	98
8. 6. 1 Atividade Hemolítica	98
8. 6. 2 Atividade Desgranuladora de mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de	99

Ratos Wistar Machos

8. 6. 3 Liberação da atividade de Lactato desidrogenase (LDH)	100
8. 6. 4 Atividade anti-microbiana	100
8. 6. 5 Efeito de Inseto-toxicidade	102
8. 6. 6 Efeito dos peptídeos presentes nas frações 14 e 18 sobre a sensibilidade dolorosa	104
e sobre o efeito edematogênico	
<b>9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>111</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Acidentes com animais peçonhentos

Muitas espécies com atributos ecológicos favoráveis à sobrevivência em áreas alteradas, como por exemplo, áreas urbanizadas, sobrevivem às alterações ou mesmo prosperaram, apresentando uma maior abundância em relação às áreas naturais adjacentes. Dentre os animais que se mantêm ou mesmo prosperam em áreas alteradas pelo homem podem-se encontrar espécies de animais peçonhentos de interesse médico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

O aumento populacional de animais peçonhentos em áreas urbanizadas ou de atividades relacionadas à exploração de áreas naturais vem favorecendo um aumento significativo na ocorrência de acidentes devido ao contato do homem com estes animais.

Desta forma, pode-se definir que animal peçonhento, é aquele que possui um aparato para inoculação de substâncias tóxicas ou ainda aqueles que produzem injúrias pela inoculação de toxinas através de um aparelho especializado nessa função (dentes ou esporões). Nesse grupo existem vários animais, dentre os quais estão cobras, escorpiões, aranhas, potós, abelhas, vespas, e lacraias, por exemplo.

Muitos estudos revelam a incidência de acidentes com animais peçonhentos e as consequências clínicas de suas toxinas. Estima-se que os acidentes ofídicos em todo o mundo sejam em torno de 500 mil por ano, com cerca de 40.000 mortes.

Paralelamente, as ferroadas por abelhas e vespas causam 61 mortes no Reino Unido, enquanto que nos EUA, as ferroadas por himenópteros causam de 40-50 mortes por ano (SCHMIDT, 1986). Os acidentes escorpiônicos são responsáveis por 1000-2000 mortes a cada ano no México, e apresentam altas taxas de mortalidade também no Brasil, Israel, Trinidad, Argélia, Índia (WARRELL, 1987) e Jordânia (HMR, 1989).

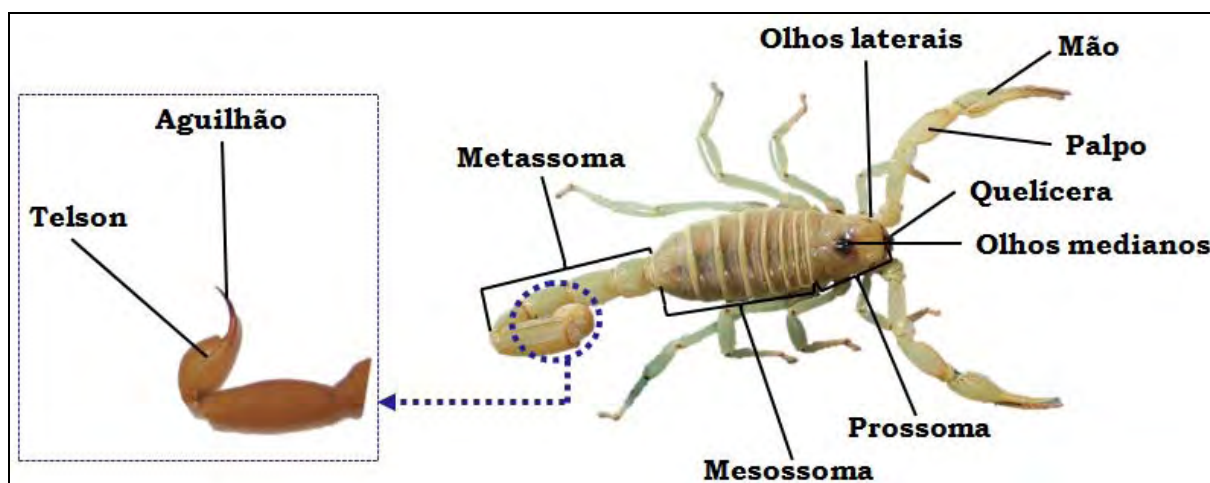
Sabe-se que essas toxinas animais, compreendem um conjunto de muitas proteínas e peptídeos, que apresentam uma variedade de funções bioquímicas e farmacológicas, produzindo, conseqüentemente, severos distúrbios fisiológicos e farmacológicos. Ao longo da história, o envenenamento por toxinas animais tem sido objeto de muitos estudos pelo homem por se revelarem úteis no desenvolvimento de novos fármacos e de novas abordagens metodológicas ou técnicas resolutivas. Além disso, informações sobre a natureza destes

compostos e de seus mecanismos de ação, permitiram uma abordagem científica avançada no tratamento de intoxicações e/ou testes diagnósticos mais específicos.

## 1.2 Escorpiões

Estudos comprovam a existência dos escorpiões há mais de 400 milhões de anos, os quais foram os primeiros artrópodes a conquistar o ambiente terrestre e, desde então, passaram por poucas modificações morfológicas. Esses animais possuem ampla distribuição geográfica por todos os continentes, com exceção da Antártica (LOURENÇO, 2004). Um fator decisivo para o sucesso evolutivo e ampla distribuição encontra-se no fato destes animais serem predadores com alta variabilidade de estratégias de ocupação de ambientes, e de várias espécies possuírem a capacidade de colonizar áreas sob forte perturbação humana.

Os escorpiões pertencem à classe Arachnida, ordem Scorpionidae, a qual é subdividida em dezenove famílias, sendo que, 1500 espécies já foram descritas. A segmentação corporal dos escorpiões pode ser observada na Figura 1. O veneno é inoculado pela estrutura denominada telson (porção final do metassoma) onde estão localizadas duas glândulas de veneno que se comunicam com um pequeno ducto localizado na região subapical do ferrão.



**Figura 1.** Morfologia externa de um escorpião.

Para que um animal peçonhento se torne de interesse em saúde pública, basicamente três características quanto aos aspectos biológicos devem ser avaliados: a ação fisiopatológica e a composição de seu veneno; a capacidade de inoculação e, principalmente, seu potencial/eficiência sinantrópica. A partir disto, considera-se que os escorpiões potencialmente perigosos ao homem pertencem à família Buthidae, sendo esta, a única família

que apresenta ampla distribuição pelo mundo e é composta por 48 gêneros e 500 espécies, aproximadamente (LOURENÇO, 2004). Vale lembrar que conforme citado por Marcussi e colaboradores (2011), a peçonha é importante para a sobrevivência do animal e tem como função imobilizar/afetar presas, sendo sua função defensiva um caráter secundário. Desta forma, é da natureza do animal se defender e traçar estratégias de sobrevivência eficientes e com custo-benefício elevado.

A família Buthidae inclui quatro subfamílias, que são responsáveis pelos casos sérios de picadas por escorpiões pelo mundo: *Isometrinae*, *Buthinae*, *Centrurinae* e *Tityinae* (BÜRCHERL, 1969). Os gêneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Buthotus* e *Heterometrus* pertencem à subfamília Buthinae e são originários da África, principalmente no norte, Oriente Médio e Índia. Escorpiões da subfamília Tityinae (*Tityus*) são originários da América do Sul e Trinidad e Tobago (BÜRCHERL, 1969). A esse último pertencem às espécies responsáveis pelos acidentes humanos: *Tityus serrulatus*, o mais importante, seguido por *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus*, *Tityus obscurus* e *Tityus trivittatus* (Figura 2).



**Figura 2.** Espécies do gênero *Tityus* responsáveis pelos acidentes humanos: **A.** *Tityus serrulatus* (Arquivo Instituto Butantan); **B.** *Tityus bahiensis* (Arquivo Instituto Butantan); **C.** *Tityus stigmurus* (<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/escorpionideos.htm>); **D.** *Tityus trivittatus* (<http://200.189.113.52/Saudeambiental/animais/galeria/escorpioes.html>) e **E.** *Tityus obscurus* (retirado de <http://scorpionforum.darkbb.com>).

As espécies *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* são as espécies mais comuns e responsáveis pela grande maioria dos acidentes escorpiônicos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). São animais que podem atingir até sete cm de comprimento e possuem algumas diferenças morfológicas evidentes. A cor predominante do *T. serrulatus* é o amarelo,

sendo que no quarto segmento da cauda, possui duas fileiras de serrilhas, o que caracteriza esta espécie. Já a cor predominante do *Tityus bahiensis* é o marrom escuro, sendo que as tíbias dos palpos possuem manchas nítidas, também escuras.

A espécie em questão no presente estudo, *Tityus serrulatus*, também conhecido como escorpião amarelo, tem seu nome originado pela presença de dentes proeminentes que formam cristas dorsais dos segmentos III e IV da cauda, formando uma estrutura que se assemelha a uma “serra”. A espécie possui como características: elevado potencial de expansão por ter grande habilidade de dispersão; alto potencial reprodutivo (partenogênese) e grandes reservas populacionais. Sendo assim, representa um grave problema de saúde pública no Brasil já que podem ser observados casos de acidente em 80% dos estados brasileiros (MARCUSSEI et al., 2011).

## 2. VENENOS DE ESCORPIÃO

Escorpionismo é o processo de envenenamento causado pela picada de escorpiões. A dor local é uma constante no escorpionismo humano, ocorre imediatamente após a picada e normalmente, acompanha o aparecimento de parestesias, podendo ser de intensidade variável, de discreta até insuportável (CUPO et al., 1994a).

A gravidade dos acidentes depende de fatores, como a espécie e o tamanho do escorpião, a quantidade de veneno inoculado (MAGALHÃES, 1945), a massa corporal do acidentado e a sensibilidade do paciente ao veneno. No entanto, a idade e o peso do paciente tem sido demonstrados como os principais fatores prognósticos da gravidade e óbitos (crianças abaixo de 14 anos) (AZEVEDO et al. 1994; CUPO et al., 1994a).

Os escorpiões distribuem-se por todo o país, e calcula-se por volta de 8000 casos anuais de acidentes, sendo que os estados de Minas Gerais e de São Paulo concentram cerca de 50% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Porém, acidentes por escorpiões no Brasil são considerados de importância médico-sanitária, não só pela incidência, mas também pela potencialidade do veneno de algumas espécies por determinar severos quadros clínicos, às vezes fatais, principalmente em crianças (BÜCHERL, 1969). Todos os escorpiões de interesse médico no Brasil estão agrupados no gênero *Tityus* e, dentre eles, as três espécies mais importantes são *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*.

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde publicado em junho de 2009, foram registrados 37.862 casos de escorpionismo, distribuídos em 2.444 municípios, com uma incidência nacional de 20 acidentes por 100.000 habitantes em 2008. A região com

a maior incidência é a Nordeste (32,6/100.000 hab.), seguida das regiões Sudeste (20,1/100.000 hab.), Norte (13,6/100.000 hab.), Centro-Oeste (10/100.000 hab.) e Sul (3/100.000 hab.). Paralelamente, registros evidenciaram a maior concentração de óbitos nas regiões Nordeste (42) e Sudeste (35) do país. Em 2008, a letalidade foi de 0,23%, sendo que desse total, 53%, ocorreu em menores de 14 anos. Nota-se uma relativa precocidade na evolução fatal, no qual a maioria (62%) ocorre nas primeiras três horas após o acidente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Sabe-se que os venenos dos escorpiões é o resultado da secreção de um par de glândulas, de origem tegumentar situadas no telson. Este tem forma bulbar que termina no agulhão responsável pela inoculação do veneno. A peçonha pode ser obtida por maceração da glândula ou por estimulação elétrica do telson do animal; tem uma aparência mucosa, com aspecto leitoso e solúvel em água (GUARNIERI et al., 1998).

Estudos pioneiros como o de Magalhães (1938) demonstrou que peçonha escorpiônica é neurotrópica e neurotóxica, ao demonstrar a ação do veneno de *T. serrulatus* sobre os núcleos vagais, postulando que o processo de intoxicação deveria se caracterizar por lesões bulbares.

Somente após Gomez e Diniz (1966) isolarem, a partir do veneno bruto de *T. serrulatus*, uma fração purificada (tityustoxina), foi realizado uma série de pesquisas sistemáticas levando à demonstração da natureza periférica das ações das toxinas. Atualmente, sabe-se que as toxinas de escorpião agem em canais iônicos no sistema nervoso periférico, liberando mediadores químicos como acetilcolina e catecolaminas (MARCUSSEI et al., 2011).

## 2.1 Toxinas escorpiônicas

As abordagens clássicas de identificação e caracterização de compostos bioativos em venenos de escorpião foram baseadas em estudos de função e estrutura, dirigidos pela capacidade das toxinas em induzir efeitos farmacológicos conspícuos (PIMENTA et al., 2001). Essas abordagens têm sido criadas com um sólido conhecimento sobre os efeitos fisiológicos e sobre a estrutura de várias toxinas de escorpião (POSSANI et al., 2000; PIMENTA et al., 2001; DE LA VEGA e POSSANI, 2005; DE LIMA et al., 2007).

Sabe-se que os efeitos farmacológicos induzidos pelo veneno são decorrentes de ações complexas em sítios específicos de canais iônicos, com subsequente despolarização das terminações nervosas pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático, havendo

assim, liberação maciça de neurotransmissores, principalmente adrenalina, noradrenalina e acetilcolina (CUPO et al., 1994a; HERING et al., 1997).

A parte solúvel dos venenos escorpiônicos é uma mistura complexa composta de muitas proteínas básicas de baixa massa molecular (representam 30-75% da secreção obtida pela estimulação elétrica) (POSSANI et al., 1977; GOYFFON E KOVOOR, 1978), aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídeos, amins biogênicas e nucleotídeos, sendo desprovida de atividade proteolítica, hemolítica, colinesterásica, fosfolipásica e fibrinolítica (ZLOTKIN, 1978; POSSANI, 1984).

Dentre as proteínas conhecidas dos venenos de escorpiões, a proteína hialuronidase já foi bem caracterizada nas espécies *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *Palamneus gravimanus* (DINIZ e GONÇALVES, 1960; POSSANI et al., 1977; WRIGHT et al., 1977). Essa proteína pode contribuir para toxicidade do veneno e ajudar a difundir as toxinas pelos tecidos (WRIGHT et al., 1977). A peçonha de *Leirus quinquestriatus* possui serotonina (ADAM e WEISS, 1958) e a do *P. gravimanus* contem histamina, como os compostos mais abundantes destes venenos (ISMAIL et al., 1975).

A maioria das toxinas do escorpião contém três ou quatro pontes dissulfeto e podem interagir com tipos/sub-tipos específicos de canais iônicos (TYTGAT et al., 1999; POSSANI et al., 2000; ZENG et al., 2001; GOUDET et al., 2002).

Segundo Marcussi e colaboradores (2011) são conhecidas dez famílias de peptídeos e proteínas, os quais incluem: toxinas ligadas a canais de potássio, toxinas que agem em canais de cálcio, canais de sódio, canais de cloro, peptídeos antimicrobianos e citolíticos. Além disso, também foram identificadas 12 famílias atípicas de proteínas e/ou peptídeos, nas quais fosfatases ácidas e peptídeos diuréticos estão inclusos (YIBAO MA et al., 2010).

## **2.2 Classificação das toxinas escorpiônicas**

### **2.2.1 Toxinas com ação em canais iônicos**

Canais iônicos voltagem-sensíveis são componentes cruciais para a atividade das células. Tratam-se de proteínas integrais de membrana que permitem a passagem seletiva de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e são responsáveis pela geração e propagação de sinais elétricos em neurônios e outras células excitáveis.

Os canais iônicos mudam sua conformação para fechado, inativado ou aberto de acordo com a voltagem da membrana, permitindo um movimento rápido de íons específicos.

Desta forma, correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, gerando despolarização ou hiperpolarização da membrana (CATERRAL, 1984).

Levando em conta o crucial papel biológico destes canais iônicos, toxinas que interagem seletivamente com estes canais têm sido utilizadas como ferramenta para o estudo de propriedade físico-químico e estrutural, além de permitir a identificação dos vários modelos de canais existente e seus papéis fisiológicos nos diferentes tipos celulares (HILLE, 1992).

Um exemplo da importância biológica destas estruturas fica evidenciado em frase citada por Marcussi e colaboradores (2011): “Sinais elétricos controlam a contração muscular, secreção de hormônios, sensações provenientes do ambiente, processamento de informações no cérebro e sua saída do cérebro para tecidos periféricos. Nas células excitáveis, sinais elétricos também têm uma influência importante no metabolismo intracelular, transdução de sinal, expressão gênica, síntese e degradação proteica. Em todos estes contextos, sinais elétricos são conduzidos por canais iônicos. Além disso, os membros dessa superfamília de proteínas são cruciais na manutenção da homeostase iônica dos rins e em muitos tipos de células. Participam também das vias de sinalização por cálcio em células não excitáveis”.

Venenos de escorpião são estudados principalmente por apresentarem ampla variedade de toxinas que atuam nestes diferentes canais iônicos. De acordo com a sua especificidade de ligação aos canais iônicos, as toxinas de venenos de escorpiões podem ser divididas em quatro famílias diferentes: i) as que agem em canais de íons  $\text{Na}^+$  (CATTERALL, 1980), geralmente constituídos de peptídeos longos (60-70 aminoácidos) (ZLOTKIN et al., 1978; ROCHAT et al., 1979); ii) as que agem em canais de íons  $\text{K}^+$  (CARBONE et al., 1982; MILLER et al., 1985), geralmente constituídos de pequenos peptídeos, apresentando até 40 resíduos de aminoácidos (MILLER et al., 1985); iii) as que agem em canais de íons  $\text{Cl}^-$  (DEBIN et al., 1993); iv) as que agem em canais de íons  $\text{Ca}^{+2}$  (VALDIVIA e POSSANI, 1998), geralmente formando um grupo heterogêneo, composto por toxinas de cadeia tanto longa quanto curta (VALDIVIA et al., 1992; MOSBAH et al., 2000; OLAMENDI-PORTUGAL et al., 2005).

Embora não exista similaridade de sequência entre estes grupos, todos compartilham uma estrutura secundária composta por uma ou duas hélices- $\alpha$ , e de 2 a 3 folhas- $\beta$  (MILLER et al., 1985). Essa estrutura contém um motivo de hélice- $\alpha$  estabilizado por cisteína (CSH), que envolve a sequência Cys-X-X-Cys na hélice- $\alpha$  ligada por duas pontes dissulfeto com Cys-X-Cys na folha- $\beta$  (KOBAYASHI et al., 1991).

### 2.2.1.1 Toxinas que agem nos canais para íons sódio

Constituem-se de peptídeos de 58 a 76 resíduos de aminoácidos (massa molecular variando de 6,5 a 8,5 kDa). Possuem estrutura secundária comum na forma  $\beta\alpha\beta$ . A estrutura central é rígida e sustentada por três pontes dissulfeto conservadas e uma quarta que pode ter no mínimo três arranjos diferentes (DE LA VEGA e POSSANI, 2005). Até o momento foram descritas cerca de 230 estruturas de toxinas de escorpião que agem em canais de sódio e que são oriundas de 40 espécies distintas (ZHIJIAN et al., 2006).

Com base em estudos eletrofisiológicos, toxinas de escorpiões que interagem com canais de íons  $\text{Na}^+$  foram classificadas em três tipos:  $\alpha$ ,  $\alpha$ -like e  $\beta$ -toxinas. As toxinas  $\alpha$ -toxinas (por exemplo, AaHII de *Androctonus australis*) retardam ou bloqueiam a inativação do canal de íons  $\text{Na}^+$ , num mecanismo dependente de voltagem, enquanto que as  $\beta$ -toxinas (por exemplo, CN2 de *Centruroides Noxius*) afetam a ativação do canal de íons  $\text{Na}^+$ , independentemente do potencial de membrana (COURAUD et al., 1982). O terceiro tipo,  $\alpha$ -like toxinas (por exemplo, LqhIII de *Leiurus quinquestriatus*) induz corrente de sódio, mas não competem para ligação com AaHII (GORDON e GUREVITZ, 2003). As toxinas  $\alpha$ - e  $\alpha$ -like se ligam ao sítio 3, enquanto que as  $\beta$ -toxinas se ligam ao sítio 4 (JOVER et al., 1984).

Segundo Bosmans e Tytgat (2007), as  $\alpha$ -toxinas são muito tóxicas para mamíferos (por exemplo, AaHII de *Androctonus australis*, Lqh II de *Leiurus quinquestriatus*) e muito ativas no cérebro dos mamíferos (relatos de LD50 entre 0,5 e 20 ng por 20g de peso corporal por injeção intracerebroventricular (icv) em ratos) e ligam-se com elevada afinidade aos sinaptossomos de rato (LEGROS et al., 2005).

$\beta$ -toxinas são ainda classificadas em toxinas depressoras e toxinas excitatórias. Toxinas depressoras induzem um bloco de potenciais de ação, enquanto que as toxinas excitatórias causam uma atividade repetitiva sobre os canais de íons  $\text{Na}^+$  da membrana do axônio (ZLOTKIN et al., 1985). Após a ligação ao sítio-4,  $\beta$ -toxinas deslocam a dependência da voltagem da ativação do canal na direção hiperpolarizante (CATTERALL, 2000). Essas toxinas são divididas em vários grupos de acordo com a sua preferência por canais de sódio de inseto ou de mamíferos e os sintomas que eles evocam em insetos:

(i)  $\beta$ -toxinas Anti-mamíferos, como CN2 isolada de *Centruroides Noxius* (PINTAR et al, 1999), são altamente tóxicas para os mamíferos e modulam a ativação de canais de sódio no cérebro de mamíferos. Toxinas deste grupo foram isoladas principalmente de escorpiões do "Novo Mundo" (do Norte e América do Sul) (POSSANI et al., 1999).

(ii) Toxinas anti-insetos, excitatórias são desprovidas de qualquer atividade em mamíferos, mesmo quando injetadas em quantidades de miligramas em ratos (DIANOUS et

al., 1987). Elas são constituídas por 70-76 resíduos de aminoácidos, e uma das suas ligações dissulfeto é deslocada em relação aos outros de cadeia longa (OREN et al., 1998). Toxinas excitatórias tais como Lqh-xtrIT isolada de *Leiurus quinquestriatus* (REGEV et al., 2003), induzem paralisia causada por atividade repetitiva de nervos motores, que resultam da ativação de correntes de sódio em mais potenciais de membrana negativos (FROY et al., 1999). A seletividade de toxinas excitatórias a insetos destaca-os como fontes de potenciais inseticidas.

(iii) Toxinas depressoras Anti-insetos, tais como a toxina Lqh-dprIT3 (KARBAT et al., 2006) induzem paralisia após a injeção em insetos. Em condições de fixação de corrente em preparações de axônios isolados, suprimem potenciais de ação devido a uma forte despolarização da membrana do axônio (STRUGATSKY et al., 2005).

(iv) Toxinas ativas em canais de sódio de insetos e de mamíferos, tais como Ts1, isolada de *T. serrulatus* (PINHEIRO et al., 2003), induzem efeitos depressores após injeção em larvas de mosca varejeira. Estas toxinas competem pelos sítios de ligação, excitatório e depressor da toxina, sobre os canais de íons Na<sup>+</sup> de insetos (COHEN et al., 2006), assim como pelo sítio de ligação da  $\beta$ -toxina anti-mamíferos em sinaptossomos de cérebro de rato (GORDON et al., 2003).

Na Figura 3 pode ser visualizado um exemplo de como as  $\beta$ -toxinas são agrupadas e classificadas de acordo com o alinhamento de suas sequências primárias (GUREVITZ et al., 2007).

<b>Anti-Mamíferos</b>	
Cn2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGND--YCLRECKQQYGKGGGYCYA--FACWCTHLYEQAVVWPLPNKRC
Cn3	KEGYLVELGTGCKYECFKLGDND--YCLRECKARYGKGGGYCYA--FGCWCTQLYEQAVVWPLKNKTCR
Css2	KEGYLVSKSTGCKYECCLKLGND--YCLRECKQQYGKSSGGYCYA--FACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
Css4	KEGYLVNSYTGCKFECLKLGND--YCLRECRQQYGKSSGGYCYA--FGCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
<b>Anti-inseto excitatória</b>	
Bj-xtrIT	KKNGYPLDRNGKTTECSGVNAIAPHYCNSECTKVYVAESGYCCWGACYCFGLEDDKPIGPMKIDITKKYCDVQIIPS
AahIT1	KKNGYAVDSSGKAPECLLSN-----YCNNECTKVHYADKGYCCLLSCYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTTIIN
LqqIT1	KKNGYAVDSSGKAPECLLSN-----YCYNECTKVHYADKGYCCLLSCYCFVGLSDDKKVLEISDARKKYCDFVTIN
Lqh-xtrIT	KKNGFAVDNSNGKAPECFPDH-----YCNSECTKVYVAEKGYCCLLSCYCFGLNDDKKVLEISDTTKKYCDFTIIN
BmK IT-AP	KKNGYAVDSSGKVAECLFNN-----YCNNECTKVYADKGYCCLLKYCFGLLDDKPVLDIWDSTKNYCDVQIIDLS
<b>Anti-inseto Depressora</b>	
LqhIT2	DGYI--KRRDGCKVAC--LIGNEG---CDKECKAYGGSY--GYCWTWGLACWCEGLPDDKT-WKSETNTCG
LqhdprIT3a	DGYIRG---DGCKVSC--VINHFV---CDNECKAAGG--SYGYCWAWGLACWCEGLPAERE-WKYETNTCG
BjIT2	DGYIRKK--DGCKVSCIIGNEG---CRKECVAHGG--SFGYCWTWGLACWCENLPD-AVTWKSSTNTCGR
BaIT2	DGYIRRR--DGCKVSCVLFNEG---CDKECKAYGG--SYGYCWTWGLACWCEGLPDD-KTWKSETNTCG
LqqIT2	DGYIRKR--DGCKLSCVLFNEG---CNKECKSYGG--SYGYCWTWGLACWCEGLPDD-KTWKSETNTCG
BotIT2	DGYIKGYK--GCKITCVINDD---YCDTECKAEGG--TYGYCWKWGLACWCEDLPDE-KRWKSETNTC
<b>Anti-inseto e Anti-Mamifero</b>	
Lqhb1	DNGYLLNKATGCKVWC--VINNAS---CNSECKLRRGNY--GYCYFWKLACYCEGAPKSE-LWAYATNKN
Ts1	KEGYLMDHE-GCKLSC--FIRPSG--YCGRECGIKKGS--GYCYA-WPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC
Tz1	KDGYLVGND-GCKYSC--FTRPPT--YCANECNRVKGKD--GYCYA-WMACYCYSPMNVWKTWDRATNRCGR

**Figura 3.** Alinhamento de seqüências de  $\beta$ -toxinas que representam quatro diferentes grupos farmacológicos. Todos os resíduos de cisteína estão sombreados e estão todos envolvidos na formação de pontes dissulfeto. Os traços indicam espaços introduzidos para maximizar o alinhamento. CN2 e CN3,  $\beta$ -toxinas de *Centruroides Noxius*; CSS2 e Ccss4,  $\beta$ -toxinas de *Centruroides suffusus suffusus*; Bj-xtrIT de *Buthotus judaicus* toxina excitatória para células de inseto; AahIT1 de *Androctonus australis* toxina que atua em células de insetos; LqqIT1 de *Leiurus quinquestriatus*; Lqh-xtrIT de *Leiurus quinquestriatus*; BMK TI-AP, toxina excitatória de *Buthus martensii Karsch*; LqhIT2, toxina depressora de *L. q. Hebraeus*; LqhdprIT3a, toxina depressora de *L. q. Hebraeus*; BjIT2, toxina depressora de *B. judaicus*; BaIT2, toxina depressora de *Buthacus arenicola*; LqqIT2, toxina depressora de *Leiurus quinquestriatus*; BotIT2, toxina depressora de *Buthus occitanus tunetanus*; Lqhb1, de *L. q. Hebraeus*; Ts1,  $\beta$ -toxina de *Tityus serrulatus*; TZ1,  $\beta$ -toxina de *Tityus zulianus* (BORGES et al., 2004). Todas as seqüências citadas aparecem em Possani e colaboradores (1999).

Ao longo das últimas décadas, demonstrou-se que as ações das toxinas em sítios específicos dos canais de íons  $\text{Na}^+$  são os principais causadores dos efeitos induzidos pelas peçonhas de escorpiões. Em decorrência disso, há liberação de catecolaminas e acetilcolina, as quais atuam em diferentes receptores em diversos tecidos da presa/vítimas dos escorpiões, sendo que a liberação massiva destes tipos de neurotransmissores responsáveis pela maioria dos sintomas observados no envenenamento escorpiônico (Marcussi et al., 2011).

### 2.2.1.2 Toxinas que agem nos canais para íons potássio

Canais de íons  $\text{K}^+$  são macromoléculas incorporadas em membranas biológicas e que desempenham um papel-chave na excitabilidade celular e em vias de transdução de sinal. Características farmacológicas e estruturais destes canais foram elucidadas, utilizando-se os bloqueadores de canais de alta afinidade isolados de venenos de escorpiões. Canais para íons

$K^+$  podem ser divididos em dois grandes grupos: canais dependentes de voltagem, e canais dependentes de ligantes, sendo importantes em diversos processos fisiológicos tais como excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios, regulação da secreção de fluidos, ativação de linfócitos, dentre outros (MARCUSSEI et al., 2011).

Entre as toxinas de escorpiões, aquelas que atuam em canais de íons  $K^+$  são as mais divergentes em estrutura primária, atividade e especificidade (CAMARGOS et al., 2011; COLOGNA et al., 2011; MAO et al., 2007). As toxinas que agem em canais de íons  $K^+$  (geralmente denominadas por KTx) são compostas de 20-70 resíduos de aminoácidos, sendo que a maioria apresenta menos de 40 resíduos em suas sequências. Essas toxinas apresentam alta diversidade em sua sequência de aminoácidos e são formadas por 3 ou 4 pontes dissulfeto. Aproximadamente 140 estruturas foram descritas (DE LA VEGA e POSSANI, 2004). A nomenclatura destas toxinas está bem consolidada e foi inicialmente proposta por Tytgat e colaboradores (1999). Ela se baseia no tamanho molecular, localização dos resíduos de cisteína e a similaridade de suas estruturas primárias. A partir destes critérios são divididas em três famílias:  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx e  $\gamma$ -KTx (TYTGAT et al., 1999). Recentemente, uma nova família de toxinas que agem fracamente em canais de potássio foi identificada no veneno de escorpião e foram designadas como  $\kappa$ -KTx (NIRTHANAN et al., 2005).

A assinatura estrutural destes peptídeos é definida pela presença de um motivo  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteína (CS- $\alpha/\beta$ ), na qual duas pontes dissulfeto,  $C_i-C_j$  e  $C_{i+4}-C_{j+2}$ ; se ligam covalentemente a um segmento de  $\alpha$ -hélice com um curto segmento de estrutura em folha- $\beta$ . Das sequências descritas, o peptídeo Tc1 de *Tityus cambridgei* é o mais curto, tendo apenas 23 resíduos (BATISTA et al., 2000), e  $\beta$ -KTX, AaTXKb e BmTXKb2 são os mais longos, contendo 64 resíduos de aminoácidos cada um (LEGROS et al., 1998 ; ZHU et al., 1999). Uma tabela contendo todas as sequências conhecidas para canais de potássio, suas características, número de aminoácidos e uma análise filogenética do grupo pode ser encontrada em De La Vega & Possani (2004).

Já foram elucidadas várias toxinas peptídicas que atuam sobre canais de íons  $K^+$ . Dentre elas estão: a caribdotoxina, que atualmente é utilizada como ferramenta específica para bloquear canais para íons  $K^+$  de alta condutância e que são ativadas por cálcio (KvCa) (CARBONE et al., 1982) e a noxiustoxina, que bloqueia canal para  $K^+$  retificador tardio (GIMENEZ-GALLEGO et al., 1988).

Essa classe de toxinas escorpiônicas apresenta pouca importância toxicológica, mas associadas com outras toxinas, como por exemplo, aquelas que atuam em canais de íons  $Na^+$ ,

elas propiciam potente ação tóxica à peçonha em decorrência do efeito sinérgico (GWEE et al., 2002).

### 2.2.1.3 Toxinas que agem nos canais para cloreto

Polipeptídeos de baixa massa molecular, compostos por 35-38 aminoácidos e compostos por 4 pontes dissulfeto. A estrutura primária destas toxinas apresenta similaridade de 50-74% e a localização das cisteínas é conservada. As toxinas de escorpiões que agem em canais de íons  $\text{Cl}^-$  incluem: I1, Ammp2, I3, I4, I5, I5A, peptídeos IBs, clorotoxina, Lqh-8/6, PBITx1, BmKCT, Bs8 e Bs14 (TYTGAT et al., 1998; ZENG et al., 2000).

A clorotoxina, isolado de *Leiurus quinquestratus*, possui 36 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto. A análise dos dados de RMN mostra que a estrutura é constituída por três pequenas folhas- $\beta$  antiparalelas embaladas por uma  $\alpha$ -hélice. Três ligações dissulfeto (Cys5 - Cys28, Cys16 - Cys33 e Cys20 - Cys35) e a ligação cruzada da  $\alpha$ -hélice para as folhas- $\beta$  seguem o padrão comum encontrado nas outras toxinas pequenas de escorpião. A quarta ponte dissulfeto (Cys2 - Cys19) liga a pequena folha- $\beta$  do lado N-terminal ao restante da molécula (LIPPENS et al., 1995).

### 2.2.1.4 Toxinas que agem nos canais para íons cálcio.

Várias toxinas de escorpiões específicas para canais de íons  $\text{Ca}^{+2}$  foram isoladas: imperitoxinas (IpTxA e IpTxi) do escorpião *Pandinus imperator* (VALDIVIA e POSSANI, 1998) e maurocalcina (Mca) do escorpião *Scorpion maurus palmatus* (FAJLOUN et al., 2000), que ativam o receptor de rianodina (Ryr), um canal de liberação de cálcio intracelular. Caracterizam-se por serem toxinas heterogêneas, sendo observadas diferenças de seqüência de aminoácidos, quantidade de pontes dissulfetos, tamanho e estrutura.

Um exemplo da importância deste tipo de toxina pode ser evidenciado examinando-se os músculos esqueléticos; o controle ideal do movimento voluntário e da produção de força depende da eficácia do processo de excitação e contração de acoplamento do músculo esquelético. A contração de uma fibra do músculo esquelético é rapidamente iniciada e interrompida por alterações na tensão da membrana plasmática, por potenciais de ação. O acoplamento entre a despolarização da membrana e o resultante aumento transitório no citoplasma de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que ativam o mecanismo contrátil é assegurado por dois tipos de proteínas de canais iônicos; estas duas proteínas são os receptores de di-hidropiridina (DHPr), que detectam as variações de voltagem, e o receptor de rianodina (RYr) que libera cálcio do retículo endoplasmático. A abertura e o fechamento do canal de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para os RYr estão

subordinados à tensão dependente de alterações conformacionais dos DHP<sub>r</sub> (POUVREAU et al., 2006).

A toxina maurocalcina age diretamente sobre esse processo biológico, pois é um potente efetor de canal de cálcio rianodina-sensível. A estrutura da maurocalcina imita o segmento de ativação do receptor de di-hidropiridina e, por conseguinte, é potencialmente útil para o estudo de receptores para di-hidropiridina (MOSBAH et al., 2000). A sua estrutura tridimensional é constituída por um núcleo compacto do qual emergem loops e o N-terminal da molécula.

### **2.2.2 Peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBPs).**

Grupo de polipeptídeos ativos recentemente descritos. Variam de tamanho entre 13-50 aminoácidos e apresentam baixos graus de similaridade entre si (LUO et al., 2005; ZENG et al., 2005). Aproximadamente, 17 peptídeos foram descritos: peptídeo T de *Tityus serrulatus* (FERREIRA et al., 1993), peptídeo K12 de *Buthus occitanus* (MEKI et al., 1995), Bs10 de *Buthus indicus* (ALI et al., 1998), pandinina 1 e 2 do *Pandinus imperator* (CORZO et al., 2001), Hadrurina de *Hadrurus aztecus* (TORRES-LARIOS et al., 2000), IsCT e IsCT2 de *Opisthacanthus madagascariensis* (DAI et al., 2001, 2002), parabutoporina de *Parabuthus schlechteri* (VERDONCK et al., 2000), opistoporina 1 e 2 de *Opisththalmus carinatus* (MOERMAN et al., 2002), BmKbpp, BmKn1, BmKn2, BmKa1, Bmka2 e BmKb1 de *Buthus martensii Karsch* (ZENG et al., 2001, 2004). Funcionalmente, a maioria dos peptídeos de escorpiões sem pontes dissulfeto está envolvida na potenciação da bradicinina, poder antimicrobiano, iniciação da sinalização molecular da célula, modulação da resposta imune, dentre outras ações (PIMENTA et al., 2001).

Em Zeng e colaboradores (2005) uma síntese dos peptídeos sem pontes dissulfeto é apresentada, correlacionando atividade biológica e número de resíduos de aminoácidos (Tabela 1). Além disso, uma comparação entre as sequências primária destes peptídeos é apresentada pelo alinhamento das sequências baseado na atividade farmacológica e tamanho dos peptídeos, permitindo a análise das similaridades e sugerindo a classificação dos peptídeos em 6 subfamílias (Figura 4).

**Tabela 1.** Panorama dos peptídeos sem pontes dissulfeto descritas até 2005 \*

<b>Peptídeo</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>Atividade biológica</b>
<b>Peptide T</b>	13	BP
<b>K12</b>	21	BP
<b>Bs10</b>	34	UN
<b>Hadrurin</b>	41	AM, HL
<b>Parabutoporin</b>	45	AM, IM, HL
<b>BmKbpp</b>	47	AM
<b>Pandinin1</b>	44	AM, HL
<b>Opistoporin1</b>	44	AM, IM, HL
<b>Opistoporin2</b>	44	AM
<b>Pandinin2</b>	24	AM, HL
<b>BmKb1</b>	18	AM
<b>BmKn1</b>	13	UN
<b>IsCT</b>	13	AM, HL
<b>IsCT2</b>	13	AM, HL
<b>BmKn2</b>	13	AM
<b>Bmka1</b>	37	UN
<b>BmKa2</b>	50	UN

(\*) **BP**, peptídeo potencializador de bradicinina; **AM**, peptídeo antimicrobiano; **HL**, peptídeo hemolítico; **IM**, peptídeo modulador de resposta imune, e **UM**, peptídeo sem função conhecida. Modificado de Zeng e colaboradores (2005).

Subfamília		
1	peptideT	KKDGYP-WEYDR---AY----
	K12	LRDYANRWINGGPVEAAGPPA
2	Bs10	VTMGYIKDGDGKKIAKKNKNGRKHVEIDLNKVG
3	Hadrurin	-GILKTIKSIASKVWNSKTWQKLRKKGINWVANKLGVSPQAA-----
	Parabutoporin	----FKLGSFLKKAKKSKLAKKLRAGKEMLDYAKGLLEGGEVPGQ--
	BmKbpp	----FRFGSFLKKVQKSKLAKKLRSGKQLLDYANKVNLNGPEEEAAAFAE
	Pandinin1	GKVWIKWIKSAAKKIWSSEPVSQLEKQVQLNAAKNYVAEKIGATPT-----
	Opistoporin1	GKVWIKWIKSTAKKLNSEPVKELEKNTALNAAKNLVAEKIGATPS-----
	Opistoporin2	GKVWIKWIKSTAKKLNSEPVKELEKNTALNAAKNFVAEKIGATPS-----
4	Pandinin2	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD-
	BmKb1	-----FLFSLIPSAISGLISAFK
5	BmKn1	FIGAVAGLLSKIF
	IsCT	ILGKIWEGIKSLF
	IsCT2	IFGAIWNGIKSLF
	BmKn2	FIGAIARLLSKIF
6	BmKa1	--ESEEN-----EEGSMESGKSTEAKNTDASVDN-----EDSDIDGDS
	BmKa2	YPAEMDNYDDALEELDMLDLDDYFDLEPADFVLLDMUANMLESDFDDME

**Figura 4.** Classificação simplificada para os peptídeos sem ponte dissulfeto, com base em suas atividades farmacológicas e similaridade de comprimento dos peptídeos. Gaps foram introduzidos para melhorar o alinhamento. Resíduos de aminoácidos idênticos são destacados em preto, os resíduos comuns apenas para os membros parciais da subfamília estão destacados em cinza. O Peptídeo T isolado de *Tityus serrulatus* (FERREIRA et al., 1993), Peptídeo K12 isolado de *B. occitanus* (MEKI et al., 1995), Bs10 isolado de *B. indicus* (ALI et al., 1998), Pandinin 1 e 2 isolados de *P. imperator* (CORZO et al., 2001), Hadrurin isolado de *H. aztecus* (TORRES-LARIOS et al., 2000), IsCT e IsCT2 isolados de *O. madagascariensis* (DAI et al., 2001), Parabutoporin isolado de *P. schlechteri*, Opistoporin 1 e 2 isolados de *O. carinatus* (VERDONCK et al., 2001; MOERMAN et al., 2002) e BmKbpp, BmKn1, BmKn2, BmKa1, BmKa2 e BmKb1 isolados de *B. martensii* (ZENG et al., 2000; ZENG et al., 2001; ZENG et al., 2004).

A maioria dos NDBPs de escorpiões são anfipáticos e catiônicos, como IsCT, IsCT2, BmKn1, BmKn2, BmKbpp, BmKb1, *Pandinin 1*, *Pandinin 2*, *Opistoporin 1*, *Opistoporin 2*, *Parabutoporin* e *Hadrurin*. BmKn1, BmKn2 e BmKb1, IsCT e IsCT2 contém uma região  $\alpha$ -hélice, resíduos 2-11, 2-11 e 2-16, respectivamente, e duas regiões *random coiled* flexíveis (ZENG et al., 2004). *Parabutoporin* apresenta estrutura  $\alpha$ -hélice nos resíduos 6-35 (MOERMAN et al., 2002). *Opistoporin 1* e 2 contém duas regiões  $\alpha$ -hélice, resíduos 3-14 e 20-39, separado por uma região *random coiled* (WNSEP) (VERDONCK et al., 2000). Modelos para *Parabutoporin* e *Opistoporin 1* foram confirmados por estudo de dicroísmo circular (ZENG et al., 2000). BmKa1 BmKa2 são peptídeos altamente ácidos: BmKa1 é composto por 100% de estrutura *coiled coil*, ao passo que BmKa2 contém três regiões helicoidais aleatórias separadas por duas curtas regiões  $\alpha$ -hélice (ZENG et al., 2004). O Peptídeo T é um peptídeo com uma estrutura altamente hidrofílico e estrutura 100% *coil coiled*. O Peptídeo K12 contém uma estrutura de  $\alpha$ -hélice na sua região N-terminal e estrutura em *coil coiled* em sua porção C-terminal. Já o Peptídeo Bs10 apresenta estrutura secundária única, composta de 25%  $\alpha$ -hélice, 37% folhas- $\beta$  e 38% de estrutura *coil coiled* revelada por dicroísmo circular (ALI et al., 1998).

### 2.3 Análise proteômica de venenos de escorpião

Como nas décadas de 60 a 80, o sequenciamento de proteínas era uma técnica de difícil acesso, várias toxinas foram purificadas, mas poucas foram sequenciadas completamente ou parcialmente. Recentemente, abordagens proteômicas têm sido empregadas no estudo de venenos de escorpião (PIMENTA et al., 2001; GOUDET et al., 2002; PIMENTA et al., 2003; BATISTA et al., 2007; BORGES e ROJAS-RUNJAIC, 2007; SCHWARTZ et al., 2007; BRINGANS et al., 2008) e demonstram uma variedade de toxinas distintas.

O perfil proteômico do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* por Pimenta e colaboradores (2001) foi realizado por meio da separação do veneno primeiramente por cromatografia de exclusão molecular resultando em duas frações principais. Cada uma dessas frações foi submetida a MALDI-ToF, LC-ESI-MS e LC-MALDI-ToF para aquisição de dados de *fingerprint*. Uma das frações correspondeu a 90% do veneno e foi caracterizada como contendo compostos de massa molecular entre 6500 e 7500 Da, sendo toxinas de cadeia longa, principalmente toxinas que atuam sobre canais de íons Na<sup>+</sup>. A segunda fração (10% do veneno bruto) apresentou compostos de massa molecular entre 2500 e 5000 Da, sendo composta por toxinas que atuam sobre canais de íons K<sup>+</sup> e outros peptídeos desconhecidos.

A análise das proteínas do veneno do escorpião *Tityus stigmurus* foi realizada por meio do fracionamento por cromatografia líquida de fase reversa (HPLC) e os componentes foram analisados por ESI-MS em espectrômetro de massas do tipo *ion trap*. Uma centena de componentes distintos foram detectados, com massas moleculares variando entre 216.5 e 44.800 Da. Quinze novos componentes foram isolados e sequenciados, como por exemplo, a toxina Tst-3 (semelhante às toxinas que atuam sobre canais de íons Na<sup>+</sup>), Tst-17 (semelhante à Tc1 que age sobre canais para K<sup>+</sup>), TstβKTx (um peptídeo com sequência idêntica à de TsTX-Kβ, toxina anteriormente descrita para *T. serrulatus*) e um peptídeo rico em prolina de função desconhecida. Além disso, foram identificadas e parcialmente sequenciadas as proteínas hialuronidase e lisozima (BATISTA et al., 2006).

As hialuronidas constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação de ácido hialurônico, um polissacarídeo encontrado principalmente na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos frouxos. É frequentemente referida como “fator de espalhamento”, pois tem a capacidade de hidrolisar ácido hialurônico e sulfato de condroitina A e C, facilitando a difusão de toxinas através dos tecidos da vítima da ferroadada. Em veneno de escorpião a enzima foi descrita pela primeira vez em 1977 por Possani e colaboradores no veneno de *T.*

*serrulatus*. Em 2001, Pessini e colaboradores isolaram a enzima por cromatografia de troca-iônica em CM-celulose.

Outra classe de proteína descrita para veneno de escorpião são as proteases, encontradas em muitos venenos de outros grupos animais. Almeida e colaboradores (2002) descreveram proteases com atividade gelatinolítica em veneno de *T. Serrulatus* e *T. bahiensis* e sugeriram que seriam serino proteases, uma vez que só o inibidor de protease do tipo PMSF inibiu a atividade proteolítica dessas proteases. Segundo Martin-Euclaire e colaboradores (1994) essas proteases podem estar envolvidas no processamento pós-traducional de toxinas do veneno, sugerindo que alguns precursores da peçonha de *T. serrulatus* podem sofrer modificações pós-traducionais por proteases, como as exopeptidases.

Em síntese, dez perfis proteômicos são conhecidos: seis pertencentes à espécies Sulamericanas, do gênero *Tityus* (*Tityus serrulatus* (PIMENTA et al., 2001), *Tityus cambridgei* (BATISTA et al., 2004), *Tityus costatus* (DIEGO GARCIA et al., 2005), *Tityus pachyurus* (BARONA et al., 2006), *Tityus discrepans* (BATISTA et al., 2006) e *Tityus stigmurus* (BATISTA et al., 2007)); quatro espécies do Velho Mundo do gênero *Androctonus* (*Androctonus crassicauda* (CALISKAN et al., 2006) e *Androctonus mauretanicus* (OUKKACHE et al., 2008)) e *Opisthacanthus cayaporum* (SCHWARTZ et al., 2008) e *Liocheles australasiae* (MIYASHITA et al., 2007).

#### **2.4 Nomenclatura de toxinas escorpiônicas**

Devido a falta de uniformidade na nomenclatura destas toxinas, uma enorme gama de nomes e símbolos foi criada por autores que muitas vezes adotaram diferentes nomes e símbolos para a mesma toxina ou, ainda pior, o mesmo nome para diferentes toxinas. Por exemplo, o termo tityustoxin-I (TsTX-I) foi utilizada por Toledo e Neves (1976) para nomear uma toxina isolada do veneno do escorpião *T. serrulatus*, enquanto que o nome Tityustoxin (TsTX) foi mais tarde utilizada por Coutinho Netto e colaboradores (1980) para uma nova toxina isolada a partir deste mesmo veneno. Sampaio e colaboradores (1991) propuseram uma nomenclatura baseada no artigo de Toledo e Neves (1976), ou seja, TsTX seguido de um algarismo romano, para posterior toxinas isoladas, reunindo sob nomes individuais das toxinas mostraram ser idênticos. Mais tarde, o grupo de Possani (BECERRIL et al., 1996), adotou uma nomenclatura semelhante para as toxinas de *T. serrulatus*, mas, a fim de abreviar o nome, utilizou as primeiras letras do nome científico do escorpião e um número consecutivo (Ts1, Ts2, etc). Cada número consecutivo refere-se a uma toxina específica. Embora estas iniciativas tenham sido tomadas, a nomenclatura para as toxinas escorpiônicas permanece

ainda complexa e bastante confusa. Um quadro geral das principais toxinas descritas e elucidadas para o veneno de *T. serrulatus*, suas diversas denominações, sequência de aminoácidos, código de acesso, referência bibliográfica e sua classificação podem ser visualizados na Tabela 3. As toxinas estão organizadas segundo proposto por Cologna e colaboradores (2009).

Em 2009, Tytgat e colaboradores propuseram uma nomenclatura para proteínas e peptídeos que atuam em subfamílias- $\alpha$  de canais de potássio ( $\alpha$ -KTx). A nomenclatura proposta baseia-se no alinhamento dos resíduos de cisteínas e/ou outros resíduos altamente conservados, assim como na análise da árvore filogenética para estas sequências pelo princípio de máxima parcimônia. A partir destas características criou-se uma nomenclatura para as 12 subfamílias de  $\alpha$ -KTx. A nomenclatura proposta pareceu solucionar as diversas redundâncias existentes entre estas subfamílias em termos da mesma toxina possuir diversos nomes, porém a nomenclatura não é aplicável às outras classes de toxinas escorpiônicas, já que os parâmetros utilizados não permitiriam a distinção entre toxinas que atuam em canais de sódio e de potássio, por exemplo.

Um painel geral das principais toxinas já descritas para o escorpião *T. serrulatus* pode ser visualizada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Principais toxinas descritas para o veneno de *T. serrulatus*. Modificado de Cologna et al., 2009.

Toxina	Outras denominações	Sequência em aminoácidos	Código de Acesso	Referência	Classificação
Ts1	TsTX-I; toxin $\gamma$ ; Toxin T2-IV; Toxin Ts7; Ts VII; TsTX-VII; Tityostoxin VII; Toxin III-10; Toxin II-11	KEGYLMDHEGCKLSCFIR PSGYCGRECGIKGSSGY CAWPACYCYGLPNWVK VWDRATNKC	gi 28948988, INPI, 1b7d, gi 5821808	Pinheiro et al. 2003, Polikarpov et al., 1999	$\beta$ -neurotoxina
Ts2	TsTX-III; III-8; Tst2; Toxin II; TsTX-II; Tityus-toxin II; Toxin T1-IV; beta toxin TsII	KEGYAMDHEGCKFSCFIR PAGFCDGYCKTHLKASSG YCAWPACYCYGVDPDHIK VWDYATNKC	gi 55977310, P68410, 1913435A, gi 447155	Possani et al., 1999; Mansuelle ET al., 1992	$\alpha$ -neurotoxina
Ts3	TsTX; Tityustoxin; Toxin IV-5 TsIV-5, Ts IV alpha-toxin; TsIV; Toxin-4; Tityustoxin IV; Toxin IV; Ts III; Toxin-3	KKDGYPVEYDNCA YICW NYDNA YCDKCLKDKKAD SSGYCYWVHILCYCYGLP DSEPTKTNGKC	AAB30413, gi 546246, P45659, gi 1173395	Possani et al., 1991	
Ts5	TsTX-V; Tityustoxin-5; Tityustoxin V; alpha toxin TsTX- V; Ts V; Toxin V	KKDGYPVEGDNCAFACF GYDNA YCDKCLKDKKAD DGYCVWSPDCYCYGLPE HILKEPTKTSGRG	P46115, gi 1173404, AAB34141, gi 998696, 2111234, gi 1096141	Marangoni et al., 1995	Ação sobre canais para K <sup>+</sup>
Ts6	TsTX-IV; $\alpha$ -KTx12.1; alpha- KTx12.1; Butantoxin; BuTX	WCSTCLDLACGASRECY DPCFKAFGRAHGKCMNN KRCRYT	P59936, gi 90111807, 1C56A, gi 159162151, 1C55A, gi 159162150	Novello et al., 1999; Pimenta et al., 2003; Oyama Jr. ET al., 2005; Holaday et al., 2000	
Ts7	TsTX-K $\alpha$ ; Tityustoxin K-alpha; Potassium channel toxin alpha- KTx 4.1; TsII-9; TsTx-K-alpha; TSK4; Toxin II-9	VFINAKRGSPKPKCK EAIGKAAAGKCMNGKCKC YP	1HP2A; gi 14719782; P46114, gi 1173382	Blaustein et al., 1991; Ellis et al., 2001; Rogowski et al., 1994; Possani et al., 1982	legros et al., 1998; Kalapothakis et al.,
Ts8	TstX-K $\beta$ ; TSK2; Tityustoxin K- beta; TsTX-K beta	KLVALIPNDQLRSILKAV VHKVAKTQFGCPAYEGY	P69940, gi 160109980		

						2001	
Ts9	Ts K; Ts Kappa; Neurotoxin Ts-Kappa; TsKappa; 1 TSK	CNDHCNDIERKDGEGHGF KCKCAKD	VVIGQRCYRSPDCYSACK KLVGKATGKCTNGRCDC	1TSK, gi 2392580, 1TSK A, gi 157834016	Legros et al., 1996; Blanc et al., 1997		
Ts15	Ts15; $\alpha$ -Ktx21.1	GKFGKCKPNICAKTCQTE KGKGMGYCNKTECVCS E		P86270	Cologna, 2010		
Ts16	Ts16	GCMKEYCAGQCRGKVSQ DYCLKHKCKIPR		P86271	UniProtKB/Swiss- Prot		
Ts4	TsTX-VI; Tityustoxin-6; Tityustoxin VI; TsTXVI; Toxin VI; Ts VI; TsNTxP	GREGYPADSKGCKITCFL TAAGYCNTECTLKKGSSG YCAWPACYCYGLPESVKI WTSETNKC		P4669; gi 1173399	Marangoni et al., 1990; Sampaio et al., 1996; Chavez- Olortegui et al., 1996		
Ts10	Peptide T	KKDGYVPVEYDRAY		AAB28453, gi 430832	Ferreira et al., 1993; Pimenta et al., 2003		
Ts11	TsPep1; Peptide TsPep1	KPKGLCRYRCCSGGCS GKCVNGACDCS		P0C174, gi 90101747	Pimenta et al., 2003		
Ts13	TsPep3; Peptide TsPep3	TVKCGGCNRKCCPGGRS GKCINGKCCQCY		P0C176, gi 90101747	Pimenta et al., 2003		Outras
Ts14	Hypotensin-1 (TsHpt-I)	AEIDFSGIPEDIKQIKETN AKPPA		P84189, gi 108860778	Verano-Braga et al., 2008		
	Hypotensin-2 (TsHpt-II)	AEIDFSGIPEDIKQIKETN AKPPA		P84190, gi 108860779			
	Hypotensin-3 (TsHpt-III)	AEIDFSGIPEDIKQIKETN AKPP		P844191, gi 108860780			
	Hypotensin-4 (TsHpt-IV)	AEIDFSGIPEDIKQIKETN AKPP		P844192, gi 108860781			

### 3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é um dos métodos mais precisos, rápidos e confiáveis disponíveis para determinar as massas atômica e molecular de analitos com alta precisão em uma única medição. O grande avanço da espectrometria de massas ocorreu a partir da década de 80 com o desenvolvimento das técnicas MALDI e ESI por Hillenkamp e Fenn, respectivamente (GOLDSTEIN, 1886; JOHNSTONE, et al., 1996). Sendo assim, a espectrometria de massa é um poderoso método analítico que tem sido empregado amplamente no estudo de proteínas por ser um método de determinação precisa de massas molares de forma muito precisa em experimentos rápidos (CUNHA, 2006).

#### 3.1 Espectrometria de Massas Seqüencial (MS/MS)

A espectrometria de massas *in tandem*, ou também chamada de MS/MS, envolve múltiplos passos de espectrometria de massas com alguma forma de fragmentação entre dois estágios. Diferentes estágios de separação de moléculas podem ser realizados por meio de elementos individualizados, sendo, portanto separadas no espaço (*tandem in space*) ou podemos ainda ter um espectrômetro de massas único com passos de MS separados no tempo (*tandem in time*).

Sendo assim, a Espectrometria de Massas Seqüencial (MS/MS) de peptídeos envolve a fragmentação dessas moléculas e a posterior análise de sua seqüência de aminoácidos. Para a análise de peptídeos são realizados processos de ionização e fragmentação por meio de Dissociação Induzida por Colisão (*Collision Induced Dissociation – CID*) (TABB et al., 2003), embora outros métodos de fragmentação como *Electron Capture Dissociation (ECD)* e *Electron Transfer Dissociation (ETD)* (SYKA et al., 2004) também tem sido desenvolvidas.

Os espectrômetros de massas mais utilizados para esse tipo de análise, geralmente, possuem mais de um analisador de massas e de diferentes tipos, como por exemplo, no caso dos equipamentos híbridos contendo um analisador do tipo Quadrupolo e um *Time of Flight* (denominado Q-ToF), ou ainda *Ion Trap* combinado com *Time of Flight* (IT-ToF). Nestes casos, os primeiros analisadores de massas isolam o íon alvo dos demais presentes na amostra. O íon selecionado e seus fragmentos passarão para o segundo analisador de massas, onde serão separados de acordo com sua razão massa carga ( $m/z$ ) e levados ao detector.

#### 4. PEPTIDÔMICA

O termo “Peptidômica” foi introduzido em 2001 (CLYNEN et al 2001), e é definido como a tecnologia para a descrição qualitativa e quantitativa de peptídeos de uma determinada amostra biológica (SCHULZ-KNAPPE et al 2001), compreendendo o estudo de todos os peptídeos sintetizados por uma célula, órgão ou organismo (CLYNEN et al 2003).

Sabe-se que peptídeos têm um papel fundamental para todas as funções do corpo nos seres humanos. Foi reconhecido que uma deficiência ou um excesso de peptídeos está diretamente relacionado com o surgimento e a progressão de doenças. Hoje, os peptídeos são ferramentas de pesquisa indispensáveis nas ciências da vida e muitas vezes representam candidatos a drogas em sua forma natural, podendo ainda ser modelos para a concepção de peptídeos modificados e/ou peptídeos miméticos que apresentem melhores perfis farmacológicos (ADERMANN et al., 2004). Paralelamente a isso, tornou-se óbvio que peptídeos bioativos são processados a partir dos seus precursores ribossomais sintetizados por uma maquinaria de enzimas complexas, e as pequenas alterações na estrutura primária podem alterar drasticamente a afinidade e a seletividade do alvo (ADERMANN et al., 2004).

Desde a década de 1970, uma riqueza de peptídeos foi descoberta e investigada e este fluxo parece estar longe de terminar. Na última década a descoberta de novos peptídeos se beneficiou de tecnologias integradas que evoluíram durante o desenvolvimento de abordagens peptidômica e proteômica. Para a identificação estrutural de peptídeos em amostras biológicas complexas, novas tecnologias surgem a fim de aperfeiçoar os métodos ditos clássicos (SCHULZ-KNAPPE et al., 1997). O sucesso das análises atuais é oriundo principalmente de instrumentos altamente sofisticados que permitem a descoberta de peptídeos mesmo na faixa de pico molar. Além disso, novos métodos de bioinformática, como o algoritmo de agrupamento probabilístico para a interpretação de espectros e algoritmos aprimorados para pesquisa de banco de dados permitem o rápido reconhecimento de diferenças significativas entre conjuntos de números grandes de amostras contendo vários gigabytes de dados (WITTKKE et al., 2004).

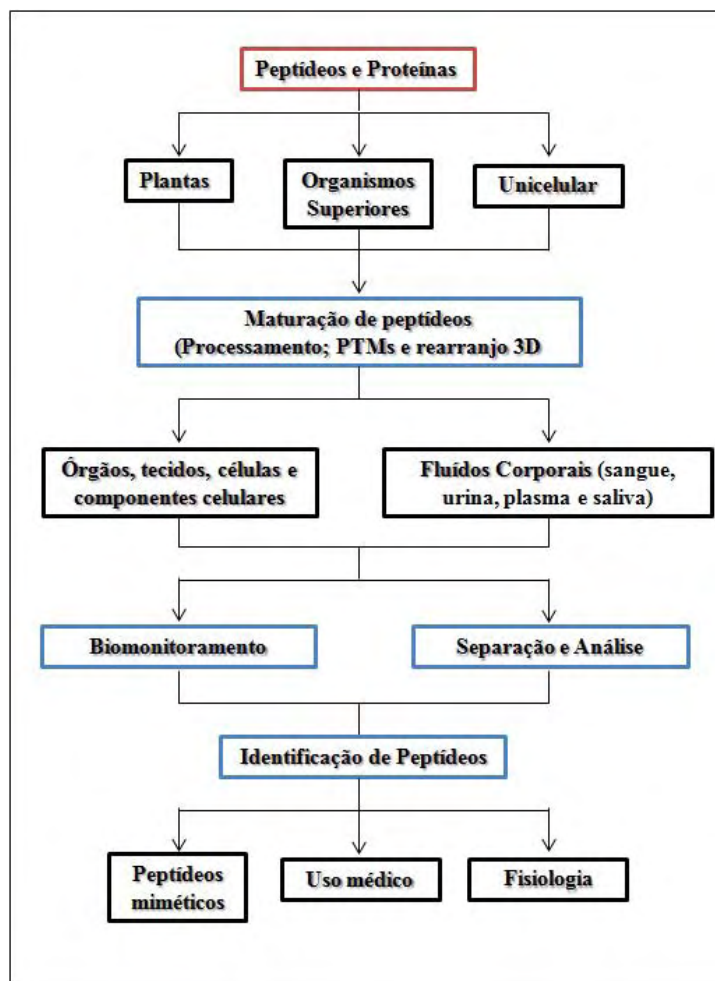
Peptídeos biologicamente ativos foram descobertos a partir de uma ampla variedade de organismos, do reino animal ao vegetal. Exemplos ilustram as fontes de novos peptídeos, as ferramentas utilizadas para a sua identificação e caracterização, e o espectro de atividade, o qual representa sua potencial aplicação (Figura 5) (ADERMANN et al., 2004). Métodos de separação, análise e identificação serão discutidos posteriormente.

Na Figura 5 está representado o mecanismo geral utilizado para a descoberta de peptídeos biologicamente ativos. Naturalmente, os precursores peptídicos são sintetizados por ribossomos e processados em peptídeos maduros. Além disso, os peptídeos podem também ser originados pela clivagem de proteínas. Depois de extraídos dos diversos compartimentos de um organismo, um conjunto de peptídeos ou frações é examinado experimentalmente para uma determinada atividade biológica. Em seguida, as frações que apresentaram alguma atividade biológica são investigadas em termos estruturais por espectrometria de massas e métodos cromatográficos. Peptídeos identificados são investigados quanto a sua importância fisiológica e fisiopatológica, e servem como pistas para aplicações terapêuticas, biotecnológicas ou de diagnóstico. Conhecimentos das propriedades estruturais e biológicas podem ser usados para a busca em banco de dados, para identificar peptídeos correspondentes ou, alternativamente, para a concepção de peptídeos miméticos (NICOLAS et. al, 2003).

Tal como acontece com a identificação de qualquer outra molécula, conhecer a massa molecular de um peptídeo é um passo fundamental no processo de identificação (JONSSON 2001; KARAS et al., 1988). Em muitos casos, no entanto, a complexidade da amostra em termos de espécies de peptídeos requer elevado grau de separação antes da análise por espectrometria de massa. Como em proteoma, a tecnologia de identificação de peptídeos é a espectrometria de massa.

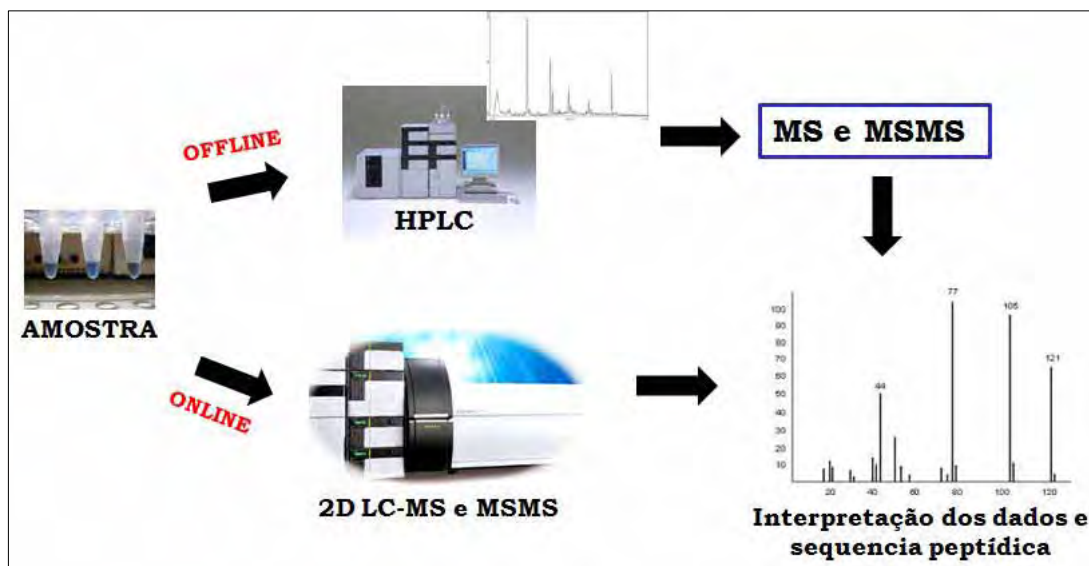
#### **4.1 Estratégias para o estudo e a caracterização de peptídeos**

A caracterização de peptídeos nas células, tecidos e fluidos corporais apresenta um enorme número de desafios. Entre esses desafios esta a capacidade analítica para identificar e quantificar os peptídeos em amostras biológicas complexas, que podem conter centenas de milhares de espécies potencialmente detectáveis numa única amostra. Um segundo grande desafio é trabalhar com a quantidade de amostra disponível, tais como uma biópsia clínica ou venenos animais. Diferentemente do que temos na genômica, na proteômica e peptidômica as amostras não são passíveis de amplificação e a capacidade de medir analitos em amostras pequenas é fortemente regulada pela sensibilidade da técnica analítica (XIE et al., 2012). Composto estas questões estão as propriedades heterogêneas e dinâmicas do proteoma/peptidoma que desafiam a velocidade analítica.



**Figura 5.** A descoberta de novos peptídeos biologicamente ativos. Modificado de NICOLAS et al., 2003.

Para se chegar a sequência de peptídeos contamos basicamente com duas estratégias (Figura 6). Na estratégia *off-line*, os peptídeos são extraídos e submetidos à cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (HPLC) sob gradiente de acetonitrila/água e cada uma das frações geradas é coletada, concentrada e então submetida à espectrometria de massas para aquisição de dados de MS e MS/MS. Já na estratégia *on-line*, os peptídeos são extraídos e diretamente injetados em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas. Desta forma, os peptídeos podem ser separados por cromatografia unidimensional, por exemplo, RPLC, ou por cromatografia multidimensional, como por exemplo, troca iônica e depois RPLC, e então detectados no analisador de massas e sequenciados.

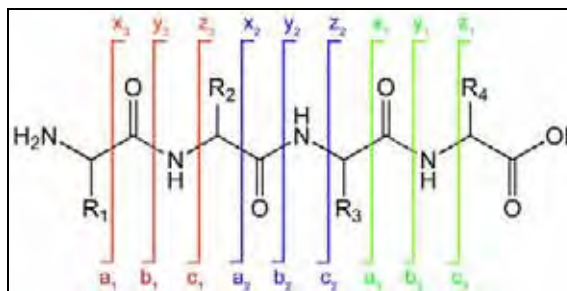


**Figura 6.** Estratégias aplicadas ao estudo e caracterização de peptídeos.

#### 4.2 Fragmentação de peptídeos

Atualmente CID é a abordagem mais aplicada nos espectrômetros de massas comercialmente disponíveis e seu princípio se baseia na colisão de um íon com um átomo neutro ou molécula na fase gasosa, como hélio ou argônio com subsequente dissociação do íon.

Comumente, espectros de massas que contêm informação de fragmentação de digestos de proteínas ou mesmo de fragmentos peptídicos são utilizados como dados a serem analisados por ferramentas de bioinformática e são lançados em bancos de dados a fim de se chegar a identificações das moléculas de estudo. Quando se trata de moléculas inéditas esses dados podem ser analisados por softwares de desconvolução e os resultados obtidos são acurados manualmente permitindo que novas moléculas sejam descritas. Este procedimento pode também ser realizado totalmente de forma manual a partir do estudo e de cálculos baseados no esquema proposto por Roepstorff e Fohlman (1984) – Figura 7, sendo necessário o uso de mão-de-obra qualificada e treinada, além de enorme demanda de tempo.



**Figura 7.** Estrutura química geral de um peptídeo apresentando as possibilidades de fragmentação, com a nomenclatura proposta por Roepstorff e Fohlman (1984) dos fragmentos formados devido à transferência de energia para o peptídeo; íons formados são enumerados a partir do lado N-terminal.

O esquema é utilizado como forma de representação dos possíveis fragmentos peptídicos que surgem em espectros de massas obtidos por análise *in tandem*. Desta forma, íons são denominados por *-a*, *-b* ou *-c* se a carga for mantida no lado N-terminal e, denominados *-x*, *-y* ou *-z* se a carga for mantida no lado C-terminal. O índice indica o número do resíduo de aminoácido do fragmento em questão.

Embora a clivagem no esqueleto peptídico seja mais comum e a mais útil para o sequenciamento e a identificação de íons fragmento outros tipos de clivagem podem ser observados sob condições de alta energia de dissociação. Estas incluem a perda de íons da cadeia lateral *-d*, *-v*, *-w* e íons imônio, além de íons adicionais específicos da sequência de fragmentos específicos associados com resíduos de aminoácidos.

Apesar da determinação da sequência de aminoácidos num peptídeo ser possível por meio do simples cálculo da diferença de massa entre picos vizinhos em uma série de íons, tal trabalho é bastante difícil devido a uma série de fatores, dentre os quais se pode citar o conjunto de íons fragmento esperado pode não estar presente na íntegra, ou em outras palavras, pode haver a ausência de alguns íons das séries *-b* e *-y*; alguns fragmentos podem sofrer rearranjos internos e subsequente fragmentação

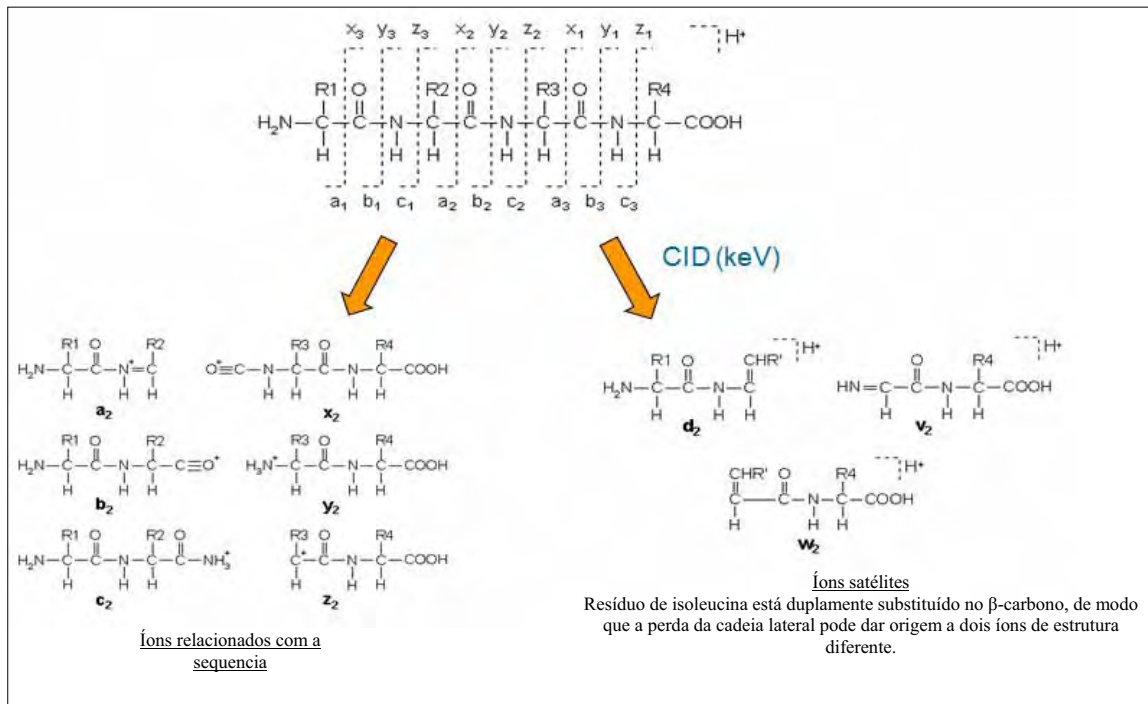
Os fatores que controlam a forma como as ligações ocorrem, ou seja, o caminho pelo qual cada molécula sofre fragmentação, ainda não está totalmente compreendido. No entanto, sabe-se que a fragmentação é dependente de quão facilmente os prótons podem migrar para vários nitrogênios em cadeias de amidas peptídicas. Desta forma, os locais que são mais facilmente protonados são mais facilmente clivados. Também parece haver um papel na estabilização de cargas positivas por cadeias laterais dos aminoácidos ácidos. Assim, as clivagens adjacentes aos resíduos de glutamato ou aspartato frequentemente dão origem a íons fragmento intensos. Quando os íons de peptídeos ganham energia durante as colisões, a energia de fragmentação é dividida entre diversas vias concorrentes. Clivagens fáceis podem

diminuir as contribuições de clivagens que exijam maior energia para fragmentação e alguns íons fragmento apresentam-se com baixa intensidade ou ausentes.

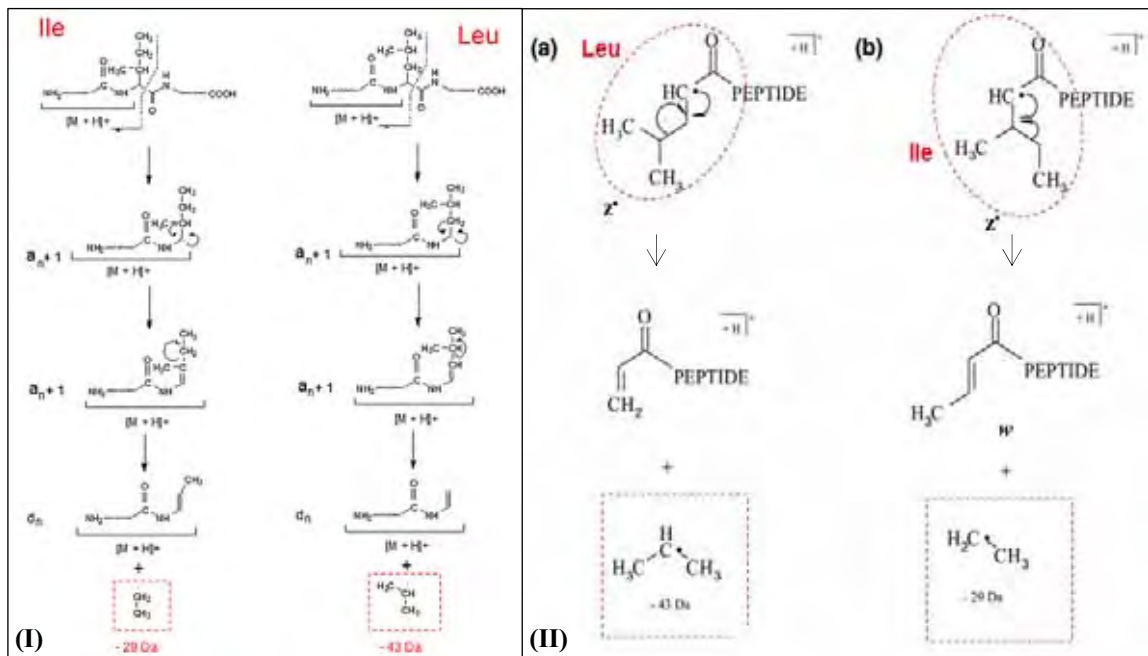
É importante notar que algumas clivagens de íons multicarregados produzem também um íon-produto multicarregado. Quando isso ocorre pode ocorrer confusão na interpretação dos espectros, sendo que para que qualquer sequenciamento seja realizado é necessário promover a desconvolução de todos os íons para a forma monoprotônica  $[M+H]^+$ ; por exemplo, íons que possuam carga +2, i.e.  $[M+2H]^{2+}$ , devem ter sua massa multiplicada por dois e subtraída de uma unidade, para então passarem a ter seu valor de  $m/z$  correspondente a  $[M+H]^+$ . Alguns fragmentos podem também sofrer rearranjo neutro de hidrogênios durante a fragmentação. Assim, o somatório destes fatores pode induzir a atribuição errada das séries de íons, tornando a interpretação do espectro bastante desafiadora.

Além disso, é necessário levar em conta a presença de aminoácidos isóbaros, tais como leucina (L) e isoleucina (I), e de aminoácidos que diferem em massa apenas após a segunda casa depois da vírgula, como é o caso de glutamina (Q) e lisina (K).

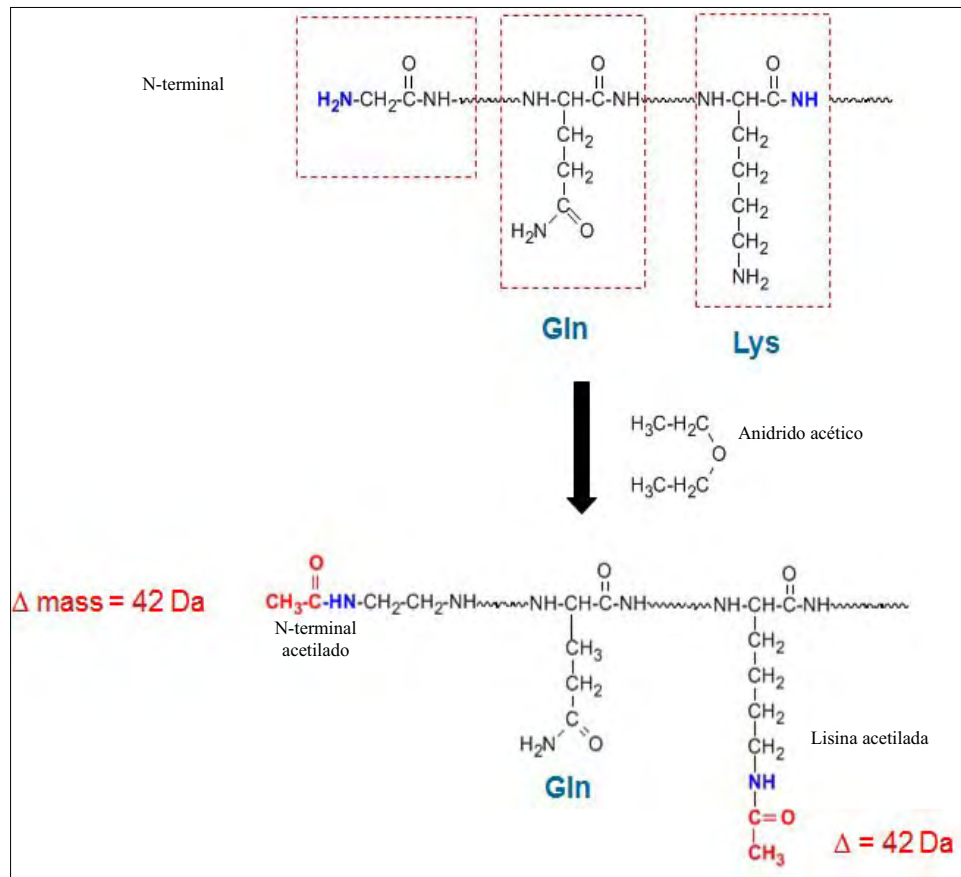
No primeiro caso, apesar de leucina e isoleucina serem isóbaros, suas cadeias laterais são diferentes, e a clivagem desta cadeia lateral gera resíduos de aminoácidos com diferentes relações massa/carga ( $m/z$ ) (séries  $-d$  e  $-w$ ) (Figuras 8a e 8b), permitindo a diferenciação entre os dois resíduos de aminoácido na sequência peptídica. Já a diferenciação entre os resíduos de (K) e (Q) pode ser feita por meio do uso de reação de derivatização, por exemplo, pela acetilação da lisina por reação com anidrido acético; a cadeia lateral do resíduo de glutamina não é susceptível à reação com o anidrido acético (Figura 9). Desta forma, caso o aminoácido presente na sequência seja a lisina e não a glutamina será observada o acréscimo de 42 Da na massa do peptídeo em questão. Quando na presença de mais de uma ambiguidade para estes dois resíduos de aminoácidos, a aquisição de espectros de MS/MS será necessária, e a reinterpretação dos dados deverá ser feita. Além disso, como a diferença de massa é 0,03638 u, ela pode ser utilizada para diferenciar (K) e (Q) se um espectrômetro de alta resolução for utilizado, tais como Q-ToF, Orbitrap e FT-ICR.



**Figura 8a.** Resolvendo a ambiguidade isoleucina/leucina por meio do uso de CID; formação de séries  $-d$  e  $-w$ .



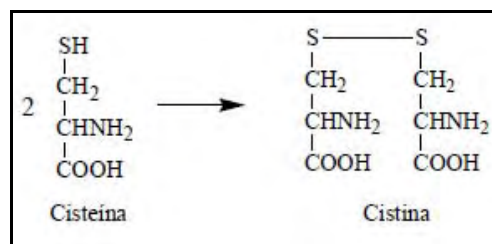
**Figura 8b.** (I) Mecanismo de racionalização da formação de íons  $-d_n$  via intermédio de  $(a_n + 1)$ . (II) Fragmentação secundária de íon  $-z$  para produzir íon  $-w$  de um peptídeo que contém (a) resíduo de leucina e (b) resíduo de isoleucina.



**Figura 9.** Derivatização: acetilação do N-terminal e dos resíduos de lisina (K).

#### 4.2.1 Pontes dissulfeto

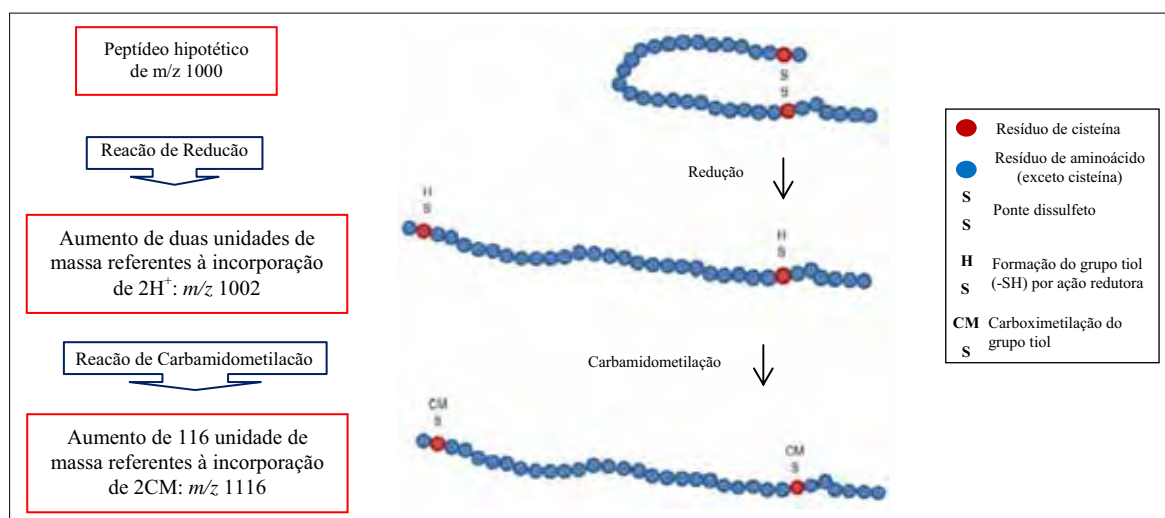
Faz-se necessário também, observar a presença de resíduos de cisteínas. O grupo sulfídrico da cisteína é reversivelmente oxidado. A oxidação de duas moléculas de cisteína produz uma molécula que contém uma ponte dissulfeto (Figura 10). A síntese de cistina é realizada após a incorporação da cisteína às proteínas exerce importante papel na estabilização da conformação proteica. A ligação covalente pode ocorrer entre cisteínas de uma única cadeia polipeptídica formando um anel ou entre cadeias separadas para formar pontes intermoleculares.



**Figura 10.** Formação de cistina a partir da oxidação de duas moléculas de cisteínas. Produto apresenta ponte dissulfeto.

Para a análise por espectrometria de massas, os peptídeos devem ter essas pontes dissulfeto rompidas por ação de um agente redutor (geralmente ditioneitol – DTT), tornando a molécula linear e permitindo a fragmentação dos resíduos de aminoácidos e correta interpretação dos dados obtidos a partir do espectro. Para tal, a reação de redução (quebra da ponte dissulfeto) é acompanhada do aumento de duas u.m.a em decorrência do acréscimo de dois átomos de hidrogênio; em seguida se realiza a carboximetilação ou carbamidometilação dos grupos tióis - caracterizado pelo aumento de 58 u.m.a para cada grupo tiol envolvido na reação; geralmente isso resulta no aumento de 116 u.m.a em decorrência do acréscimo de dois grupos carboxi-metil. Essas reações são utilizadas para bloquear os resíduos de cisteína e prevenir que as pontes dissulfeto voltem a se formar (Figura 11). A reação é normalmente utilizada após as análises de sequenciamento de proteínas e peptídeos, suspeitos de apresentarem resíduos de cisteína em sua composição, tornando o seqüenciamento mais compreensível (STARK 1965; LIPPINCOTT e APOSTOL 1999).

A reação de redução pode ser realizada com solução de 50 mM de Ditioneitol (DTT) a 40°C por 30 minutos. Após esse procedimento, realiza-se reação de carbamidometilação com solução de 100 mM de Iodoacetamida (IAA).



**Figura 11.** Esquema mostrando o aumento de massa após cada evento das reações de redução e alquilação de uma molécula peptídica hipotética.

#### 4.2.2 Resíduo da posição C-terminal: ácido ou amida

Ainda com relação à compreensão das seqüências peptídicas, a observação do resíduo C-terminal é de fundamental importância para a caracterização estrutural e funcional dessas moléculas. Observa-se na natureza que muitos peptídeos que possuem seu lado C-terminal

amidado, ao invés de C-terminal ácido; a amidação do resíduo C-terminal é considerada uma modificação pós-traducional.

Ao interpretarmos um espectro de massas precisamos avaliar se o resíduo da posição C-terminal está na forma ácida (-OH) ou amidada (-NH<sub>2</sub>). Uma maneira de se ter certeza a respeito disso é sintetizar os peptídeos com diferentes combinações nas posições terminais. O tempo de retenção para cada peptídeo sintético é obtido em cromatografia de fase reversa sob eluição isocrática. Ou ainda, pode-se fazer uma mistura contendo o peptídeo natural e as duas formas sintéticas (com os respectivos resíduos C-terminais amidado e ácido, respectivamente). A Figura 11 é um bom exemplo de como a resolução do resíduo C-terminal pode ser obtido a partir da síntese de peptídeos com diferentes formas em seu resíduo C-terminal (DOHTSU et al., 1993).

A espectrometria de massas *in tandem* tornou-se fundamental no sequenciamento peptídico, sendo o estado de arte na abordagem de sequências de peptídeos. No entanto, a interpretação dos dados/espectros é trabalhosa e lenta, exigindo o uso de ferramentas avançadas de bioinformática ou mesmo o trabalho manual do pesquisador.

### 4.3 LCMS-IT-ToF

O processo de fragmentação MS/MS, em equipamentos do tipo triplo quadrupolo é muito diferente do que ocorre em equipamentos do tipo *ion trap*. Os fragmentos em triplo quadrupolo são produzidos por colisões com um gás, tipicamente argônio. Ocorre então uma cascata de colisão ou chamado, fragmentação em múltiplo passo. Peptídeos, em geral, necessitam de mais energia para ter suas ligações dissociadas quando comparados com pequenas moléculas e a fragmentação resultante tende a gerar um grande número de íons produto e, assim, baixa abundância relativa.

Em contraste, os íons produtos gerados em um *ion trap* são formados através da aplicação de uma frequência de excitação ressonante correlacionada com uma massa-carga ( $m/z$ ) do íon precursor que é então fragmentado por colisões com o gás na “armadilha de íons”. Isto tipicamente proporciona uma fragmentação de passo único, uma vez que os íons produto têm massas diferentes em relação ao íon precursor, estando em frequência de excitação diferente e sofrendo menos colisões adicionais. Além disso, quando comparamos análises em modo CID para triplo-quadrupolos e *ion trap*, observamos que os *ion trap* tem maior eficiência de fragmentação, seleção e transmissão dos íons produto para o detector.

*Ion traps* podem acumular íons, bem como os lançar para detecção. Intervalos de tempo de armazenamento permitem que os íons possam ser fragmentados, detectados e

classificados. Além disso, para que a nuvem de íons não se dissipe ou colida com as superfícies do analisador de massas, existem campos adicionais que guiam os íons ao longo de trajetórias complexas em um espaço relativamente pequeno. A partir disto, podemos distinguir os diferentes tipos de *ion traps*, havendo diferentes abordagens para a formação destas forças. Espectrômetros do tipo ion trap - quadrupolo (linear e 3D) utilizam campos eletrostáticos e potenciais de campos elétricos de radiofrequência, enquanto que o Orbitrap opera com campos eletrostáticos (armadilha Kingdon).

O primeiro *ion trap* disponibilizado foi baseado em um sistema 3D que é composto por dois eletrodos hiperbólicos voltados um para o outro e separados por um eletrodo hiperbólico em anel. Um gás, tal como hélio, é introduzido para arrefecer os íons, e as tensões de RF e DC são aplicados aos três eletrodos. A varredura de massa é efetuada pelo aumento da amplitude da voltagem para ejetar íons. A capacidade de *ion traps* 3D é limitada. Por isso, *ion traps* lineares são hoje mais comumente aplicados em laboratórios de pesquisa. Estes sistemas permitem prender um maior número de íons. Esses equipamentos (GROSS, 2004) são constituídos por três conjuntos de barras de quadrupolo nos quais as tensões DC e RF são aplicadas radialmente restringendo os íons do segundo conjunto de hastes e os potenciais são aplicados aos eletrodos da extremidade para restringir os íons axialmente.

A sequência de operação no IT/MS começa com a injeção de um pulso de elétrons para dentro da câmara para ionizar a amostra gasosa. O eletrodo de anel é mantido a baixa amplitude de RF para manter confinados todos os íons formados durante o pulso de ionização. A amplitude RF é aumentada, e íons de massas cada vez maiores são sequencialmente ejetados da câmara e detectados por um multiplicador de elétrons.

Um dos parâmetros mais importantes na operação do *ion trap* é a pressão do gás de colisão. Colisões dos íons com o gás inibem a trajetória dos íons em direção ao centro do *ion trap* (controle da trajetória), gerando melhor resolução e sensibilidade.

Quando um *ion trap* é acoplado a um analisador de massas do tipo *time of flight* (ToF) temos a combinação das capacidades de armazenamento do *ion trap* com as relativamente altas capacidades de velocidade, resolução e alta massa de um ToF, potencialmente, produzindo um instrumento híbrido com recursos exclusivos. Um exemplo desta configuração é o LCMS-IT-ToF (Shimadzu) (Figura 12) que é um espectrômetro de massa híbrido que possui inúmeras aplicações dentre elas: a descoberta de biomarcadores, a identificação de metabólitos e pesquisa em saúde humana, sendo ideal para aplicações em medicina forense, desenvolvimento de medicamentos e química ambiental. O acoplamento da ionização a pressão atmosférica com as tecnologias de *Ion-Trap* (IT) e *Time-of-Flight* (ToF)

proporcionam elevada precisão de massa e alta resolução de massa (10.000 até 1000 m/z). O equipamento foi projetado para maximizar a sensibilidade e a seletividade através da otimização do transporte de íons para o analisador ToF e pela redefinição da capacidade do ion trap quadrupolar.



**Figura 12.** LCMS-IT-ToF: acoplando ionização a pressão atmosférica com as tecnologias de Ion Trap (IT) e Tempo de voo (ToF), permite obter alta exatidão de massa e alta resolução (10.000 a 1000 m/z) em todos os modos MS. Disponibiliza a capacidade de MS<sub>n</sub> (MS/MS, MS/MS/MS, MS/MS/MS/MS.) utilizando o método de ion-trap e também a capacidade de realizar medições de massa de alta resolução e alta precisão utilizando o método TOF.

Instrumentos *ion trap* proporcionam uma vantagem significativa sobre muitos dos outros instrumentos. Íons podem ser armazenados indefinidamente e múltiplos estágios de fragmentação (MS<sup>n</sup>) podem ser realizados "*in-time*" para fornecer informação estrutural, não só sobre o íon molecular, mas também em íons-fragmento.

## 5. VENÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE PEPTÍDEOS

Pode-se definir que animal peçonhento, é aquele que possui glândulas produtoras de toxinas com dutos excretores, associados ou não a um aparato inoculador (FREITAS, 1991) ou ainda aqueles que produzem injúrias pela inoculação de toxinas através de um aparelho especializado nessa função.

A partir desta definição fica evidente a importância do estudo de peçonhas, já que as toxinas nelas presentes são de interesse significativo devido à sua capacidade para causar uma vasta gama de condições fisiopatológicas que pode, potencialmente, resultar em morte.

Em qualquer habitat há uma competição por recursos, e todos os ecossistemas da Terra contêm organismos tóxicos ou venenosos. Uma das técnicas mais fascinantes de capturar presas ou de defesa é o uso de venenos. Veneno representa uma característica adaptativa e é um exemplo de evolução convergente (FRY et al., 2008, 2009). Ao longo dos milhares de anos, a evolução promoveu elevados níveis de variação nas moléculas presentes no veneno, as quais se caracterizam como parte de uma corrida predador-presa que permite que o predador se adapte a uma variedade de presas diferentes, cada uma das quais mais eficientes, gerando diferentes formulações do veneno.

Venenos mortais são cocktails, cada um compreendendo misturas únicas de peptídeos e proteínas naturalmente adaptados pela seleção natural para atuar em sistemas vitais da presa ou vítima. Toxinas encontradas no veneno são geralmente de pequeno tamanho, apresentando uma gama de diversidade estrutural e funcional, além de serem capazes de exercer efeitos múltiplos sobre uma variedade de alvos moleculares, incluindo enzimas e canais iônicos, (MÉNEZ, 1998) sendo que no veneno de cada animal existe certamente mais de 100 diferentes compostos tóxicos e não tóxicos (proteínas e peptídeos, bem como carboidratos, lipídeos, não tóxicos e aminas) (WARRELL, 2010). Esta complexidade e o potencial têm sido demonstrados através da aplicação de modernas tecnologias analíticas, que revelam que os venenos são na verdade vastas bibliotecas combinatórias de peptídeos.

Além de entender como venenos evoluem, um objetivo principal de projetos no campo da venômica é obter uma visão mais profunda do espectro de toxinas medicamente importantes em venenos para descobrir pistas para resolver o enigma da eficácia médica de venenos e de aprender a converter toxinas mortais em drogas que salvam vidas (MÉNEZ, 2002; MÉNEZ, 2006).

### 5.1 A evolução no estudo dos venenos

Até recentemente, as tarefas de um toxinologista envolviam a busca de toxinas altamente tóxicas ou letais em venenos animais que poderiam explicar os efeitos nocivos dos sintomas observados clinicamente. A maioria destas toxinas foi postas em evidência através da observação dos fenômenos biológicos e geralmente guiada pelo isolamento e a caracterização da molécula causadora. Desta forma, muitas toxinas foram purificadas por causa de seu efeito observado (PIMENTA et al., 2005).

Estudos anteriores basearam-se em técnicas de baixa resolução de separação não sendo possível compreender a verdadeira complexidade dos componentes do veneno, uma vez que apenas algumas das toxinas mais abundantes puderam ser purificadas e caracterizadas. Um exemplo disto é que os estudos que envolviam o estudo dos componentes do veneno utilizavam-se da técnica de SDS-PAGE 1D, e mostraram um número limitado de bandas de proteína, sendo que cada banda poderia conter mais de uma proteína. Além disso, peptídeos apresentando massa molecular <10 kDa não eram bem resolvidos e visualizados. Moléculas pequenas como os peptídeos e os compostos de baixa massa molecular não eram também conhecidos, pois a espectrometria de massas ainda não possuía recursos suficientes para o estudo de compostos com essas características químicas. Isto levou diversos autores a concluir, erroneamente, com base em tais géis, que as proteínas ou os peptídeos de maiores dimensões predominavam em certos venenos, não tendo assim uma visão real da complexidade de tais amostras. No entanto, as moléculas pequenas com micro-efeitos que não são facilmente visualizados foram relativamente negligenciadas ou pouco estudadas (PIMENTA et al., 2005).

Esta situação mudou com o advento de técnicas com elevado grau de sensibilidade, resolução e precisão como a espectrometria de massa e as abordagens proteômicas/peptidômicas utilizadas em toxinologia. Além do avanço nas técnicas de eletroforese, tivemos também o avanço na transição para separações cromatográficas líquidas, outro eficiente método de separação, que mesmo com baixa potência resolutiva, como é o exemplo da filtração em gel, pode-se distinguir um número muito maior de espécies moleculares. O advento de HPLC e, especialmente, de fase reversa (RP), resolveu o problema de resolução, separando muitas espécies moleculares em uma única corrida, permitindo assim uma melhor resolução dos picos cromatográficos. No entanto, a informação da massa molecular não é gerada pelo HPLC sozinho, e estudos anteriores, não conseguiram assim correlacionar a complexidade molecular do veneno com as famílias estruturais ali presentes.

Foi somente com o acoplamento dos cromatógrafos aos espectrômetros de massas que o universo das toxinas e dos mecanismos de ação começou a ser de fato preenchido já que tínhamos a partir disso grau de sensibilidades incríveis (em nível de femtomol e nanomol) somados a elevado poder de resolução na ordem de cinco casas decimais.

Vale lembrar que proteínas e peptídeos são as espécies polares, não voláteis e termicamente instáveis que necessitam de uma técnica de ionização que transfere um analito para a fase gasosa sem degradação extensiva. Na década de 80 surgiram as ionizações ditas ionizações suaves ou brandas ainda conhecidas como *soft ionization*. Foi o surgimento das fontes de ionização do tipo MALDI e ESI. A partir disto, pequenos peptídeos com atividades biológicas “recém-exploradas”, tais como vasoativa, hormonais, antimicrobiana e outras foram recentemente descobertas, ampliando o repertório conhecido de moléculas bioativas encontradas em venenos animais (PIMENTA et al., 2005).

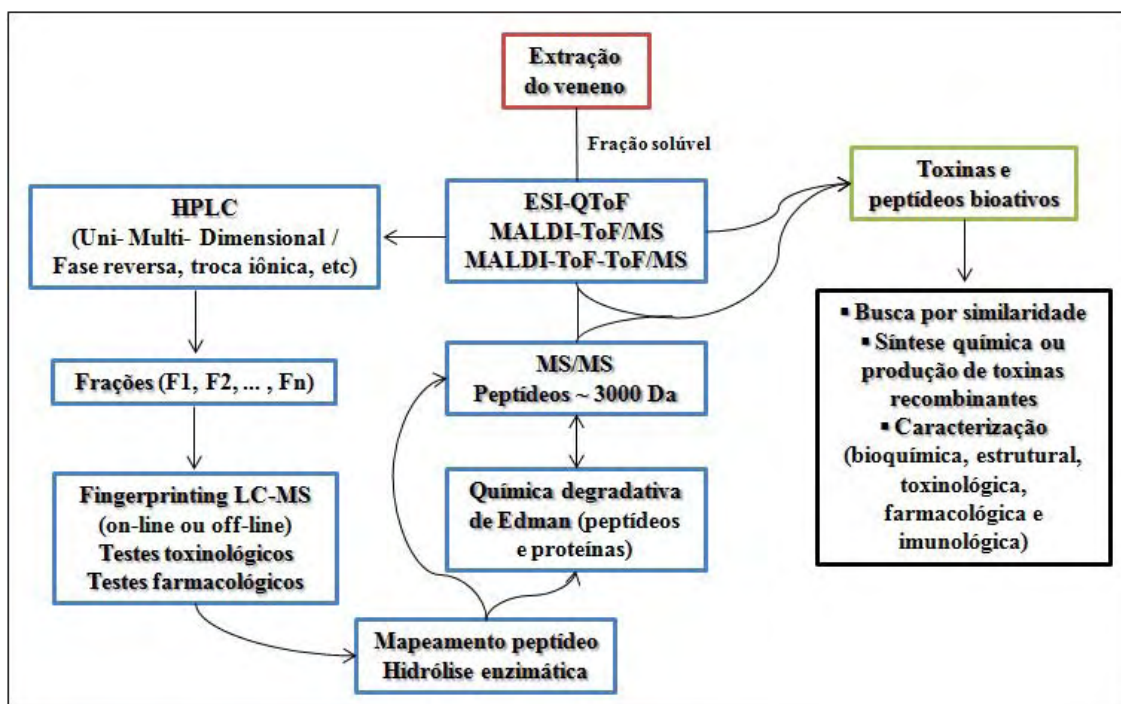
Para ilustrar este repertório extraordinário, Theakston e Kamiguti listaram mais de 2500 toxinas animais e outros produtos naturais que mostraram qualquer atividade biológica. Este número tende a aumentar bastante, uma vez que tem sido demonstrado que o número de moléculas pode facilmente atingir 50-300 em cada veneno, apesar de muitos deles ainda não serem conhecidos (BATISTA et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2002).

É interessante notar que, entre o espectro de moléculas que podem ser encontradas em venenos de animais, têm as suas ações a nível molecular relacionadas com receptores e enzimas, as quais constituem as duas principais classes de alvos para a ação de drogas (SWINDELLS et al., 2002). Além disso, muitos dos produtos farmacêuticos em todo o mundo são produtos naturais ou análogos sintéticos e semissintéticos de produtos naturais (MYLES, 2003).

Frequentemente, pequenos peptídeos são representados em concentrações muito baixas no veneno de artrópodes e é uma tarefa desafiadora obter material suficiente para ser analisada por técnicas analíticas convencionais. Com modernas plataformas analíticas, quantidades muito pequenas de matéria-prima são necessárias para se chegar ao perfil de um dado veneno, podendo se conhecer os peptídeos de sequências pequenas por meio de uma combinação de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC/MS) e cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa *in tandem* (LC-MS/MS). Além disso, a síntese química destes peptídeos permite uma melhor caracterização das suas atividades biológicas (PIMENTA et al., 2005).

## 5.2 Estratégias para o estudo de peptídeos em venenos animais

Por se tratar de amostras altamente complexas, os venenos são de difícil estudo sendo necessário o uso de estratégias refinadas e bem elaboradas, além de equipamentos de elevada sensibilidade, assim como técnicas eficientes de separação. Um fluxograma geral das principais abordagens e estratégias utilizadas no estudo de peptídeos de venenos pode ser visualizado na Figura 13.



**Figura 13.** Fluxograma geral de estratégias metodológicas aplicadas ao estudo de peptídeos em venenos animais para a busca por moléculas bioativas. Modificado de PIMENTA et al., 2005.

O sequenciamento de novo por MS/MS tornou-se uma das principais técnicas analíticas para superar as dificuldades, tanto na coleta de matéria-prima quanto no isolamento de peptídeos. Por meio desta técnica, por exemplo, Konno e colaboradores (2001), utilizando apenas dois reservatórios de veneno da vespa solitária *Cyphononyx dorsalis* conseguiram obter duas novas sequências de peptídeos (Cd Cd-125 e-146), além do peptídeo conhecido como Thr6-bradicinina. As sequências foram corroboradas por química degradativa de Edman e por síntese em fase sólida.

Muitos outros autores relataram o uso de técnicas MS/MS para sequenciamento de peptídeos com baixa abundância nos venenos de artrópodes (BUDNIK et al., 2004; KONNO et al., 2001), secreções da pele de anfíbios (PRATES et al., 2004) e cobras (IANZER et al., 2004) com subsequentes síntese química para outras caracterizações biológicas, representando de diferentes formas as estratégias que podem ser adotadas para a compreensão do veneno e seu mecanismo de ação, assim como sua diversidade química.

Mais recentemente, Baptista-Saidemberg e colaboradores (2011) utilizando LC/ESI-MS/MS em modo *off-line* foram capazes de obter a sequência de nove novos peptídeos [Protonectina (1-4 -OH), Protonectina (7-12), Protonectina (1-5-OH), Pallipina I, Pallipina II, Protonectina (1-6 -OH), Pallipina III, Agelaia MP-I e Agelaia MP-II], que possuem funções tais como hemolítica, desgranuladora e quimiotáticas e ocorrem em uma baixa concentração no veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*.

Já a análise de massas peptídicas geradas por MALDI-ToF MS de 55 diferentes venenos de tarântula (Araneae: Theraphosidae) revelou uma distribuição de massa molecular bimodal, com 57,8% dos peptídeos que caem 3500 - 4500-Da e uma distribuição secundária (6,9%), centrando-se no intervalo de 6500 - 7000-Da (ESCOUBAS et al., 2004). Pela aplicação de um segunda estratégia de um estudo de acoplamento de separação por cromatografia líquida (LC) do veneno bruto, com análise de MALDI-ToF MS (LC-MALDI) (ESCOUBAS et al., 2006) chegou a uma outra família de aranhas (Hexathelidae), apresentando não só uma diversidade muito maior do que a esperado (cerca de 600 peptídeos em venenos de *Atrax robustus* (machos) e cerca de 1000 peptídeos detectados *Hadronyche versuta* (fêmea)), com a distribuição de massa molecular apresentando > 70% dos peptídeos em intervalo de 3000 - 5000-Da e um segundo grupo em intervalo de 6500 - 8500Da.

A estratégia de LC-MS em modo *on-line* foi aplicada por Davis e colaboradores (2009) no estudo dos peptídeos do veneno de *Conus*. Esta abordagem permitiu que mais de um mil e quinhentos peptídeos únicos fossem identificados e que peptídeos de massas diferentes que apresentavam co-eluição fossem também resolvidos. Comparando-se os peptídeos de venenos de *Conus* observou-se aumento de pelo menos 10 vezes na estimativa do número de conopeptídeos presentes em *Conus* spp, além de revelar variabilidade intra e inter-espécies.

A venômica ainda é um campo em sua infância. Desafios significativos permanecem e hoje, os principais desafios são ainda a complexidade da amostra, assim como a escassez do material biológico, além da variação quantitativa e qualitativa encontrada nas peçonhas, como idade, sexo, tamanho do animal, a dieta, a distribuição geográfica e heterogeneidade genética. Outro grave problema é a ausência de bases de dados para a determinação de sequências de peptídeos e de proteínas (CALVETE et al., 2009).

### **5.3 Peptídeos oriundos de venenos animais e sua aplicação biotecnológica**

Por serem ricas fontes de moléculas bioativas, os venenos animais são amplamente estudados a fim de se compreender sua estrutura molecular, atividade biológica e mecanismo

de ação. Ao longo das últimas décadas diversos peptídeos foram isolados de diferentes venenos animais e, atualmente, representam uma biblioteca natural de compostos ainda a serem descobertos e desvendados.

Em 1970 a droga anti-hipertensiva captopril foi desenvolvida a partir de um peptídeo isolado da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (CUSHMAN; ONDETTI, 1991). Mais recentemente, outras drogas foram produzidas a partir de moléculas isoladas de venenos animais: a  $\omega$ -conotoxina MVIIA (Ziconitide, Prialt®), um peptídeo de 25 resíduos isolado do veneno de *Conus magus* foi aprovada em 2004 como um analgésico para o tratamento da dor crônica (MILJANICH, 2004).

Outra classe de peptídeos, os antimicrobianos, vem atraindo muita atenção especialmente contra patógenos antibiótico-resistentes (ZASLOFF, 2002). Como é uma rica fonte de componentes bioativos, os venenos de vespas vêm demonstrando ser um excelente material para a busca de novos agentes antimicrobianos (CHEN et al., 2008). Foram isolados três peptídeos antibióticos a partir da geléia real de *Apis mellifera* (FONTANA et al., 2004). Esses peptídeos se destacaram principalmente pela atividade antibiótica tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.

Mendes e colaboradores (2004a), isolaram dois novos peptídeos do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, nomeados Protonectina (ILGTILGLLKGL-NH<sub>2</sub>) e Agelaia-MP (INWLKLGKAIIDAL-NH<sub>2</sub>). A Protonectina foi caracterizada como um potente agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleados; além disso, esse peptídeo possui elevada atividade antibiótica contra bactérias Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>. Já o peptídeo Agelaia-MP mostrou uma potente atividade hemolítica e desgranuladora de mastócitos peritoneais, porém uma baixa atividade antibiótica e nenhuma atividade quimiotática (MENDES et al., 2004a).

Outro peptídeo antibiótico foi isolado a partir do veneno da vespa social *Polybia paulista*, este peptídeo é pertencente à classe dos mastoparanos e foi denominado Polybia-MP-I, também apresentou atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos e quimiotática para leucócitos polimorfonucleares (DE SOUZA et al., 2005).

## 6.OBJETIVOS

Com o desenvolvimento de micro técnicas analíticas, como espectrometria de massas, estudos que envolvem peptídeos pequenos (800-3000 Da) são cada vez mais abundantes. No entanto, estudos que buscam compreender aspectos estruturais e biológicos de pequenos peptídeos de venenos de escorpiões, ainda são muito raros (PIMENTA e LIMA, 2005). O escorpião *Tityus serrulatus* é o organismo de seu grupo cujo veneno tem sido mais extensivamente estudado (LIMA e MARTIN-EAUCCLAIRE, 1995; PIMENTA et al., 2001), porém, nenhum estudo centrou-se na determinação da seqüência sistemática de pequenos peptídeos, sendo estes considerados negligenciados.

Com o intuito de investigar e elucidar estruturalmente as toxinas peptídicas lineares do veneno de *T. serrulatus*, este projeto tem como objetivos:

1. Extração diferenciada dos peptídeos do veneno em relação aos métodos descritos na literatura;
2. Fracionar e purificar os pequenos peptídeos mais abundantes;
3. Determinar as características estruturais de seqüências primárias destas moléculas através de estratégias analíticas, como espectrometria de massas *in tandem*;
4. Interpretação manual dos espectros de massas por meio de desconvolução;
5. Sintetizar manualmente os peptídeos identificados por estratégia Fmoc;
6. Determinar as atividades biológicas de cada um deles, através de ensaios:

*In vitro*: hemólise, desgranulação de mastócitos provenientes do lavado peritoneal de ratos, efeito de toxicidade e efeito antibiótico.

*In vivo*: dor e inflamação.

## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 Material Biológico

O veneno bruto da espécie de escorpião *Tityus serrulatus* foi cedido pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquiria Abrao Coronado Dorce, pesquisadora do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, sendo que o presente projeto faz parte da proposta referente ao EDITAL TOXINOLOGIA – CAPES nº 063/2010.

Os venenos foram extraídos por estimulação elétrica direta (eletrochoque) sobre o segmento abdominal traseiro. O procedimento consiste em segurar o escorpião com auxílio de uma pinça e tocar com uma superfície metálica a qual libera uma descarga elétrica de 3,5 volts, estimulando a liberação da peçonha pelo aguilhão (Figura 14).

Posteriormente foram extraídos em solução de Acetonitrila (MeCN - grau HPLC) 50% (v/v) em água ultrapura, a fim de extrair preferencialmente os componentes peptídicos. Em seguida, o material solubilizado foi centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos em micro centrífuga (Centrífuga Eppendorf -5415D). A fração sobrenadante foi liofilizada e armazenada a -20 ° C.



**Figura 14.** Método de extração de veneno de escorpiões por estimulação elétrica. Retirado de: <http://www.incttox.com.br/noticias/alunos-desenvolvem-equipamento-para-extracao-de-veneno-de-aranhas-e-escorpioes/> em 16/07/2012.

## 7.2 Metodologias

### 7.2.1 Fracionamento do veneno bruto

Para o fracionamento do veneno bruto foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 1 ml e um sistema controlador Shimadzu modelo CBM-10A. O controle da aquisição de dados foi feito através do software CLASS-LC10.

As frações foram obtidas sob fase reversa, utilizando-se uma coluna TOSOH TSK-Gel ODS-80 Tm (C18 - 7,8 x 3000 mm). O gradiente de separação utilizado foi MeCN 20% (v/v) a 80% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) (VETEC) em água bidestilada e ultrapurificada, obtida em ultrapurificador de água NANOpure (BARNSTEAD) em 90 minutos, a um fluxo de 1 mL/min. A eluição das frações foi monitorada por medidas de absorção de luz ultravioleta em 214 nm, 254 nm e 280 nm.

### 7.2.2 Espectrometria de Massas ESI-MS

As análises de ESI-MS e ESI-MS/MS dos peptídeos foram realizadas em um equipamento LC-MS-IT-TOF (SHIMADZU, Kyoto). O equipamento foi ajustado por *auto-tuning* utilizando uma solução de Na-TFA, e apresentou os seguintes parâmetros: 42 para o modo positivo (+), erro de 3,08 ppm e, resolução de 10.414; Para o modo negativo (-), erro de 2,69 ppm, e resolução de 13.212.

O equipamento operou com probe em voltagem 4.50 kV, com fluxo de gás nebulizante de 1.5 L min<sup>-1</sup>, temperatura de CDL de 200°C, temperatura do bloco de aquecimento 200°C, tempo de acumulação de íons no Ion Trap de 50 msec. A faixa de massa adotada para aquisição de MS foi de  $m/z$  entre 100 a 2000, e a aquisição de (MS/MS) na faixa de  $m/z$  entre 50 a 2000. As fragmentações peptídicas (MS/MS) foram obtidas utilizando-se a estratégia de Decomposição Induzida por Colisão (CID), com gás hélio, aplicando-se os seguintes parâmetros: energia - 35% e gás de colisão - 20%.

### 7.2.3 Interpretação dos Espectros (Desconvolução)

Todas as sequências deste trabalho foram obtidas através de cálculos manuais realizados com os valores monoisotópicos dos íons pertencentes aos espectros MS<sup>2</sup>, uma vez que o software *LCMS solution* (SHIMADZU) não exporta os dados de maneira compatível,

para os algoritmos de desconvolução e interpretação, comercialmente existentes no mercado, como, por exemplo, os softwares Peaks, X!Tandem, OMSSA.

Todos os espectros gerados foram analisados a fim de verificar a presença de peptídeos, ou se compostos de outra natureza estavam presentes. O procedimento foi realizado pela avaliação do envelope monoisotópico, observando-se o pico selecionado era formado por um envelope de íons que apresentavam diferença de relação massa carga ( $m/z$ ) igual 1 (carga +1), 0,5 (carga +2), 0,33 (carga +3), e assim por diante.

Após verificar a presença dos peptídeos todos, os espectros passaram pelo processo manual de desconvolução de todos os íons para a forma monoprotônica  $[M+H]^+$ ; por exemplo, íons que possuíam carga +2, i.e.  $[M+2H]^{2+}$ , tiveram sua massa multiplicada por dois e subtraída de uma unidade, para então passarem a ter seu valor de  $m/z$  correspondente a  $[M+H]^+$ . Portanto, para interpretação da sequência foram utilizados dados correspondentes a íons em diferentes estados de carga, sendo observado predominância de íons nas formas  $[M+3H]^{+3}$  e  $[M+4H]^{+4}$ , embora tenham sido observados íons também na forma  $[M+2H]^{+2}$ . Para se chegar à sequência primária dos peptídeos fracionados foram utilizados a fragmentação de todas as formas presentes.

Os dados oriundos de cada íon em suas diferentes formas foram então utilizados para reconstrução do espectro com auxílio do programa Excel para que os cálculos podem ser efetuados e se chegasse à sequência dos resíduos de aminoácidos. A partir destes valores os espectros foram reconstruídos com seu valor de  $m/z$  correspondente a  $[M+H]^+$  (eixo  $x$  do gráfico) e seus respectivos valores de intensidade relativa em porcentagem (eixo  $y$  do gráfico).

Com os dados organizados e o espectro reconstruído iniciou-se o procedimento de interpretação do espectro propriamente dito. A subtração sucessiva dos picos foi feita a fim de se chegar a uma série de íons. Com a sequência encontrada em mãos utilizou-se do software MassLynx (v3.2) para verificação e validação da sequência obtida. A partir deste software as diferentes séries de íons observadas pela fragmentação teórica obtida foram contrastadas com os valores  $m/z$  presentes no espectro reconstruído. O valor de erro de tolerância adotado correspondeu a 0,5 Da. Avaliou-se os valores de cada série de íons ( $-a$ ,  $-b$ ,  $-c$ ,  $-x$ ,  $-z$  e  $-y$ ), assim como a presença de íons correspondentes às séries  $-d$  e  $-w$  para diferenciação dos resíduos de leucina e isoleucina. Para resolver ambiguidade de resíduos de lisina e glutamina realizou-se derivação com anidrido acético.

Para diferenciação de resíduos isóbaros de leucina e isoleucina, observou-se a presença de fragmentos iônicos do tipo  $-d$  e  $-w$ . Fragmentações simuladas também foram criadas a partir da utilização do *software* Protein/Peptide Editor no BioLynx/Mass Lynx (v

3.2) da Micromass, com diferentes combinações de I e/ou L em posições ambíguas das sequências. Em seguida, essas sequências simuladas foram comparadas aos espectros, auxiliando na identificação de fragmentos iônicos tanto da série *-d* como também da série *-w*.

Por conta do elevado número de espécies de peptídeos presentes no veneno e a baixa quantidade relativa de cada espécie algumas frações apresentaram espectros de MS<sup>2</sup> com reduzido número de picos.

#### 7.2.4 Acetilação dos Resíduos de Lisina

Esta reação tem como função distinguir os resíduos isóbaros de Lys e Gln, sendo que o resíduo C-terminal com amina livre também sofre acetilação, reação esta, mostrada no esquema 1. Nesta reação, ocorre a introdução de um grupamento acetil em um composto orgânico, no lugar de um hidrogênio das aminas primárias. Para tanto, a amostra (1µg/µL) foi solubilizada em 5 mL Anidrido Acético (Merck Química Brasil, 98%), homogeneizada em vórtex e incubada por 45 minutos a 37° C sob leve agitação. Em seguida, analisou-se por ESI-MS<sup>n</sup> e MS<sup>2</sup>. O resultado da reação é o acréscimo de 42 Da à massa do resíduo de Lys .

#### 7.2.5 Identificações dos peptídeos

O uso de ferramentas de bioinformática é de fundamental importância na área de identificação de peptídeos e proteínas, tanto na busca de informações biológicas quanto no armazenamento das mesmas. No presente trabalho, as ferramentas de bioinformática que foram utilizadas foram: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e BLAST-ArachnoServer (<http://www.arachnoserver.org/blastForm.html>). Diversas tentativas em utilizar outras ferramentas tais como o banco de dados SCORPION ([sdmc.krdl.org.sg:8080/scorpion](http://sdmc.krdl.org.sg:8080/scorpion)) ou ATDB (Animal Toxins Database: <http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin>) foram feitas, porém sem sucesso, já que os bancos encontravam-se desativados.

#### 7.2.6 Síntese de peptídeos em Fase Sólida

A síntese dos peptídeos lineares foi realizada através do método manual em fase sólida (MERRIFIELD 1986), utilizando-se N-9-fluorenilmetoxicarbonil, também conhecida como estratégia Fmoc (Tabela 2), peptídeos esses que foram utilizados para a realização dos ensaios biológicos.

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se 100 mg de resina NovaSyn TGR, com grau de substituição de 0,2 mmol e/g (sendo que o rendimento gira em torno de 30%, podendo

diminuir a medida que aumenta o número de resíduos de aminoácidos na sequência peptídica). Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo N-Hidroxibenzotriazol (HOBt.H<sub>2</sub>O, NOVABIOCHEM) e N-Metilmorfolina (NNM, ALDRICH) como agentes ativadores dos aminoácidos e Hexafluorofosfato Benzoitriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfinio (PyBOP, NOVABIOCHEM) como agente acoplante, por um período de 30 minutos. Após cada ciclo de acoplamento foram realizadas cinco lavagens da resina com N-N-Dimetilformamida (DMF, SYNTH) e em seguida foi feita a desproteção utilizando Piperidina (FLUKA) 30% em DMF (Tabela 3).

**Tabela 3.** Procedimento e reagentes adotados na Síntese em Fase sólida.

Etapas	Reagentes	Nº aplicações	Tempo
Desproteção	Piperidina/DMF (30:70)	duas	quatro min
Lavagem da resina	DMF	cinco	45 segundos
Ativação do aminoácido	HOBt.H <sub>2</sub> O [0,5 mmol/DMF]	uma	3 min
Acoplamento	105 mg PyBOP/NNM 1mmol/DMF	uma	30 min
Lavagem da resina	DMF	cinco	45 segundos

Todas as reações foram realizadas sob agitação mecânica em capela de segurança. Após a acoplagem do último resíduo de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05). Após a secagem, foi feita a clivagem entre peptídeo/resina utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapurificada 5% (v/v), durante 2 horas sob agitação mecânica. Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-Peptídeo foi filtrada para a retirada da resina e centrifugada em uma centrífuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH) para promover a precipitação do peptídeo e uma primeira etapa de retirada dos solventes e subprodutos da síntese. O material sedimentado foi então re-suspendido em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754) para então ser purificado através de cromatografia líquida. O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS.

### 7.2.7 Purificação dos peptídeos

A purificação dos peptídeos provenientes da síntese manual foi feita através de cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, *Reversed-phase High Performance Liquid chromatography*) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-8A, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-20A, constituído por duas bombas LC-8A (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 2 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo SCL 10Avp) e coluna preparativa Shimpack C-18 PREP-ODS(K) 30 x 250 mm (SHIMADZU). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, sendo **A**: água, contendo 0,1% TFA (v/v); e **B**: MeCN (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v). O fluxo do solvente para todos os peptídeos foi de 10 mL/min. As frações coletadas, correspondendo ao pico de absorbância, foram reunidas e parcialmente evaporadas em equipamento Rotavapor, sendo que o material restante foi seco em Speed-vac e pesado. O rendimento da síntese de cada peptídeo foi de aproximadamente 30%.

## 7.3 Atividades Funcionais

### 7.3.1 Animais

Para os ensaios de determinação das possíveis atividades biológicas dos peptídeos identificados neste trabalho, utilizaram-se dois modelos animais: ratos Wistar machos com cerca de 200 gramas e camundongos Swiss machos com cerca de 90 dias. Tanto os ratos (cujas secreções foram utilizadas para os ensaios de hemólise, desgranulação de mastócitos e quimiotaxia) quanto os camundongos (utilizados nos ensaios de hiperalgesia e edema), foram anestesiados com quetamina e xilazina na proporção de 1:1 (v/v). Os camundongos, utilizados nos ensaios de secreção de insulina, foram anestesiados com CO<sub>2</sub>.

### 7.3.2 Atividade Hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados a partir de modificações da metodologia descrita por Baptista-Saidemberg e colaboradores (2007). As concentrações testadas para os peptídeos variaram de 10<sup>-7</sup>M a 10<sup>-3</sup>M (concentrações estas, já bem estabelecidas na literatura).

Foram adicionados cerca de 500 µL de sangue extraído da cauda de ratos Wistars machos em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85 %, CaCl<sub>2</sub> 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos, em agitador magnético (MA-089 MARCONI). A suspensão de eritrócitos foi

centrifugada em presença de solução salina, em uma centrífuga clínica (Z-200A HERMLE) a 3000 rpm durante 15 minutos para lavagem das células, também em solução salina. Esta operação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias obtido ao final das centrifugações foi considerado como sendo 100 % de células (~ 280 µL).

Em seguida, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 1 % diluindo-se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão de células a 0,5 % foi utilizada nos testes de atividade hemolítica. Foram montadas baterias de ensaios em microplacas (COSTAR), onde cada orifício foi preenchido com os diferentes peptídeos, solubilizados em solução salina: no primeiro poço de cada linha correspondente à toxina/mistura das toxinas foi colocado 90 µL de solução salina. Nos demais poços colocaram-se apenas 50 µL de solução salina.

Em seguida, acrescentou-se 10 µL da solução de peptídeo(s) (solubilizado em água ultrapura) nas diferentes concentrações e proporções em cada primeiro poço e promoveram-se diluições nos demais poços referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 50 µL de suspensão de eritrócitos em cada poço, perfazendo um volume final de 100 µL. Para o controle de 0% de hemólise, misturou-se 50 µL de solução salina e 50 µL de suspensão de eritrócitos. Para o controle de 100 % de hemólise, misturou-se 40 µL de solução salina, 10 µL de 1 % (v/v) de Triton X-100 (SIGMA) e 50 µL de suspensão de eritrócitos.

A microplaca foi incubada à temperatura ambiente (~ 26 °C) por 2 horas sob agitação. Após o período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Compacta Avanti 30 (BECKMAN). O sobrenadante de cada preparação foi utilizado para a montagem de uma nova placa, para realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (Amersham Bioscience, modelo Biotrak II), com filtro de 540 nm.

### **7.3.3 Atividade Desgranuladora de mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de Ratos Wistar Machos**

A desgranulação de mastócitos foi determinada através de medidas da liberação de β-D-glucosaminidase (que se co-localiza com a histamina) a partir dos grânulos, segundo metodologia descrita por Hide e colaboradores (1993), com algumas modificações. As concentrações testadas para os peptídeos de interesse são as mesmas realizadas nos ensaios de atividade hemolítica ( $10^{-7}$  M a  $10^{-3}$  M, concentrações estas, já bem estabelecidas na literatura).

Para a realização dos ensaios de Desgranulação de mastócitos, foi necessária a preparação das soluções:

- Solução MCM-1 (Mast Cell Medium): 150 mM NaCl (MERCK), 4 mM KCl (MERCK), 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SYNTH), 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SYNTH), 5 mM glucose (SYNTH), 15 M BSA (SIGMA) e 1 mM CaCl<sub>2</sub> (VETEC).
- Solução MCM-2: 100 mL de solução MCM-1 e 50 L de Lique mine (heparina sódica 5000 UI/0,25 mL ROCHE)
- Solução SH: 0,2 M de citrato de sódio (MERCK), com pH 4.5 e 0,0034 g de p-nitrofenil-BD-glicosamina (SIGMA).

A cavidade peritoneal foi exposta por meio de um corte longitudinal que permitiu o afastamento dos órgãos para a lavagem da cavidade com 20 mL de solução MCM-2, para a extração do fluido contendo os mastócitos em suspensão. O líquido peritoneal foi coletado com auxílio de uma seringa e, armazenado em banho de gelo. Repetiu-se esse procedimento três vezes. O líquido peritoneal foi centrifugado a velocidade de 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado.

Um volume de 2 mL da solução MCM-1 foi utilizado na ressuspensão do sedimento de células, seguida por centrifugação respeitando as mesmas condições anteriores. Descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se em 2 mL de MCM-1. Essa suspensão de células foi utilizada nos experimentos de desgranulação de mastócitos.

Realizou-se a contagem de células em Câmara de Neübauer com auxílio de uma solução corante 0,05 % (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6 M). Ajustou-se a concentração para  $7,8 \times 10^5$  células/mL.

A microplaca (COSTAR) foi preparada de maneira semelhante à do ensaio anterior. No primeiro poço de cada linha correspondentes à toxina/mistura das toxinas foi colocado 90 µL de MCM-1. Nos demais poços, colocou-se apenas 50 µL de MCM-1.

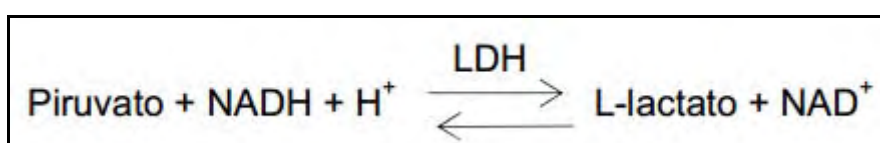
Em seguida, acrescentou-se 10 µL da toxina (solubilizado em água ultrapura) nas diferentes proporções em cada primeiro poço e promoveu-se diluições nos demais poços referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 50 µL de suspensão de mastócitos em cada poço, perfazendo um volume final de 100 µL. Para o controle de 0% de Desgranulação, misturou-se 50 µL de MCM-1 e 50 µL de suspensão de mastócitos. Para o controle de 100% de Desgranulação, misturou-se 50 µL de MCM-1 e 50 µL de suspensão de mastócitos que foi sonificado por 15 minutos em sonicador (BRANSON 1210).

Incubou-se a microplaca por 15 minutos em banho Maria a 37 °C para o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Em seguida, centrifugou-se o conteúdo de cada orifício a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado na sequência das análises. Os sobrenadantes resultantes desta última centrifugação foram utilizados para a montagem de uma nova placa, na qual cada orifício continha 50 µL deste sobrenadante e 50 µL de Solução SH. Esta nova placa foi incubada por 6 horas a 37 °C. Passado esse período, descartou-se 50 µL de cada orifício e acrescentou-se 150 µL de solução Tris 0,2 M (SIGMA) a cada um deles.

A Desgranulação foi medida através da leitura de absorbância a 405 nm em uma leitora de placas (Amersham Bioscience, modelo Biotrak II). Os resultados foram expressos em função da relação entre as proporções das concentrações molares de cada peptídeo e a porcentagem de Desgranulação.

#### 7.3.4 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

O kit de LDH utilizado (Biotécnica) tem como finalidade determinar quantitativamente a atividade da desidrogenase láctica (LDH) no soro e plasma. O método tem como princípio que a lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato por NADH, obtendo-se lactato e NAD<sup>+</sup>. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medida por espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm. A reação está representada abaixo:



A cavidade peritoneal dos ratos foram lavadas com 20 mL da solução MCM-2 e coletar em tubo Falcon que devem estar no gelo; realizar este procedimento por 3 vezes. Em seguida o fluido peritoneal foi centrifugado a 100 g/ 100 rcf por 5 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e realizou-se 3 lavagens em 2 mL de solução MCM-1.

Após a última centrifugação, a suspensão de células foi utilizada para o ensaio. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer com o auxílio da solução corante 0,05 % (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6 M), ajustando a concentração de células para 4,5x10<sup>5</sup> cel/ mL.

A microplaca (COSTAR) foi preparada de maneira semelhante à do ensaio anterior. Colocou-se 10 µL de MCM-1 em cada poço. Em seguida, acrescentou-se 10 µL da toxina (solubilizado em água ultrapura) em cada primeiro poço e promoveu-se diluições nos demais poços referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 90 µL de suspensão de mastócitos em cada poço, perfazendo um volume final de 100 µL. Para o controle de 100% de LDH, misturou-se 10 µL de solução de Triton X-100 com 90 µL de suspensão de mastócitos. Para controle de 0% misturou-se 10 µL de solução MCM-1 com 90 µL de suspensão de mastócitos.

A microplaca foi incubada a 37°C em estufa por 15 minutos. O conteúdo de cada orifício foi transferido para eppendorffs e centrifugado a 100 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação 20 µL da solução foi misturado com 1 mL da solução de LDH (4 partes de R1 (tampão TRIS 50mmol/L pH 7,5; piruvato 0,6 mmol/L e azida sódica 0,09% p/v) para 1 parte de R2 (NADH 0,18mmol/L; azida sódica 0,09% p/v)) foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. As leituras de absorbância em 340nm foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 (Amersham Bioscience) ao longo de 5 minutos com intervalos de 1 minuto entre cada leitura a fim de se medir o consumo da desidrogenase láctica.

Utilizando as leituras de absorbância foi possível calcular a média da variação da absorbância por minuto segundo a fórmula abaixo:

$$(\Delta A/\text{min}) = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3}$$

Em que A representa os diferentes intervalos de tempo, por exemplo, A<sub>0</sub>= 0 minutos, A<sub>1</sub>= 1 minuto, e assim sucessivamente. Soma da variação em as diferentes medidas é dividida pelo número de medições realizadas.

A atividade de LDH expressa em U/L é então medida multiplicando-se a média da variação da absorbância por minuto, pelo fator que corresponde a 8095.

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 8095$$

A metodologia obedece a lei de Lambert-Beer, e, portanto os cálculos podem ser efetuados através do Fator de Calibração (FC).

$\Delta A/\text{minuto médio} = \text{variação média da absorbância por minuto.}$

$AC = \text{Atividade de LDH do Calibrador} = \times \text{U/L}$

$AT = \text{Atividade de LDH do Teste em U/L} = \Delta A/\text{minuto do Teste} \times FC$

$FC = \text{Fator de Calibração} = AC \div \Delta A/\text{minuto médio do Calibrador}$

Sendo que: 1 U/L (Unidade Internacional) = 1 mol/min/L e 1 Kat (Katal – medida de atividade enzimática) = 1 mol/s/L.

Os resultados foram expressos em função da relação entre as proporções das concentrações molares de cada peptídeo e a atividade enzimática obtida.

### 7.3.5 Prova de sensibilidade bacteriana (MIC)

Os testes para verificação de atividade antimicrobiana dos peptídeos foram realizados através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Os experimentos foram montados em micro-placas de 96 canais e a visualização dos resultados foi feita utilizando-se o cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (MALLINCKRODT), segundo metodologia descrita por Coyle e colaboradores (2003) e Meletiadis e colaboradores (2000). Os peptídeos foram testados contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Escherichia coli* (ATCC 1175), obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais – C.E.I.S. (IBRC/UNESP). Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (DIFCO), meio de cultivo Müller-Hinton Broth (DIFCO) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo material utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (PHOENIX), por 20 minutos à 121° C e 1 atm. Para a realização do experimento, os inóculos foram preparados em solução salina (NaCl 0,9%) à partir de colônias novas (colônias de 18 horas). A concentração desses inóculos foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 µL de inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, sendo essa suspensão utilizada para a montagem das micro-placas.

Em cada orifício da placa foram colocados 10 µL de solução de peptídeo (diluído em água esterilizada em diferentes concentrações), 10 µL da suspensão de inóculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido. Para o valor de referência zero, foram colocados 80 µL de meio Müller-Hinton líquido, 10 µL de água bidestilada esterilizada e 10 µL de salina. Para o valor de referência 100%, foram colocados 10 µL de água e 10 µL da suspensão de inóculo e 80 µL

de meio Müller-Hinton líquido. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34° C, por 18 horas. Após este período, acrescentou-se a cada orifício 10 µL de TTC 0,5% (m/v) em água. As leituras foram realizadas após 3 horas de re-incubação das placas em estufa a 34° C.

### **7.3.6 Ensaio de Inseto-Toxicidade**

Os ensaios de efeito inseticida foram realizados com indivíduos de *Apis mellifera* recém-emergidos de acordo com o protocolo descrito por Manzoli-Palma e colaboradores (2003).

As diferentes dosagens dos compostos foram calculadas através da relação dose (ng)/peso do inseto-modelo (mg) (*A. mellifera*) e os peptídeos testados foram solubilizados em solução fisiológica e as seguintes concentrações foram testadas: 10 ng/mg, 30 ng/mg, 50 ng/mg, 70 ng/mg, 90 ng/mg e 110ng/mg. O grupo controle negativo foi feito a partir da ingestão de solução salina (0,9 M de NaCl). As abelhas foram cuidadosamente imobilizadas com as mãos e 1µL das diferentes concentrações do composto foram injetadas com uma micro-seringa Hamilton de 10µL na hemocele das abelhas, na tentativa de se avaliar a toxicidade e estabelecer o valor da dose letal (DL<sub>50</sub>) ou simplesmente dose/efeito (ED<sub>50</sub>).

Os insetos foram separados em 8 grupos amostrais (controle positivo e controle negativo e as seis concentrações testadas) com 10 indivíduos em cada grupo; a seguir estes indivíduos foram colocados em placas de Petri (10cm de diâmetro), contendo alimento elaborado a partir de uma mistura de mel e sacarose (“candy”).

O comportamento das abelhas foi observado durante 24 horas, tendo observando-se as seguintes respostas ao composto: animal ativo, movimentos lentos, paralisia e morte, conforme descrito por Zlotkin (1983).

### **7.3.7 Atividade Farmacológica**

#### **7.3.7.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 18-21g fornecidos pelo Biotério Central da UNESP. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de 20 ± 3°C e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (CEUAIB, Protocolo

número: 567/09) e obedeceram às normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983).

### **7.3.7.2 Avaliação da Sensibilidade Dolorosa**

Os animais foram submetidos, para avaliação da sensibilidade dolorosa, ao teste do von Frey eletrônico. Foi determinado, a partir desse teste, se os peptídeos testados apresentavam efeito hiperalgésico ou analgésico. Como controle positivo foi utilizado a carragenina. Para avaliação do efeito inflamatório ou anti-inflamatório dos peptídeos foi utilizado um paquímetro digital Mitutoyo<sup>R</sup>. Estes testes foram realizados em diversos tempos sendo que o Peptídeo 3 e o Peptídeo 4 foram administrados por via intraplantar.

### **7.3.7.3 von Frey Eletrônico**

Os animais foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Os animais foram colocados nestas gaiolas 30 minutos antes do início do teste, para adaptação comportamental. Os testes foram realizados apenas quando os animais estavam quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem lamberem seus membros. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica foi mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, SP, BRA). O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registrou automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro for retirado. O teste foi repetido até que se obtivessem três medidas subsequentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fossem maiores que 1 g. Os animais foram submetidos ao von Frey em diversos tempos após a administração, por via intraplantar, dos peptídeos e carragenina (controle positivo).

### **7.3.7.4 Edema de Pata**

Foi avaliado o efeito edematogênico do Peptídeo 3 e do Peptídeo 4. Os animais receberam uma aplicação intraplantar (em uma das patas) de cada peptídeo, carragenina 1%, ou veículos (controles). O volume da pata foram realizadas nos tempos zero (imediatamente

após as injeções dos peptídeos ou carragenina) e em diversos tempos após a injeção do agente flogístico<sup>99</sup>, utilizando um Paquímetro digital marca Mitutoyo<sup>R</sup> (Código 500-196-20B) de especificação 0-150X0,01 mm paquímetro (modelo CD-6''CSX-B, Mitutoyo Sul Americana Ltda).

O aumento percentual do volume das patas foi calculado através da expressão:

$$A (\%) = (V_f - V_i) \times 100 / V_i$$

Onde: A (%) = aumento percentual do volume da pata;

$V_i$  = volume inicial da pata;

$V_f$  = volume da pata após a injeção dos peptídeos, carragenina ou veículo (controle).

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores controles (animais injetados com veículo) dos valores testes (animais injetados com os peptídeos).

#### **7.3.7.5 Análise Estatística**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Os dados referentes aos tratamentos foram estatisticamente examinados utilizando ANOVA de duas vias, seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **8. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados foram divididos em duas partes:

**PARTE I:** Resultado das Análises Estruturais dos peptídeos isolados do veneno do escorpião  
*T. serrulatus*

**PARTE II:** Resultado das Análises Funcionais dos Peptídeos Sintéticos

## **PARTE I: RESULTADO DAS ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS ISOLADOS DO VENENO DO ESCORPIÃO *T. serrulatus***

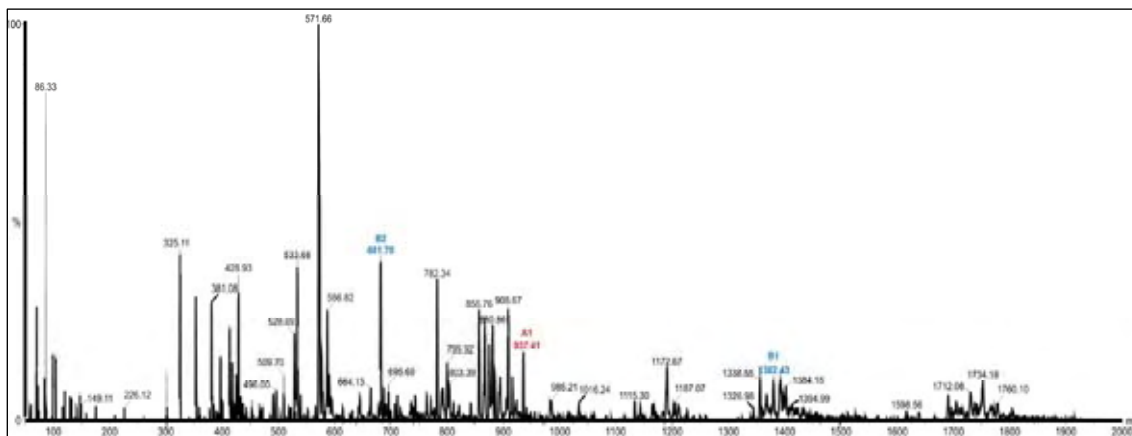
O estudo do veneno teve início com a extração do material biológico, realizada no Instituto Butantan. O veneno foi extraído através do método de estimulação elétrica.

A respeito da solubilização do veneno, o que encontramos hoje na literatura a cerca de estudo de peptídeos, utiliza água deionizada (ou tampões aquosos) seguido de cromatografia de exclusão molecular, e posteriormente cada uma das frações obtidas neste primeiro passo de cromatografia é então submetido à cromatografia de fase reversa (ou HPLC - *High-performance liquid chromatography*) (BATISTA et al. 2006; RATES et al. 2008; BATISTA et al. 2004; CALISKAN et al. 2006; SCHWARTZ et al. 2008; VANDENDRIESSCHE et al. 2010; BATISTA et al. 2007 e D'SUZE et al. 2010). Nesta estratégia os peptídeos hidrofóbicos não são solubilizados em água, e são eliminados pelo processo de extração; portanto, não sendo extraídos, têm sido negligenciados na literatura. Além disso, a grande maioria das publicações existentes na literatura descreve o uso de uma cromatografia de exclusão molecular já no primeiro passo de cromatografia, o que também propicia a perda de peptídeos pequenos, já que a cromatografia de exclusão molecular permite a separação de moléculas maiores e retém os peptídeos no alto da coluna, onde são muito diluídos e não detectados.

Tendo em vista os estudos já realizados com peptídeos presentes no veneno de escorpião, o presente estudo teve início com a solubilização do veneno bruto em acetonitrila (MeCN) 50% (v/v), a fim de isolar os pequenos peptídeos lineares, negligenciados pela abordagem realizada com extração em solução aquosa. A estratégia tem como princípio isolar peptídeos pequenos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos. O veneno solubilizado foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, à temperatura de 4 °C, e o sobrenadante foi coletado, e então submetido a filtração em filtro de exclusão Millipore de 3.000 Da. O filtrado foi aplicado em HPLC para fracionamento dos compostos e também analisado em espectrômetro de massas ESI-MS do tipo triplo quadrupolo (MicroMass Quattro-II) para compreensão da gama de peptídeos presentes no veneno bruto.

### **8.1 Análises do veneno bruto em espectrômetro de massas ESI-MS e MS/MS**

A análise do veneno bruto em espectrômetro de massas ESI-MS, do tipo triplo-quadrupolo, pode ser observada na Figura 15.

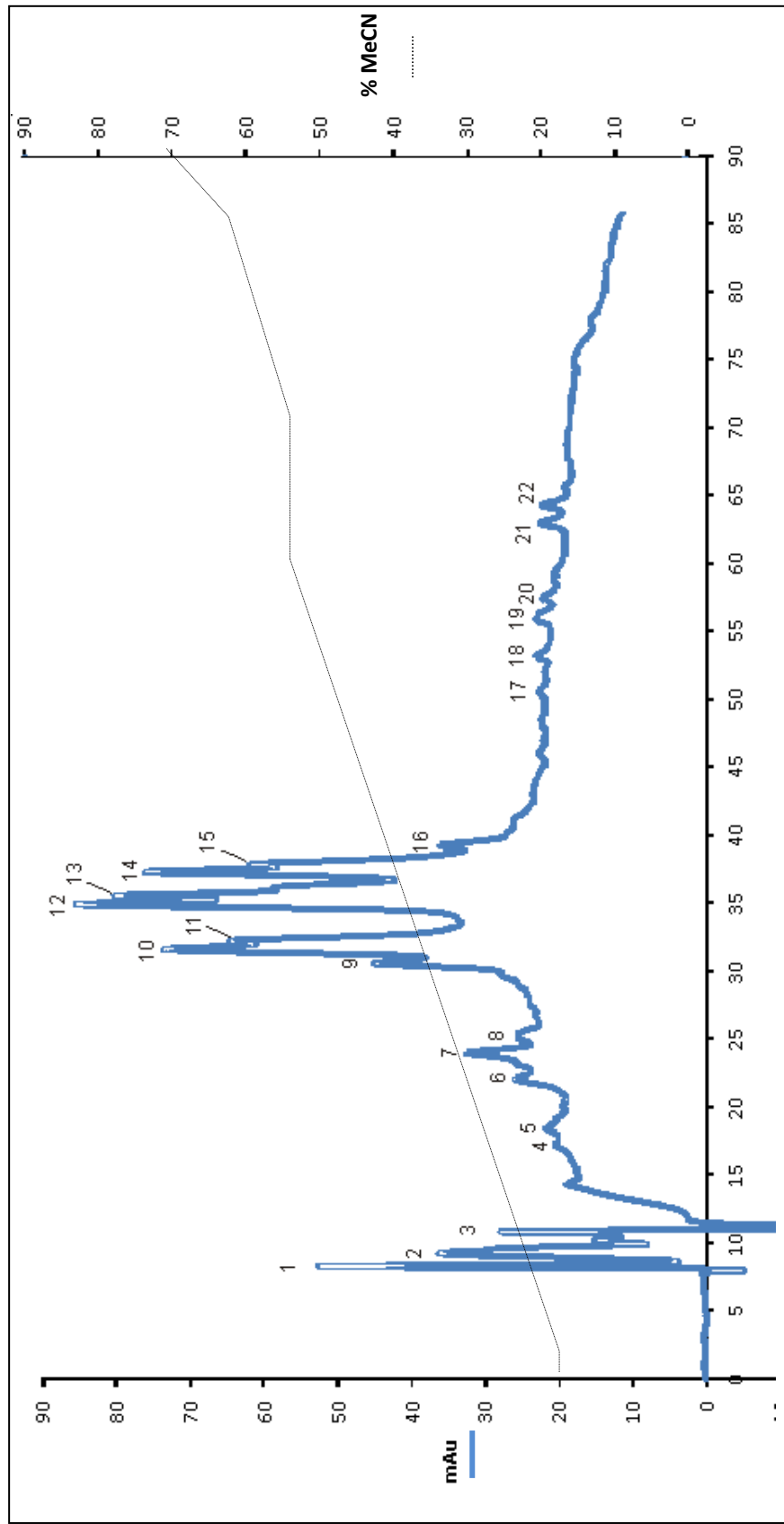


**Figura 15.** Espectro de massas ESI no modo positivo, do veneno bruto de *Tityus serrulatus* extraído em MeCN 50% (v/v). **A:** Íon de  $m/z$  937,4; **B:** Íon de  $m/z$  1363,07 (B1. Íon na forma  $[M+H]^+$  e B2. Íon na forma  $[M+2H]^{2+}$ ).

No espectro acima observamos as relações massa/carga ( $m/z$ ) presentes no veneno bruto de *Tityus serrulatus* extraído em MeCN 50% (v/v). Já nesta análise foram identificados dois peptídeos mais abundantes (observados na Figura 1 com uma série de íons assinalados por **A** e **B**); um deles foi observado como íons de  $m/z$  1362.07 na forma de  $[M + H]^+$ , e  $m/z$  681,70 na forma de  $[M + 2H]^{2+}$  correspondendo a um peptídeo de massas molecular 1362,07 Da. O outro peptídeo observado pode ser visualizado na Figura 1 como um único íon de  $m/z$  937,41 na forma de  $[M + H]^+$ , correspondendo a um componente de massa molecular igual a 936,41 Da. Esses peptídeos foram também detectados posteriormente em análise por espectrometria de massas em LC/MS IT-ToF e sequenciados.

## 8.2 Fracionamento do veneno sob fase reversa em HPLC

Para descomplexar o veneno bruto e permitir a detecção e sequenciamento do maior número possível de peptídeos, realizou-se o fracionamento em HPLC (Shimadzu) da fração do veneno solúvel em MeCN, utilizando-se de coluna TOSOH TSK-Gel ODS-80 Tm (C18 - 7,8 x 3000 mm). O gradiente de MeCN (%B) estabelecido pode ser visualizado na Figura 16.



**Figura 16.** Em linha azul: perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno do escorpião *T. serrulatus* RP-LCMS (SHIMADZU, Kyoto), utilizando-se de uma coluna TOSOH TSK-Gel ODS-80 Tm (C18 - 7,8 x 3000 mm) e um fluxo constante de solventes de 1 ml/min. Linha tracejada: gradiente de MeCN (%B): a eluição foi realizada inicialmente a 20% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA), seguida por um gradiente linear de 20 a 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 0,1 a 60,0 min, seguido de condição isocrática de 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 60,1 a 70,0 min, seguido por gradiente linear de 60 a 70% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 70,1 e 80 min e por fim gradiente linear de 70 a 80% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 80,1 a 90,0 min. a 28 °C.

Foram coletadas manualmente 22 frações (Figura 15). Cada uma delas foi liofilizada e mantida em ultrafreezer a -80°C. Em período subsequente as frações foram analisadas em espectrômetro de massas LC/MS-IT-ToF (Shimadzu) para determinação da sequência primária dos peptídeos. O sequenciamento dos peptídeos (Figuras 16 a 22) apresentados neste trabalho foi possível graças à utilização de técnicas modernas de espectrometria de massas (LC-IT-TOF-MS e MS<sup>n</sup>).

### **8.3 Análise das frações cromatográficas por espectrometria de massas ESI- IT-ToF**

Para se chegar à sequência primária dos peptídeos mais abundantes presentes no veneno do escorpião *T. serrulatus*, cada uma das frações foi submetida separadamente à análise por espectrometria de massas do tipo massas ESI- IT-ToF.

Para aquisição dos dados adotou-se a seguinte metodologia: solubilizou-se o peptídeo em 100 µL MeCN 50% (v/v) e adicionou-se 1 µL de ácido fórmico (TEDIA). A injeção foi realizada por sistema automatizado.

As frações que apresentaram material suficiente para detecção e fragmentação do peptídeo serão descritas abaixo.

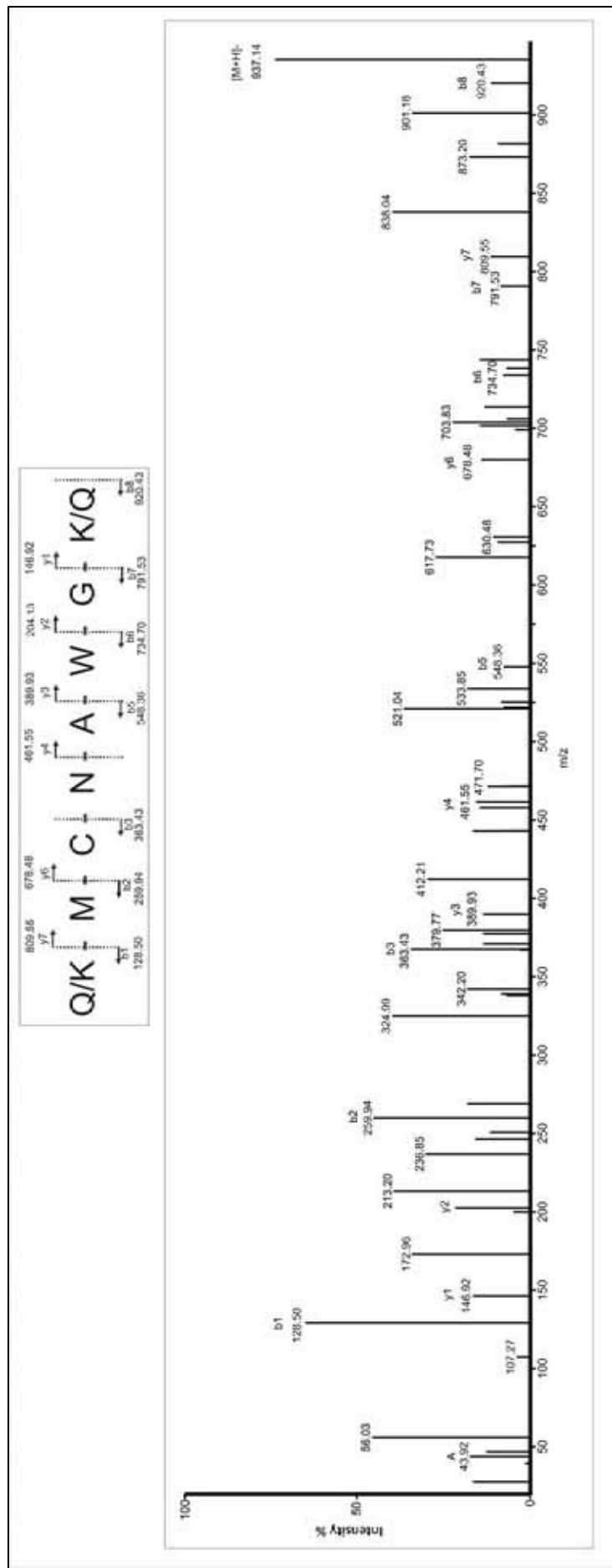
A nomenclatura dos compostos presentes em veneno de escorpião é extremamente variada e confusa, sendo que ainda não se chegou a um consenso de como as os componentes peptídicos de venenos de escorpiões devem ser denominadas; algum consenso foi estabelecido para as neurotoxinas, mas não para os demais componentes. O resultado desta divergência em termos de nomenclatura pode ser visualizado na Tabela 1, citada anteriormente. A mesma toxina pode possuir até cinco diferentes denominações, criando gerando muita confusão para se designar os nomes destas toxinas.

As toxinas descritas neste trabalho foram denominadas “Fração”, seguido de um número correspondente à ordem em que o peptídeo foi eluído durante a cromatografia líquida de fase reversa. Vale ressaltar que as frações que não apresentaram conteúdo peptídico ou que não foi possível se chegar à sequência primária completa não serão discutidas e não foram nomeadas.

### 8.3.1 Fração 10

O espectro ESI-MS da fração 10 revelou um componente peptídico com íon molecular de  $m/z$  469,5 na forma  $[M+2H]^{+2}$  (resultados não mostrados), correspondente à massa molecular 936,41 Da.

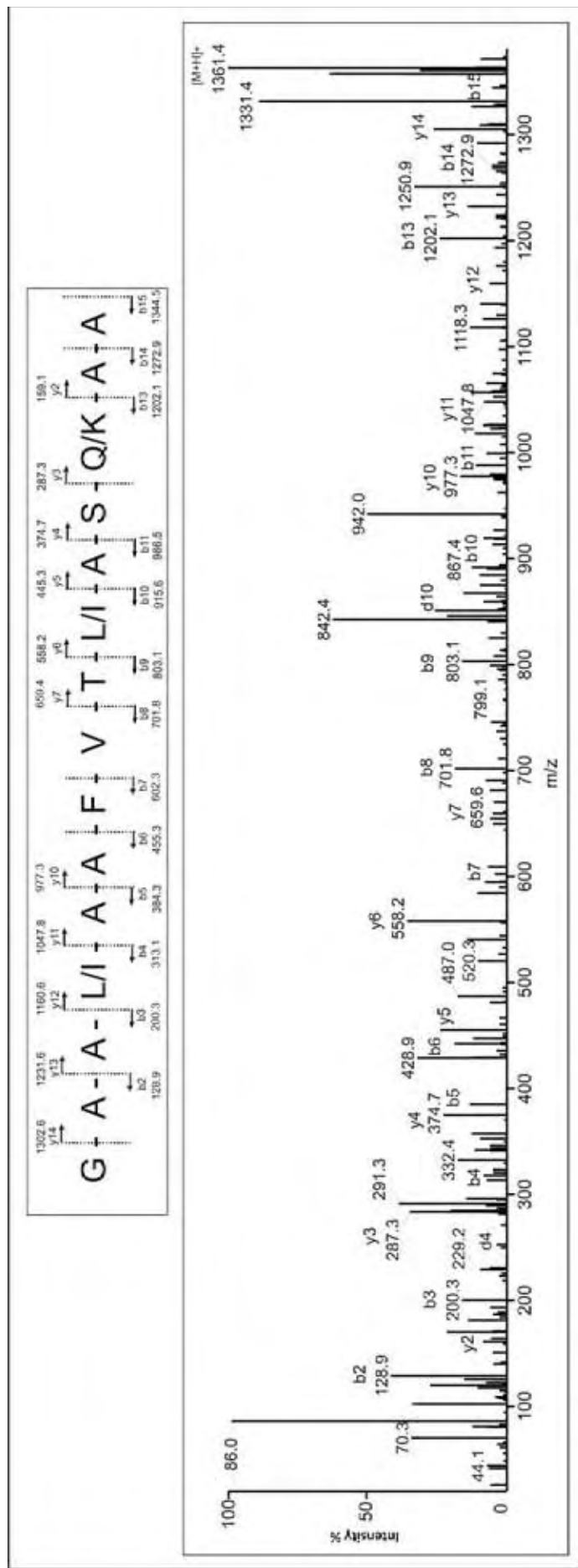
O sequenciamento deste peptídeo foi realizado à partir de seleção do precursor de  $m/z$  469,6 na forma  $[M+2H]^{+2}$ , para fragmentação sob condições de CID; o resultado obtido está mostrado na Figura 17. Neste espectro foram encontradas as séries incompletas de íons  $b$  e  $y$ , que por sua vez foram utilizadas para se determinar a sequência do peptídeo. A ausência do íon  $b_4$  foi complementada pela presença do íon oposto  $y_4$ ; além disso, observou-se  $[(b_5 - b_4) + 1] = 186$ , o que dá a possibilidade de existirem os dipeptídeos: AN, NA, GQ, QG, GK ou KG. Já na série  $-y$ ,  $[(y_6 - y_4) + 1] = 216$ , resulta em apenas duas possibilidades: CN ou NC. Por meio da sobreposição das duas séries chegou-se à sequência completa do peptídeo. O uso das duas séries permite também a confirmação de cada um dos resíduos de aminoácidos. Em análise futura, o peptídeo será submetido à acetilação com anidrido acético para diferenciação dos fragmentos de glutamina (Q) e lisina (K). A sequência interpretada foi: **Q/K – M – C – N – A – W – G – Q/K**. A massa molecular do peptídeo com a sequência mostrada acima, é compatível com o resíduo C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência deste peptídeo é: **Q/K – M – C – N – A – W – G – Q/K - NH<sub>2</sub>**.



**Figura 17.** Espectro de massas  $MS^2$  em condições de CID no modo positivo, já desconvolvido na forma  $[M + H]^+$ , com a respectiva interpretação de sequência do peptídeo presente na fração 10. Foi selecionado o íon precursor de  $m/z$  469,5 na forma  $[M+2H]^{+2}$ .

### 8.3.2 Fração 12

O espectro ESI-MS da fração 12 revelou um componente peptídico caracterizado pela presença de íons moleculares de  $m/z$  661,70 na forma  $[M+2H]^{+2}$  e de  $m/z$  1362,43 na forma  $[M+H]^+$  (resultados não mostrados), correspondente a um componente de massa molecular 1361,07 Da. O sequenciamento deste peptídeo foi realizado à partir de seleção do precursor de  $m/z$  661,70 na forma  $[M+2H]^{+2}$ , para fragmentação sob condições de CID; o resultado obtido está mostrado na Figura 18. Devido à ausência de alguns íons da série  $-b$  ( $b_1$  e  $b_{12}$ ), utilizou-se também a série  $-y$ ; a sobreposição das duas séries chegou-se à sequência completa do peptídeo. A sequência determinada para o peptídeo presente na fração 12 foi: **G – A – A – L/I – A – A – F – V – T – I/L – A – S – Q/K – A – A**. A massa molecular do peptídeo com a sequência mostrada acima, é compatível com a porção C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência deste peptídeo é: **G – A – A – L/I – A – A – F – V – T – I/L – A – S – Q/K – A – A – NH<sub>2</sub>**. As ambiguidades entre os resíduos de Leucina e Isoleucina foram solucionados por meio da observação das séries  $-d$  e  $-w$ . A ambiguidade na posição 4 foi solucionada pela observação do íon de  $m/z$  271,17 ( $-d_4$ ), sendo uma isoleucina. Já a ambiguidade na posição 10 foi solucionada pela observação do íon de  $m/z$  845,40 ( $-d_{10}$ ), sendo uma leucina. Portanto, a sequência de aminoácidos para o peptídeo com a distinção dos resíduos isóbaros é: **G – A – A – I – A – A – F – V – T – L – A – S – Q/K – A – A – NH<sub>2</sub>**. Em análises futuras, o peptídeo será submetido à acetilação com anidrido acético para diferenciação dos fragmentos de glutamina (Q) e lisina (K).



**Figura 18.** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvoluído na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência para o peptídeo presente na fração 12. Foram selecionados os íons precursores de  $m/z$  661,70 na forma [M+2H]<sup>2+</sup> e de  $m/z$  1362,43 na forma [M+H]<sup>+</sup>.

### 8.3.3 Fração 14

O espectro ESI-MS da fração 14 revelou um componente peptídico caracterizado pela presença íons moleculares de  $m/z$  681,85 na forma  $[M+4H]^{+4}$ , e de  $m/z$  908,74 na forma  $[M+3H]^{+3}$  (dados não mostrados) correspondentes a um componente de massa molecular igual a 2722,42 Da. Os íons moleculares mencionados acima foram selecionados para análise sob condições de CID (Figura 19). A sequência determinada para o peptídeo presente na fração 14 foi obtida levando-se em consideração as séries de íons  $-c$ ,  $-z$ ,  $-w$  e  $-d$ : **Act - R - I/L - D - F - S - W – Q/K - H - I/L - D - P - E - P – Q/K - V - G - S – Q/K - F - A - Y - Y**. Chama atenção nesta sequência a presença de uma modificação pós-traducional no resíduo N-terminal uma acetilação; a massa molecular do peptídeo com a sequência mostrada acima, é compatível com o resíduo C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência deste peptídeo é: **Act - R - I/L - D - F - S - W – Q/K - H - I/L - D - P - E - P – Q/K - V - G - S – Q/K - F - A - Y - Y. - NH<sub>2</sub>**.

A acetilação do resíduo N-terminal tende a diminuir a carga dos fragmentos com retenção de carga do lado N-terminal, empobrecendo o espectro da presença de íons-fragmentos do tipo  $-a$ ,  $-b$ , e  $-c$  (MADSEN e BRODBELT, 2009). Este efeito parece ser potenciado pela observação de que a ligação D-P favorece a clivagem de peptídeos com a carga localizada do lado do resíduo C-terminal (BRECI et al., 2003). A acetilação do resíduo N-terminal associado à presença da ligação D-P torna muito reduzida a carga positiva dos fragmentos gerados sob condições de CID, com a carga retida no lado N-terminal do peptídeo. Isso favorece a fragmentação do lado C-terminal do peptídeo, e, portanto favorece a formação de fragmentos do tipo  $-x$ ,  $-y$ , e  $-z$ , conforme se observa no espectro CID deste peptídeo (Figura 19).

A presença de dois resíduos de prolina no meio da sequência, principalmente avizinados por resíduos de Asp e Glu, favorecem a fragmentação do peptídeo no lado C-terminal, com a formação de uma longa série de fragmentos de íons do tipo  $-z$ . Desta maneira, quando se analisa esse peptídeo por espectrometria de massas sob condições de CID, a cadeia peptídica parece sofrer dois tipos de fragmentações, sempre com a carga retida do lado C-terminal:

- i) sendo uma fragmentação com a predominância de formação de íons do tipo  $-y$ , que se estende ao longo da sequência Act-R-L/I-D-F-S-W-E-H (formando uma série de  $-y_{13}$  a  $y_{22}$ );

- ii) o outro tipo de fragmentação ocorre à partir do primeiro resíduo de Asp na posição 10, até o resíduo C-terminal, com a formação de fragmentos de íons- $z$ , provavelmente devido à rigidez estrutural induzida pela presença de dois resíduos Pro, que conferem a configuração *cis* e *trans* para a cadeia peptídica; assim, uma série de íons se estende de  $z_2$  a  $z_{13}$ , ao longo da sequência ...D-P-E-P-Q/K-V—G-S-Q/K-F-A-Y-Y-NH<sub>2</sub>.

A presença do íon  $y_{13}$  de  $m/z$  1497,43 ajuda a assinalar a presença de Ile/Leu na posição 9, sendo o íon  $y_{13}$  o último da série  $-y$ . O íon-fragmento  $-z_{13}$  de  $m/z$  1482,49 por sua vez, ajuda a assinalar a presença de Asp na posição 10, sendo este íon o primeiro da série  $z$ , observado no espectro da Figura 18. Desta maneira, parece terem ocorrido duas fragmentações em posições diferentes, entre os resíduo Leu/Ile na posição 9 e Asp na posição 10. A ligação ...D-P... está posicionada numa conformação rígida e não linear da cadeia polipeptídica, causada pela presença de dois resíduos de Pro nas posições 11 e 13, propiciando a mudança no padrão de fragmentação de íons  $-y$  entre os resíduos 1 e 9, para íons- $z$  à partir do resíduo 10 até o resíduo C-terminal.

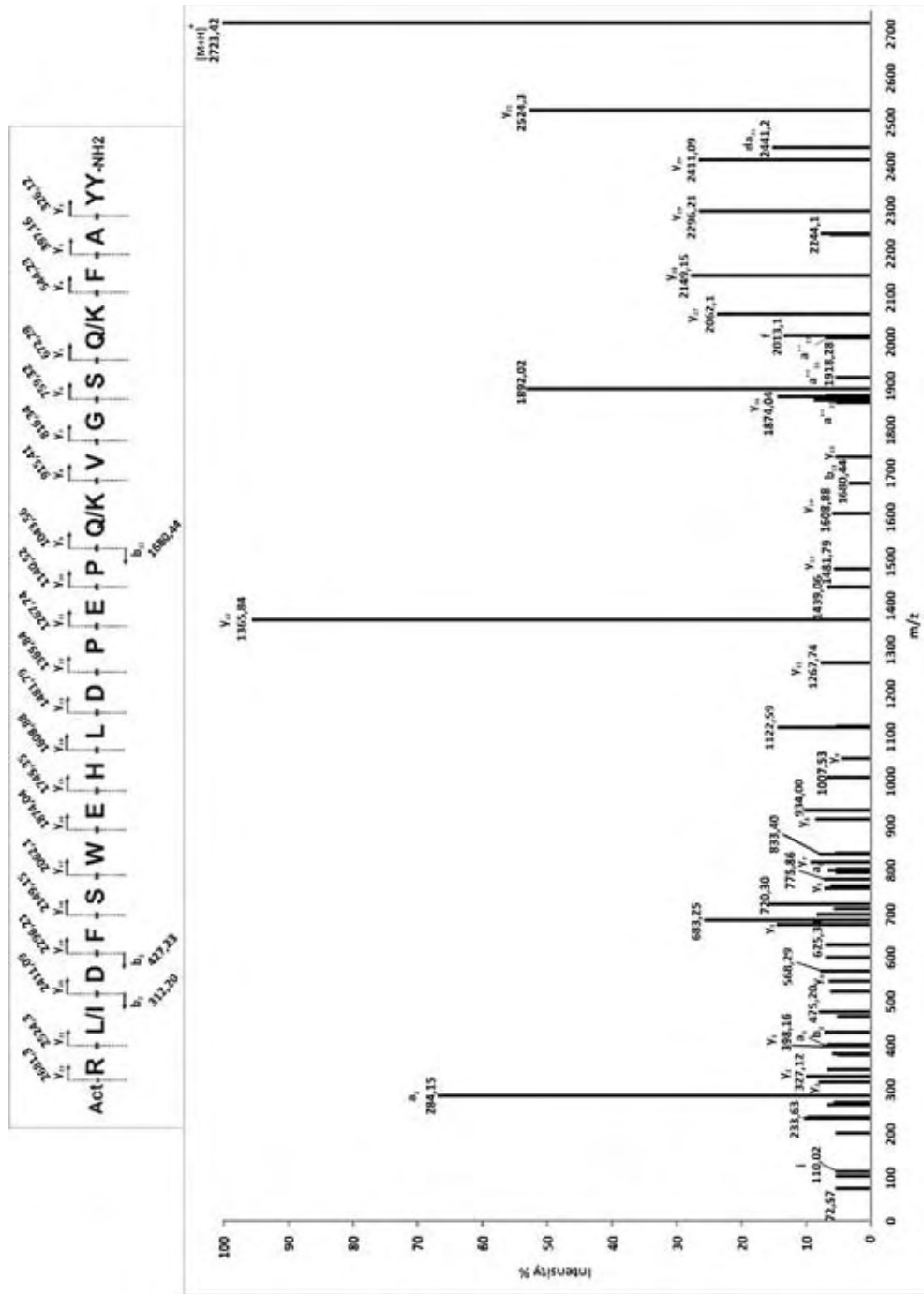
A distinção entre os resíduos de I e L pode ser realizada através da observação dos fragmentos iônicos do tipo  $-d$ . A presença do íon de  $m/z$  2741,17 ( $-d_{21}$ ) permitiu definir a ambiguidade Leucina/Isoleucina desta posição sendo o que o resíduo de aminoácido presente é uma Leucina. Apesar disso, dúvidas relacionadas à distinção entre I e L nas posições N- e C-terminais de cada peptídeo permanece, uma vez que quando estes resíduos de aminoácidos se localizam nas posições terminais, não ocorrem fragmentações das cadeias laterais (MENDES et al., 2004), portanto a ambiguidade na posição 2 entre os aminoácidos isóbaros permaneceu sem resolução. Portanto a sequência de aminoácidos com relação à distinção dos resíduos de I/L é: **Act - R - I/L - D - F - S - W - K - H - L - D - P - E - P - K - V - G - S - K - F - A - Y - Y NH<sub>2</sub>**.

A distinção entre os resíduos de glutamina e lisina foi realizada por meio da reação de derivatização com anidrido acético, seguida por análise ESI-MS e MS<sup>2</sup> (dados não mostrados). A reação do peptídeo com anidrido acético resultou na modificação da massa molecular para 2891,42 Da, indicando um aumento de 168 Da na massa molecular do peptídeo (42 Da x 4), devido à ocorrência de quatro reações de acetilação, i.e., no grupamento  $\alpha$ -amino do resíduo N-terminal e nos grupamentos  $\epsilon$ -amino dos resíduos de Lys. Esse resultado indica a presença de três resíduos de Lys ao invés de Gln na sequência desse peptídeo, uma vez que a cadeia lateral do resíduo de Gln não

sofre reação de acetilação. Portanto, a sequência do peptídeo presente na fração 14 em relação aos resíduos isóbaros K/Q é: **Act - R - I/L - D - F - S - W - K - H - L - D - P - E - P - K - V - G - S - K - F - A - Y - Y NH<sub>2</sub>**.

Estratégias de derivação química do resíduo de aminoácido N-terminal têm sido utilizadas na tentativa de simplificar os padrões de fragmentação dos peptídeos, quando analisados por espectrometria de massas, com pouco sucesso (MADSEN e BRODBELT, 2009). Geralmente em análises *de novo* ocorre mobilização significativa do próton em condições de CID de peptídeos multi-ionizados, resultando na formação tanto de íons-produtos a partir da fragmentação do lado N-terminal, como C-terminal, tornando os espectros CID bastante complexos, com a presença simultânea de íons do tipo *-a*, *-b*, e *-c* de lado, e de íons *-x*, *-y*, e *-z* de outro lado (WANG et al., 2006).

A síntese do peptídeo foi realizada através do método manual em fase sólida – estratégia Fmoc e posteriormente submetido a diferentes bioensaios. Em experimentos futuros o peptídeo será também sintetizado com a presença da modificação pós-traducional detectada (acetilação) e também submetido a diferentes bioensaios.



**Figura 19.** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID, no modo positivo já desconvolvido na forma forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência do peptídeo presente na fração 14. Foram selecionados os ions precursores de m/z 681,85 na forma [M+4H]<sup>4+</sup> e o ion molecular de m/z 908,74 na forma [M+3H]<sup>3+</sup>.

### 8.3.4 Fração 18

O espectro ESI-MS da fração 18 revelou um componente peptídico caracterizado pela presença íons moleculares de  $m/z$  920,51 na forma  $[M+3H]^{+3}$ ,  $m/z$  690,39 na forma  $[M+4H]^{+4}$  e  $m/z$  551,33 na forma  $[M+5H]^{+5}$  (dados não mostrados), correspondentes a um componente de massa molecular igual a 2757,57 Da. Para o sequenciamento deste peptídeo foram selecionados os íons precursores descritos acima, que foram submetidos a análise por espectrometria de massas em condições de CID; o espectro final, já desconvoluido está mostrado na Figura 20.

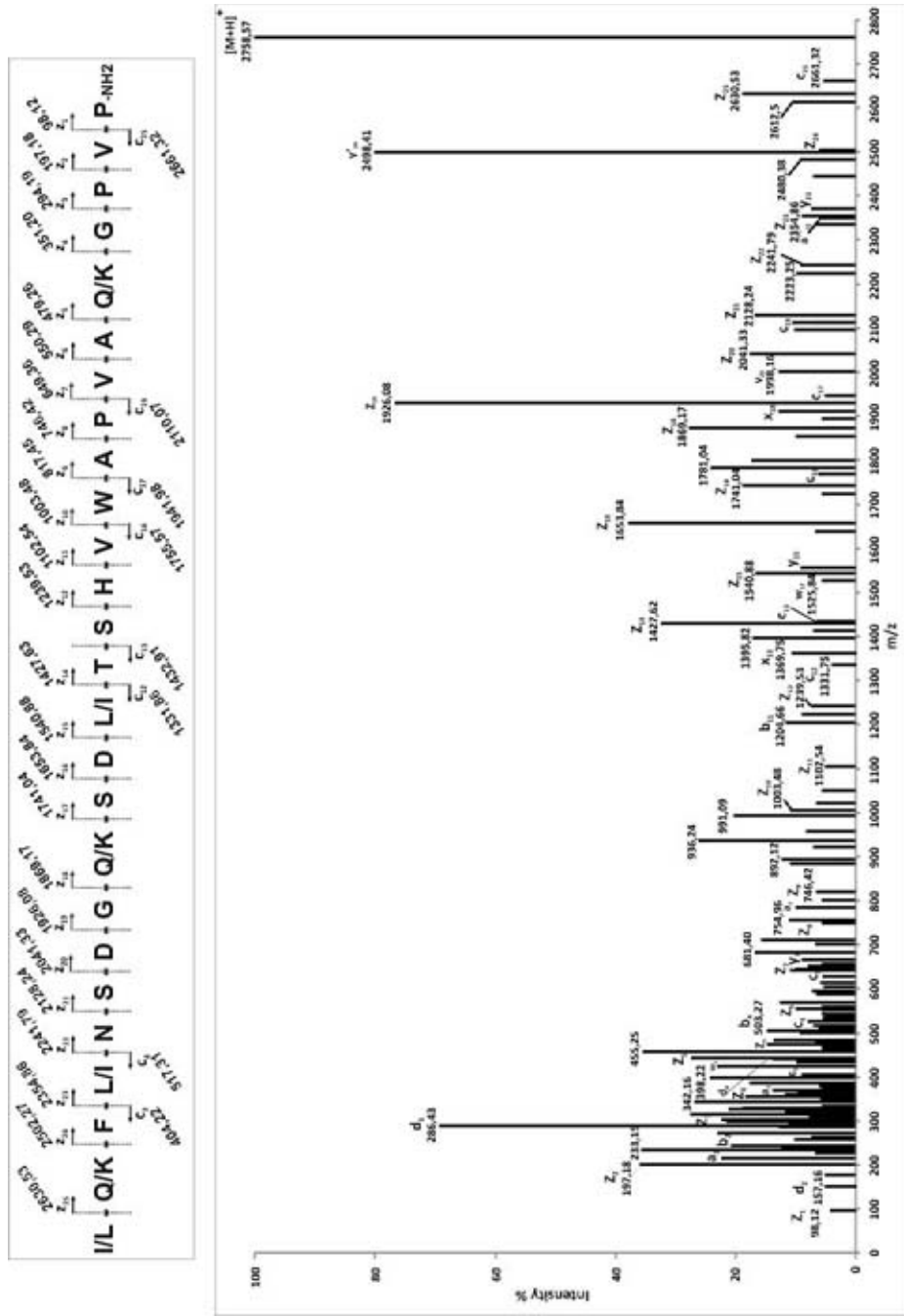
A sequência determinada para o peptídeo presente na fração 18 foi obtida levando-se em consideração as séries pouco comuns de íons  $-c$ ,  $-z$ , complementadas por alguns íons  $-w$  e  $-d$ : **I/L - Q/K - F - I/L - N - S - D - G - Q/K - S - D - I/L - T - S - H - V - W - A - P - V - A - Q/K - G - P - V - P**. A massa molecular do peptídeo com a sequência mostrada acima, é compatível com o resíduo C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência deste peptídeo é: **I/L - Q/K - F - I/L - N - S - D - G - Q/K - S - D - I/L - T - S - H - V - W - A - P - V - A - Q/K - G - P - V - P - NH<sub>2</sub>**.

A distinção entre os resíduos de I e L pode ser realizada através da observação dos fragmentos iônicos do tipo  $-d$  e  $-w$ . A presença do íon de  $m/z$  432,26 ( $-d_4$ ) permitiu definir a ambiguidade Leucina/Isoleucina desta posição sendo o que o resíduo de aminoácido presente é uma Leucina, já a presença do íon de  $m/z$  1525,84 ( $-w_{16}$ ) permitiu a distinção entre leucina e isoleucina desta posição sendo um resíduo de isoleucina. Apesar disso, dúvidas relacionadas à distinção entre I e L na posição N-terminal permanece, portanto a ambiguidade na posição 1 entre os aminoácidos isóbaros permaneceu sem resolução. Portanto a sequência de aminoácidos com relação a distinção dos resíduos de I/L é: **I/L - Q/K - F - L - N - S - D - G - Q/K - S - D - I - T - S - H - V - W - A - P - V - A - Q/K - G - P - V - P - NH<sub>2</sub>**.

Para a distinção entre os resíduos de glutamina e lisina foi utilizada reação de derivatização com anidrido acético, seguida por análise de espectrometria de massas ESI-MS (dados não mostrados). A reação do peptídeo com anidrido acético resultou na modificação da massa molecular para 2729,67 Da, indicando um aumento de 168 Da na massa molecular do peptídeo (42 Da x 4), devido à ocorrência de quatro reações de acetilação, i.e., no grupamento  $\alpha$ -amino do resíduo N-terminal e grupamento  $\epsilon$ -amino dos resíduos de Lys. Esse resultado indica a presença de três resíduos de Lys ao invés de três Gln na sequência desse peptídeo, uma vez que a cadeia lateral do resíduo de Gln

não sofre reação de acetilação. Portanto, a sequência do peptídeo presente na fração 18 em relação aos resíduos isóbaros K/Q é: **I/L - K - F - L - N - S - D - G - K - S - D - I - T - S - H - V - W - A - P - V - A - K - G - P - V - P - NH<sub>2</sub>**.

A síntese desse peptídeo foi realizada através do método manual em fase sólida – estratégia Fmoc e posteriormente submetido a diferentes bioensaios.



**Figura 20.** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvoluído na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência do peptídeo presente na fração 18. Foram selecionados os íons precursores de m/z 920,51 na forma [M+3H]<sup>3+</sup>, m/z 690,39 na forma [M+4H]<sup>4+</sup> e m/z 551,33 na forma [M+5H]<sup>5+</sup>.

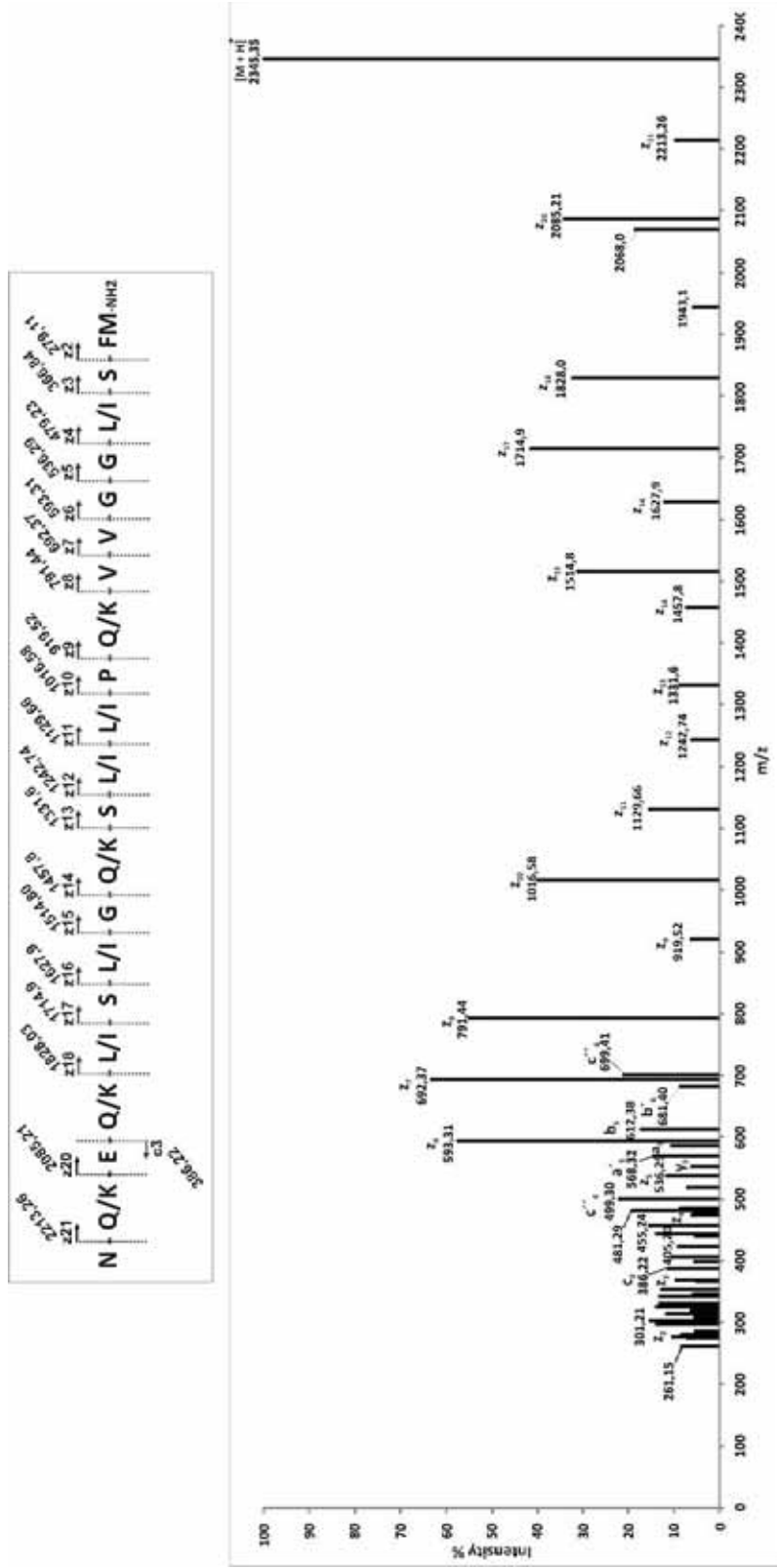
### 8.3.5 Fração 20

O espectro ESI-MS da fração 20 revelou um componente peptídico caracterizado pela presença do íon molecular de  $m/z$  782,45 na forma  $[M+3H]^{+3}$  (dados não mostrados), correspondente a um componente de massa molecular igual a 2344,35 Da. Para o sequenciamento o íon molecular mencionado acima foi selecionado para ser fragmentado em condições de CID (Figura 21).

A sequência determinada para o peptídeo presente na fração 20 foi obtida levando-se em consideração as séries de íons pouco comuns  $-c$  e  $-z$ : **N - Q/K - E - Q/K - L/I - S - L/I - L/I - P - Q/K - V - V - G - G - L/I - S - G - F-M**. A massa molecular do peptídeo com a sequência mostrada acima, é compatível com a porção C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência deste peptídeo é: **N - Q/K - E - Q/K - L/I - S - L/I - L/I - P - Q/K - V - V - G - G - L/I - S - G - F-M - NH<sub>2</sub>**.

O espectro MS2 mostrado na Figura 23 não permitiu a detecção de íons do tipo  $d$ -e/ou  $w$ , e por isso também não foi possível distinguir os resíduos isobaros Ile / Leu. A quantidade recuperada no fracionamento do veneno não foi suficiente para realização da reação de acetilação.

#



**Figura 21.** Espectro de massas MS<sup>2</sup> em condições de CID no modo positivo, já desconvolvido na forma [M + H]<sup>+</sup>, com a respectiva interpretação de sequência para o peptídeo presente na fração 20 ; foi selecionado o íon precursor de m/z 782,45 na forma [M+3H]<sup>3+</sup>.

As sequências adquiridas foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados BLAST (NCBI- [blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)), ArachnoServer (HERZIG et al., 2011 - <http://www.arachnoserver.org/>) e ATDB (<http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin>) a fim de se verificar se já foram anteriormente descritas. Além disso, uma revisão minuciosa da literatura foi realizada para verificar se essas sequências já haviam sido descritas em outros venenos animais. Entretanto, apenas o peptídeo presente na Fração 10 (Figura 17) apresentou similaridade com um peptídeo depositado no bando de dados ArachnoServer (HERZIG et al., 2011) e que possui função inseticida. O alinhamento da sequência primária do peptídeo da Fração 10 com o inseticida U3-plectoxin-Pt1a isolado da aranha *Plectreurys tristis* (ALTSCHUL et al., 1997) pode ser visualizado na Figura 22.

```

Sequences producing significant alignments:
                                     Score   E
                                     (bits) Value
as:U3-plectoxin-Pt1a|sp:P36990... Insecticidal toxin (Plt-X) fr...    17    4.8

>as:U3-plectoxin-Pt1a|sp:P36990... Insecticidal toxin (Plt-X)
    from the spider Plectreurys tristis
    Length = 49

Score = 16.9 bits (32), Expect = 4.8
Identities = 4/6 (66%), Positives = 5/6 (83%)

Query: 1  MCNANG 6
      +C AWG
Sbjct: 31 LCGAWG 36

```

**Figura 22.** Alinhamento entre o peptídeo da Fração 10 e o inseticida U3-plectoxin-Pt1a isolado da aranha *Plectreurys tristis*.

Notou-se ao longo deste trabalho que a ausência de um banco de sequências específicas para toxinas de escorpiões dificulta a identificação em potencial da função dos pequenos peptídeos lineares. Os bancos até hoje criados, como o SCORPIONS ([sdmc.krdl.org.sg:8080/scorpion](http://sdmc.krdl.org.sg:8080/scorpion)), específicos para toxinas descritas a partir de venenos de escorpião foram desativados por falta de recursos/dificuldades de manutenção. Além disso, o banco de dados criado para toxinas animais (ATDB - <http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin>) não está operando adequadamente, uma vez que qualquer sequência que seja inserida na ferramenta de busca (no formato recomendado pelo gerenciador do banco) não retorna resultados.

### 8.4 Síntese de peptídeos

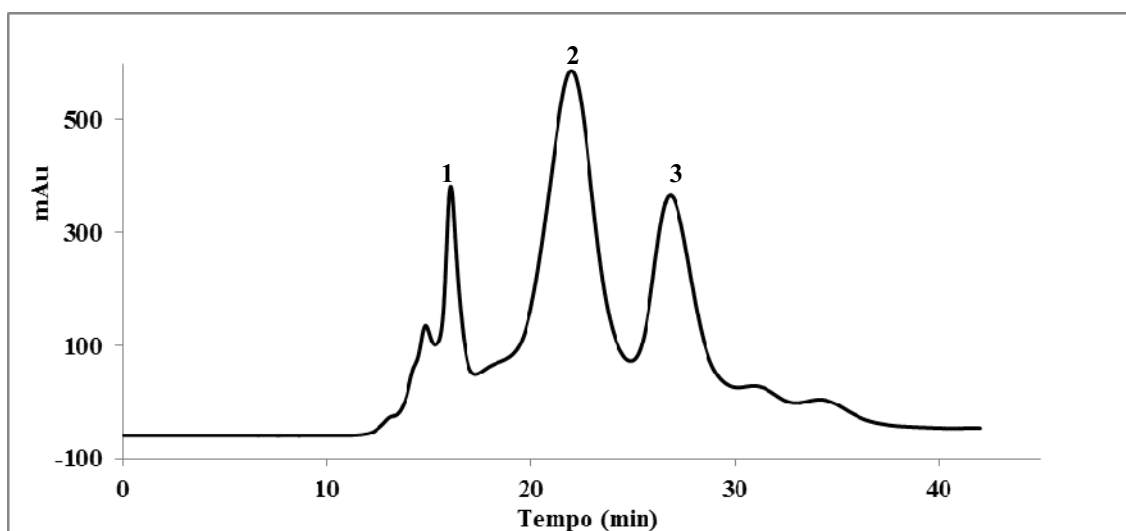
Os peptídeos correspondentes às frações 14 e 18 foram sintetizados em fase sólida por estratégia Fmoc e suas sequências podem ser visualizadas na Tabela 4. Os peptídeos foram sintetizados para serem testados para as atividades biológicas: hemolítica, atividade desgranuladora de mastócitos, LDH, MIC, efeito inseticida e atividades farmacológicas de dor/inflamação.

**Tabela 4.** Sequência primária dos peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Sequência Peptídica	C-terminal
Fração 14	I/L K F L N S D G K S D I T S H V W A P V A K G P V P	NH <sub>2</sub>
Fração 18	R I/L D F S W K H I/L D P E P K V G S K F A Y Y	NH <sub>2</sub>

### 8.5 Purificação dos peptídeos sintéticos

A purificação dos peptídeos sintéticos foi realizada por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC, *Reversed-phase High Performance Liquid chromatography*) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-8A (HPLC). O cromatograma da Fração 14 (Figura 23) revelou a presença de três picos: os pico 1 e 2 correspondem ao peptídeo presente na Fração 14 (massa molecular 2683,42 Da) e o pico 3 corresponde a um subproduto da síntese.



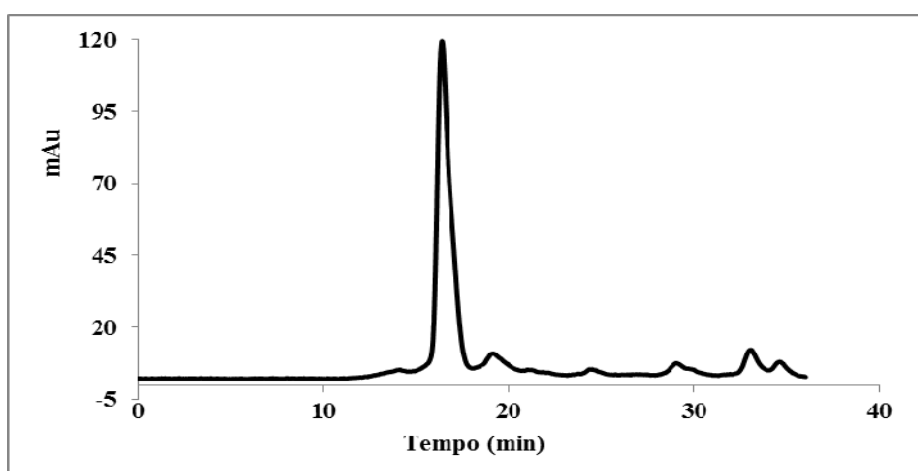
**Figura 23** - Perfil de cromatografia de fase reversa de amostra sintética do peptídeo presente na fração 14 em coluna SHIMPACK PREP-ODS(K) 30x200 mm (Shimadzu), em fluxo de 10 mL/min, de forma isocrática em MeCN 25 (v/v), com eluição monitorada em 214 nm.

Os picos 1 e 2 do cromatograma apresentaram a mesma massa molecular (2722,42 Da). Aparentemente, este fato deve estar relacionado à presença de resíduos de prolina na sequência do peptídeo. Dos 20 resíduos de aminoácidos, a prolina é o único que contém uma amina secundária, ou seja, sua cadeia lateral forma um anel de cinco membros com o carbono-R do esqueleto peptídico. Enquanto a maioria das ligações peptídicas existe na geometria *trans*, aquelas que envolvem prolina (Xaa-Pro) ocorrem em *cis* ou *trans*. Isto ocorre, pois a rigidez da ligação peptídica faz com que o resíduo de aminoácido adquira as formas *cis*- e *trans*- em solução, com abundância de 94% e 6%, respectivamente (COUNTERMAN e CLEMMER, 2002). O resultado destas diferentes conformações reflete-se nas diferenças estruturais que são induzidas nos peptídeos, alterando suas respectivas superfícies de contato com as resinas cromatográficas, e consequentemente alterando os tempos de retenção nos processos cromatográficos, para cada conformação de um mesmo peptídeo.

Portanto, a ocorrência de múltiplos picos para um mesmo peptídeo, geralmente é consequência da formação de múltiplos confôrmeros, que apresentam individualmente diferentes afinidades pelo grupo funcional cromatográfico (octadecil), em função de que cada confôrmero possui uma superfície de contato diferente com o grupo funcional cromatográfico (COUNTERMAN e CLEMMER, 2002).

Para os bioensaios foi utilizado apenas o pico 2, que apresentou maior grau de pureza e maior abundância.

O cromatograma da Fração 18 (Figura 24) revelou a presença de um único pico (massa molecular 2757,27 Da), estando o peptídeo sintético puro.



**Figura 25** - Perfil de cromatografia de fase reversa de amostra sintética do peptídeo presente na fração 18, em coluna SHIMPACK PREP-ODS(K) 30x200 mm (Shimadzu) em fluxo de 10 mL/min, sob gradiente de MeCN entre 30-70% (v/v), com eluição monitorada em 214 nm.

## PARTE II: RESULTADOS DAS ANÁLISES FUNCIONAIS DOS PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS

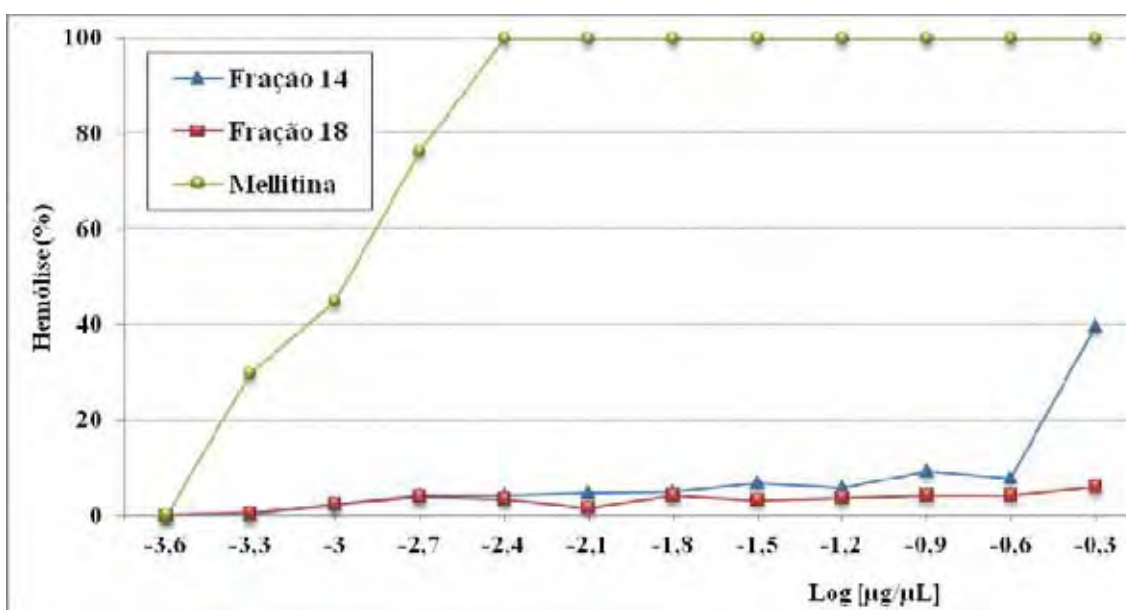
### 8.6 Análises Funcionais

#### 8.6.1 Atividade Hemolítica

A hemólise é definida como a degradação química das hemácias, porém, alguns processos como a interação antígeno-anticorpo, toxinas e venenos podem causar uma degradação química prematura. Sendo assim, a quantidade de hemácias disponíveis para o transporte de oxigênio fica abaixo do normal.

Para os ensaios de atividade hemolítica foram testadas as concentrações de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a 0,0001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (concentrações já bem estabelecidas pela literatura). Como controle foi utilizado a Melitina (peptídeo isolado do veneno do gênero *Apis*, utilizado como controle de lise celular).

Sabe-se que a atividade hemolítica é dependente de perturbações na membrana dos eritrócitos causada pelos peptídeos. Porém, neste caso, os resultados demonstram que estas perturbações não ocorrem em presença dos peptídeos testados. Podemos constatar que a melitina, um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana, utilizado como padrão, apresentou 100% de atividade hemolítica na concentração de 0,003  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade hemolítica significativa (Figura 26).



**Figura 26.** Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos presentes nas frações 14 e 18, incubados à 37°C.

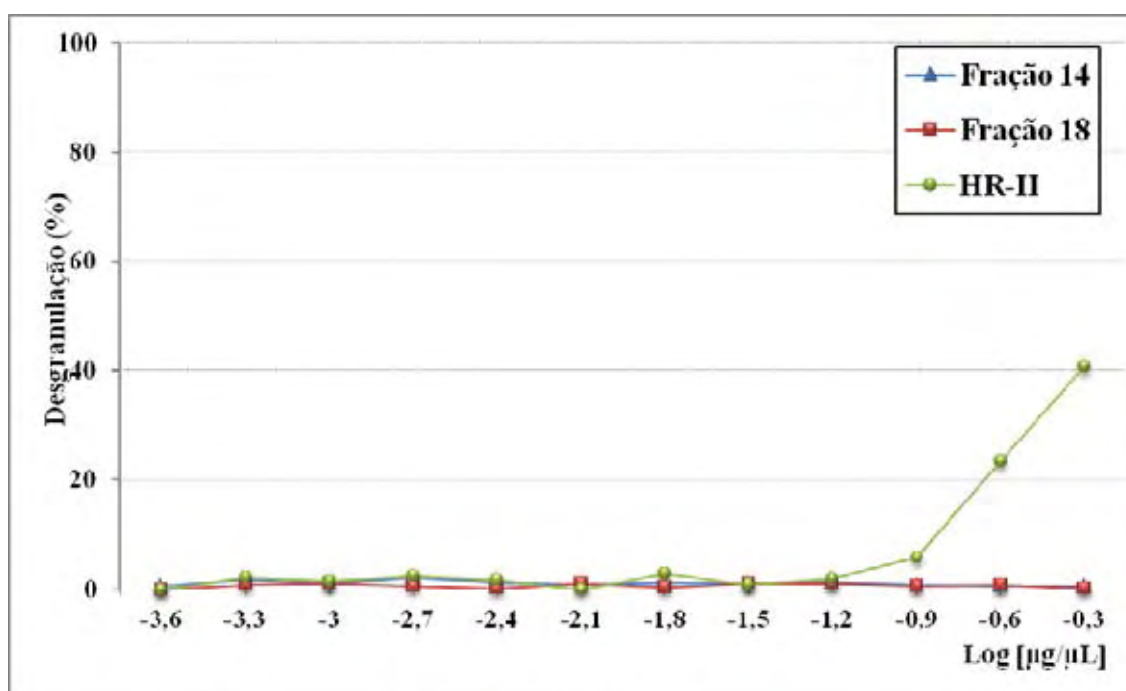
### 8.6.2 Atividade Desgranuladora de mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de Ratos Wistar Machos

Os mastócitos são células encontradas em todos os tecidos de sustentação, prevalecendo principalmente no revestimento gastrointestinal, no revestimento seroso da cavidade peritoneal e em torno dos vasos sanguíneos (YOUNG; HEATH, 2000).

Para os ensaios de atividade desgranuladora de mastócitos foram testadas as concentrações de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a 0,0001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (concentrações já bem estabelecidas pela literatura). Como controle foi utilizado o peptídeo HR-II (TUICHIBAEV, 1988) isolado do veneno do gênero *Apis*, utilizado como controle de desgranulação de mastócitos.

Os mastócitos são células preenchidas com vários grânulos que contêm histamina e outros potentes agentes biologicamente ativos. Quando expostos a substâncias estranhas, liberam os grânulos citoplasmáticos ocasionando a desgranulação (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005).

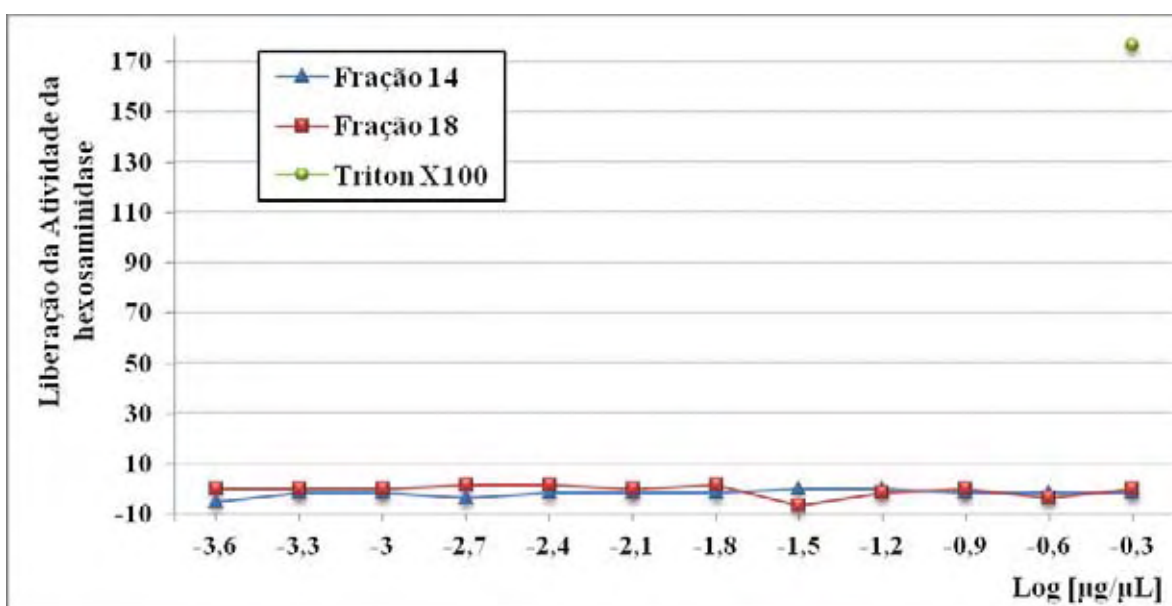
Os peptídeos testados nas diversas concentrações citadas anteriormente não demonstraram atividade, não podendo ser considerados desgranuladores de mastócitos (Figura 27). Já na presença do peptídeo padrão, HR-II, podemos constatar a ocorrência desgranulação com  $\text{ED}_{50} = -1,2 \log [\mu\text{g}/\mu\text{L}]$ .



**Figura 27.** Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelo peptídeo da Fração 14 e pelo peptídeo Fração 18.

### 8.6.3 Liberação da atividade de Lactato desidrogenase (LDH)

A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos coletada da cavidade peritoneal de ratos Wistar, assim como descrito para os ensaios desgranulação. O peptídeo melitina também foi utilizado como padrão neste ensaio. O resultado obtido pode ser visualizado na Figura 28.



**Figura 28.** Atividade da medida da enzima lactato desidrogenase dos peptídeos presentes nas frações 14 e 18.

A medida da liberação da atividade da enzima lactato desidrogenase serve para avaliar se os peptídeos ensaiados atuam rompendo a membrana plasmática dos mastócitos, liberando a LDH para o meio extracelular, servindo de indicador de lise dos mastócitos pelo peptídeo. Os resultados obtidos indicam que os peptídeos presentes nas frações 14 e 18 não apresentam qualquer atividade lítica.

### 8.6.4 Atividade Anti-Microbiana

Nos últimos 20 anos, os peptídeos antimicrobianos que são extremamente disseminadas na natureza e exibem um papel importante na imunidade inata, foram isolados a partir de espécies de insetos e organismos superiores, tais como sapos e seres humanos (TRISHA, 2001). Eles representam uma fonte promissora de potenciais novos antibióticos, porque interagem diretamente com as bicamadas lipídicas, resultando na

formação de poros ou de alteração da permeabilidade da membrana da célula e, eventualmente, causando morte celular (SITARAM e NAGARAI, 1999). A estrutura e a atividade biológica de alguns destes peptídeos têm sido investigados extensivamente. Contudo, o mecanismo molecular da morte celular causada por peptídeos antimicrobianos não é ainda claro.

Escorpiões, aranhas e himenópteros desenvolveram durante a sua evolução, peptídeos antimicrobianos e peptídeos citolíticos em seu veneno, juntamente com uma mistura complexa de enzimas, neurotoxinas e compostos de baixa massa molecular (KUHN-NENTWIG, 2003). Apesar de suas composições diferentes, os venenos dos escorpiões têm dois principais propósitos: em primeiro lugar, eles são utilizados para obter artrópodes como fontes de alimento. Segundo, eles servem como uma arma de defesa contra predadores invertebrados e vertebrados. Especificamente no caso dos escorpiões, propõe-se que os peptídeos antimicrobianos têm como função natural prevenir o escorpião de infecções bacterianas (SIMARD, 1990).

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica realizado para os dois peptídeos sintéticos, em comparação com um antibiótico padrão (cloranfenicol) e com peptídeos antibióticos de outras espécies de escorpiões, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Tabela 5.** Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para os dois peptídeos estudados no presente trabalho, peptídeos de referência (IsCT, BmKb1 e BmKn2) e para o padrão do experimento (Cloranfenicol), frente à bactérias Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>.

MIC [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Gram -		Gram +	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella tiphymurium</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staplylococcus aureus</i>
<b>Fração 14</b>	>500	>500	500	500
<b>Fração 18</b>	>500	>500	62,5	41,6
<b>IsCT<sup>1</sup></b>	-	-	-	3,4
<b>BmKb1<sup>2</sup></b>	18,1	-	-	16,0
<b>BmKn2<sup>2</sup></b>	1,5	-	-	0,6
<b>Cloranfenicol</b>	7,8	3,9	3,9	0,97

<sup>1</sup> peptídeo descrito por DAÍ et al., 2002; <sup>2</sup> peptídeo descrito por ZENG et al., 2004.

Como pode ser observado na Tabela 5 o peptídeo da Fração 14 não inibiu o crescimento bacteriano (tanto para bactérias Gram +, quanto bactérias Gram -), ou seja, não apresenta atividade antibiótica considerável.

Já o peptídeo presente na Fração 18 apresentou inibição do crescimento bacteriano significativo para as bactérias Gram+. Ao se comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura, o peptídeo presente na Fração 18:

- possui valor de MIC maior que o descrito para o peptídeo IsCT (Tabela 5) isolado do veneno do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis* (DAI et al., 2002);
- possui valor de MIC maior do que o descrito para os peptídeos BmKb1 e BmKn2 isolados de *Buthus martensii* e testados contra a bactéria Gram+ *S. aureus* (ZENG et al., 2004);
- possui valor de MIC menor do que o descrito para o peptídeo BmKb1 testado contra a bactéria Gram+ *Micrococcus luteus* por Zeng e colaboradores (2004) (BmKb1: MIC de 81,5 µg/mL);
- possui valor de MIC menor do que o descrito para o peptídeo BmKn2 testado contra a bactéria Gram+ *Bacillus subtilis* por Zeng e colaboradores (2004) (BmKn2: MIC de 48,8 µg/mL).

#### 8.6.5 Efeito de Inseto-toxicidade

Estima-se uma perda de cerca de 20% das áreas agrícolas em função da ação de pragas, geralmente artrópodes, sendo este um fator limitante da produção de alimentos em todo o mundo (OERKE e DEHNE, 2004). A abordagem tradicional de controle de pragas nestes sistemas agrícolas fundamenta-se basicamente na utilização de pesticidas químicos. Porém, nos últimos anos tem sido observado um aumento na resistência por parte dos insetos em função do uso contínuo e excessivo deste tipo de composto.

Como alternativa, técnicas de controle de pragas com menores impactos ambientais têm sido buscados. Estas técnicas incluem os métodos mecânicos (barreiras, armadilhas) e métodos biológicos (reprodução de predadores naturais das pragas, uso de inseticidas biológicos ou a interrupção do processo reprodutivo da praga através da inserção de indivíduos estéreis) (HANSEN et al., 2006; NAGAI e YANO, 2000; GURR e KVEDARAS, 2010).

Dentre os métodos biológicos, a busca por novos inseticidas de origem biológica parece ser uma solução viável em termos de custo-benefício e favorável ao meio ambiente, já que isto pode ser conseguido através da utilização de agentes naturais anti-insetos, tais como os desenvolvidos por escorpiões e aranhas durante milhões de anos de evolução.

A bioprospecção de moléculas biológicas que apresentem efeito inseticida tem permitido que diferentes moléculas fossem descobertas e aplicadas na área agrícola. Por exemplo, os peptídeos com atividade inseticida da peçonha de aranhas são, em sua maioria, relativamente pequenos (3 a 6 kDa) e ricos em pontes dissulfeto, o que aumenta sua estabilidade *in vivo* e resistência a proteases, possibilitando a redução da degradação de peçonha e na presa após o envenenamento (NICHOLSON, 2007). Além disso, uma busca feita no banco de dados ArachnoServer (HERZIG et al., 2011) permite localizar mais de 100 toxinas peptídicas de aranhas com ação em insetos de diferentes ordens, tais como Lepidoptera e Diptera.

Venenos de aranha e escorpião são fontes ricas de compostos de baixa massa molecular, que são geralmente neurotóxicos. Alguns destes compostos são inseto-específico, outros são específicos para mamífero, ao passo que outros são dirigidos a ambos (LORET et al., 1992). Em particular, a procura de novas neurotoxinas inseto-específicas tornou-se uma área importante de investigação por empresas agroquímicas para serem utilizadas como pontos de partida para o desenvolvimento de bioinseticidas altamente seletivos (GUREVITS et al., 1996; QUISTAD et al., 1992).

Nos ensaios de efeito de toxicidade realizados utilizaram-se abelhas para avaliação do efeito dos peptídeos sintetizados sobre estes insetos. Segundo Manzoli-Palma e colaboradores (2003), as abelhas são insetos muito ativos, e os efeitos causados por injeções de veneno são claramente observadas, pois qualquer comportamento anormal é facilmente perceptível.

Ainda segundo Manzoli-Palma e colaboradores (2003), o grupo de abelhas que sofreram a injeção de veneno bruto de *Tityus serrulatus* apresentou uma fase excitatória com as abelhas, andando rapidamente, até que os sintomas de toxicidade começaram a aparecer com uma diminuição na locomoção. Três horas após a injeção do veneno, as abelhas apresentam queda da porção dorsal e dificuldades para retornar à posição normal. Elas parecem ficar desorientadas e seus membros do metatórax não se dobram. Após esta fase, contrações esporádicas do abdômen são observadas culminando na morte do inseto. De acordo com Bücherl (1953), o valor médio do veneno bruto de *T.*

*serrulatus* é de 15,37 mg, valor este 1052 vezes maior do que a quantidade total de veneno necessária para matar um indivíduo de abelha com um LD50 = 15,58 ng/mg (MANZOLI-PALMA et al., 2003).

Durante o ensaio realizado, observou-se que o padrão de comportamento normal do grupo de insetos considerados como “controle”, caracterizou-se por animais sempre ativos, alimentando-se de uma solução de “candy”, andando em círculos e subindo nas tapas das placas de Petri. Este mesmo comportamento foi observado para os indivíduos do grupo em que foi injetado o presente na fração 14.

Já os indivíduos do grupo experimental em que foi injetado o peptídeo da fração 18 não se alimentou na primeira hora após a injeção e manteve-se paralisado por cerca de 3 horas de experimento (nos indivíduos em que foram injetadas concentrações de 400 ng/mg e 500 ng/mg). Lentamente o grupo retomou os movimentos e passou a se alimentar novamente; portanto, o peptídeo presente na fração 18 causou apenas uma paralisia transitória nas abelhas, o que parece ser uma característica de toxinas de animais peçonhentos, solitários e caçadores.

Nenhum dos peptídeos testados causou a morte dos indivíduos nas diversas concentrações testadas. Podemos, portanto, concluir que os peptídeos não apresentam efeito inseticida.

#### **8.6.6 Efeito dos peptídeos presentes nas frações 14 e 18 sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico**

Os camundongos foram injetados, por via intraplantar (i.pl.), com os peptídeos presentes nas frações 14 e 18 (1, 5 e 10 µg/50 µL) e avaliados no teste de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico). Os animais controles foram administrados com o mesmo volume de salina (S) nas mesmas condições experimentais. A carragenina (Cg, i.pl., 300 µg/50 µL) foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que houve significativo aumento na intensidade de hipernocicepção comparável à carragenina (controle positivo) nas doses de 1 e 10 µg/50 µL na primeira hora da administração do peptídeo presente na Fração 18 (Figura 29A). Este aumento caracteriza o fenômeno de hipernocicepção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que a dose de 1 µg/50 µL da Fração 18 também apresentou aumento na intensidade de hipernocicepção comparável à carragenina (300 µg/50 µL) também após 240 minutos do período experimental.

O efeito edematogênico foi avaliado utilizando-se paquímetro digital para medir o diâmetro dos edemas formados. A carragenina acarretou aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados, com salina durante todo o período de observação. O efeito edematogênico do peptídeo presente na Fração 18 foi maior na dose de 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$  observado até 60 minutos após o período de experimentação (Figura 29B).

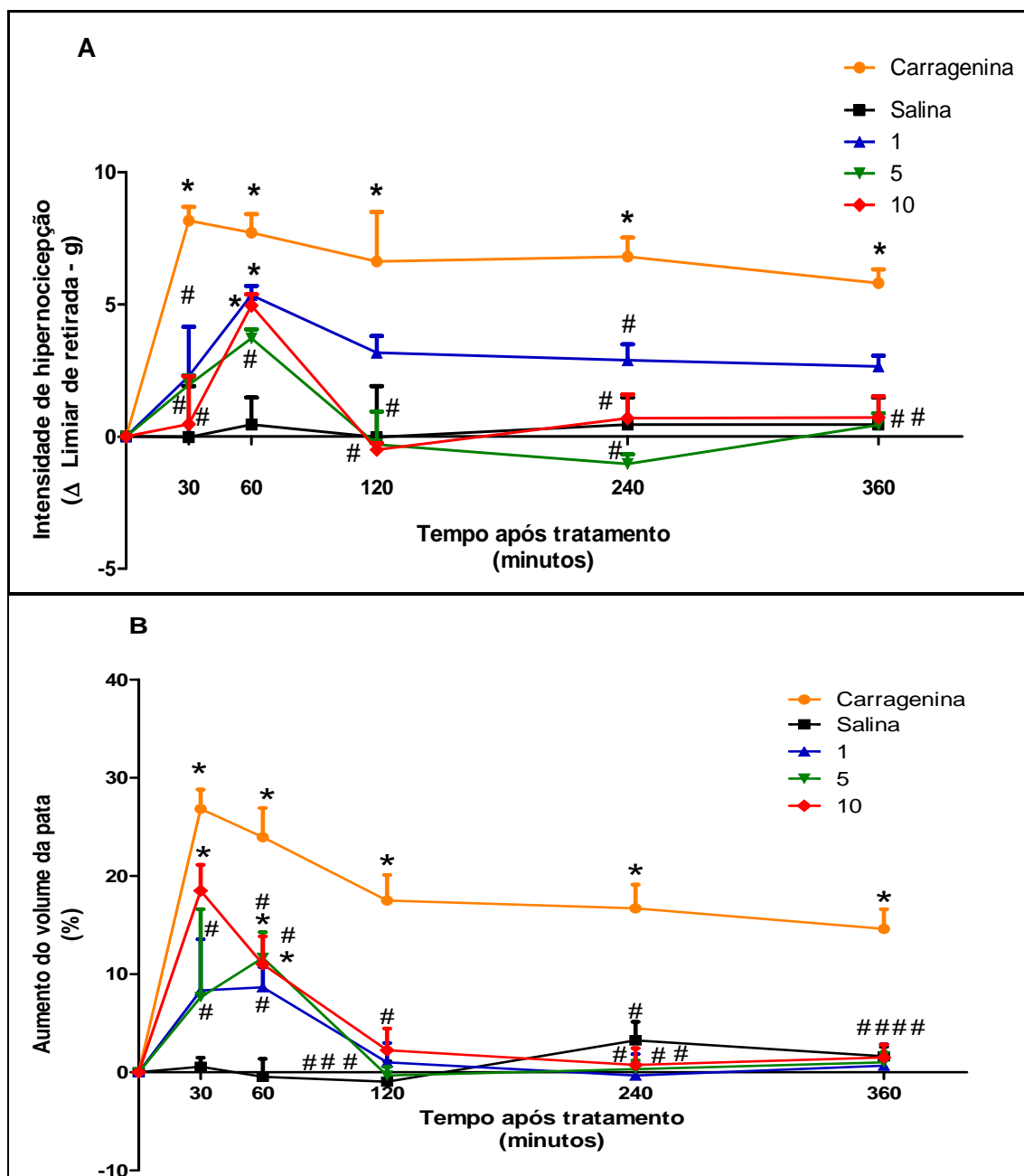
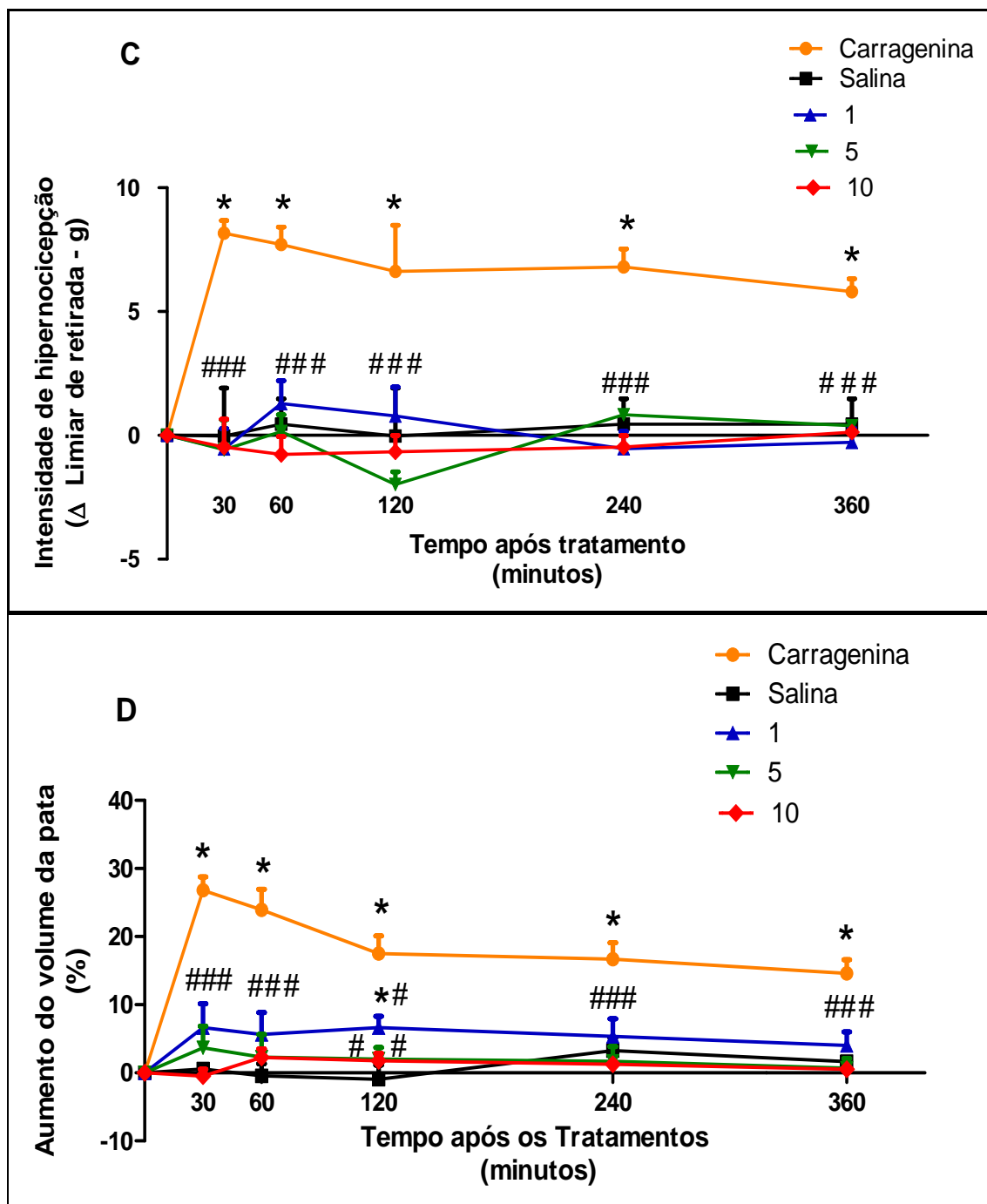


Figura 29 - Efeito do peptídeo presente na fração 18 sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta ( $\Delta$ ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração do Peptídeo 4 (1, 5 e 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.) ou carragenina (Cg, 300  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução

salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média  $\pm$ SEM de 5 animais por grupo. \*  $p < 0,001$  em relação ao grupo Salina; #  $p < 0,001$  em relação ao grupo Carragenina.

Por outro lado, o peptídeo presente na Fração 14 não foi capaz de induzir nocicepção por todo o período testado e em todas as doses testadas (1, 5 e 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ) (Figura 29C). Ainda, não foi observado nocicepção após 1440 minutos do período experimental para todas as doses testadas (dados não mostrados). Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado. O peptídeo presente na Fração 14 não foi capaz de induzir efeito edematogênico por todo o período testado e em todas as doses testadas (1, 5 e 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ) (Figura 29D). Ainda não foi observado nocicepção após 1440 minutos do período experimental para todas as doses testadas (dados não mostrados). A salina nestas mesmas condições experimentais, não interferiu com o volume da pata dos animais durante todo o período de observação (Figura 29D).



**Figura 29** - Efeito do peptídeo presente na Fração 14 sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta ( $\Delta$ ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (C). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (D). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração do Peptídeo 3 (1, 5 e 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.) ou carragenina (Cg, 300  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média  $\pm$ SEM de 5 animais por grupo. \*  $p < 0,001$  em relação ao grupo Salina; #  $p < 0,001$  em relação ao grupo Carragenina.

A dor é considerada um problema de saúde pública, uma vez que interfere com a qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, dados da Organização Mundial de Saúde relatam que cerca de 40% dos pacientes que sofrem de dor não dispõem de tratamento

adequado (HANKS et al., 2001). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial e/ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tais lesões. A dor, portanto, é um processo cognitivo e dependente da memória, aspectos culturais e psíquicos.

Os nociceptores (receptores para a dor) são terminações nervosas livres desprovidas de estruturas receptoras específicas sendo, portanto, uma continuação da própria fibra nervosa. Os neurônios aferentes primários detectam o estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução), conduzem o impulso da periferia para a medula espinhal e transferem esses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão sináptica) (CAVIEDES et al., 2002). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

As toxinas animais sempre foram alvo dos pesquisadores, ora como ferramentas de investigação científica, ora como substâncias com aplicação terapêutica. Neste sentido, foi objetivo de nosso projeto de pesquisa avaliar o possível efeito hipernociceptivo e inflamatório dos peptídeos presentes nas Frações 14 e 18 isolados do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. É importante ressaltar que este é um projeto pioneiro no que concerne a avaliação da nocicepção e efeito edematogênico de peptídeos presentes no veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*, uma vez que os poucos dados apresentados na literatura referem-se ao efeito do veneno total da espécie relatada (NASCIMENTO et al., 2005).

De acordo com o Ministério da Saúde cerca de 8000 casos de envenenamento por escorpiões são relatados anualmente no Brasil (BRASIL, 2001). O escorpião mais frequentemente associado aos casos de envenenamento é o *Tityus serrulatus* (família Butidae) (LUCAS e SILVA-JÚNIOR, 1992). Os pacientes relatam intensa dor no local da picada que pode se irradiar para diversos locais distantes do local da picada, taquicardia, hipertensão arterial, parestesia, êmese e excesso de salivação (HOREN, 1972; RIMSZA et al., 1980; MÜLLER, 1983).

Os resultados apresentados mostraram que houve significativo aumento na intensidade de hipernocicepção comparável à carragenina (controle positivo) nas doses de 1 e 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$  na primeira hora da administração do Peptídeo 4. Esta hipernocicepção não foi dose-dependente. Por outro lado, o Peptídeo 3 não apresentou

efeito hipernociceptivo. O efeito edematogênico do Peptídeo 4 foi maior na dose de 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$  observado até 60 minutos após o período de experimentação. Por outro lado, o Peptídeo 3 não foi capaz de induzir efeito edematogênico por todo o período testado e em todas as doses testadas (1, 5 e 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ).

Pacientes acidentados pelo escorpião *Tityus serrulatus* relatam dor intensa imediata (HOREN, 1972; RIMSZA et al., 1980; MÜLLER, 1983). Nossos dados mostraram que o Peptídeo 4 causou dor apenas a partir da 1ª hora de administração. Por outro lado, este peptídeo induziu efeito edematogênico nos primeiros trinta minutos após sua administração. Estes dados, analisados em conjunto, demonstram que o Peptídeo 4 presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* participa do fenômeno edematogênico e nociceptivo apresentado pelos pacientes, mas não parece ser o mais algogênico, uma vez que seus efeitos não foram imediatos. Outros peptídeos estão sendo caracterizados pelo nosso grupo e deverão ser testados, o que elucidará, com maior propriedade qual ou quais são as principais substâncias que contribuem, com maior intensidade, para os fenômenos observados. Além disso, os mecanismos envolvidos nestes efeitos acima mencionados são alvos de estudos futuros.

Conforme relatado anteriormente, este trabalho é pioneiro na caracterização nociceptiva e edematogênica de peptídeos isolados do veneno bruto de escorpião *Tityus serrulatus*. Os poucos dados encontrados na literatura referem-se ao estudo da dor e processo inflamatório do veneno total. Neste sentido, Nascimento e colaboradores (2005), pioneiros nestes estudos, demonstraram que o veneno bruto de *Tityus serrulatus* induz alodinia e edema quando injetado por via intraplantar. Estes mesmos autores demonstraram que diversos mediadores estão envolvidos nestes fenômenos, tais como os eicosanóides, histamina e 5-hidroxitriptamina.

Ainda, Pessini e colaboradores (2008) demonstraram que o veneno bruto de escorpião injetado por via intraplantar induziu edema (dose-dependente) e hipernocicepção mediada pela liberação de cininas (via receptores B1 e B2) e óxido nítrico. Ainda, os mesmos autores mostraram que o celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, é capaz de reverter o fenômeno edematogênico demonstrado. Por outro lado, a indometacina não foi capaz de reverter estes fenômenos.

Todos os dados, analisados em conjunto, sugerem que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* apresenta substâncias complexas e potentes, capazes de liberar uma série de mediadores importantes para os processos nociceptivos e edematogênicos. É nosso objetivo imediato caracterizar outros peptídeos encontrados no veneno bruto, bem

como, os mecanismos envolvidos nestes efeitos. Estes estudos tornam-se extremamente relevantes, uma vez que, esclarecendo qual ou quais substâncias são responsáveis por estes efeitos, a abordagem farmacológica terapêutica torna-se mais racional objetivando aliviar a intensa dor associada ao escorpionismo.

## 9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Venenos de escorpiões são amplamente estudados por todo o mundo. A estratégia geral adotada consiste da extração do veneno em solução aquosa seguida pelo fracionamento do veneno em cromatografia de exclusão molecular, e cada uma das frações coletadas é submetida à cromatografia líquida de fase reversa. Ao longo das últimas décadas, este procedimento permitiu que os componentes majoritários do veneno de escorpiões fossem estudados, sendo que as toxinas descritas caracterizam-se por serem pequenas proteínas que atuam, principalmente, sobre canais iônicos. Até o presente momento, os peptídeos pequenos e lineares são pouco estudados, e não caracterizados na literatura. Essas moléculas apresentam-se, portanto, negligenciadas.

O estudo desenvolvido apresentou uma nova abordagem para o estudo de venenos escorpiônicos, que consistiu de uma extração direcionada do veneno para compostos peptídicos, sendo este procedimento obtido por meio da extração do veneno bruto em MeCN 50% (v/v), seguido de centrifugação. Em seguida, o veneno foi fracionado por cromatografia líquida de fase reversa, e cada uma das frações foi submetida à análise de espectrometria de massas de alta resolução. Por meio do método de extração adotado e a estratégia cromatográfica utilizada, conseguiu-se chegar à sequência de cinco novos peptídeos não descritos até o momento. O método aplicado representa uma estratégia inovadora, e ao mesmo tempo simplificada de como compreender e elucidar a vasta gama de moléculas bioativas presentes nesses venenos animais, e que permanecem pouco investigadas.

Mesmo com a estratégia utilizada, o veneno de *T. serrulatus* foi de difícil estudo, pois os compostos peptídicos estavam presentes em quantidades extremamente reduzidas, representando cerca de apenas 2% do veneno bruto. Em função desta baixa quantidade, inúmeras corridas cromatográficas tiveram de ser realizadas a fim de se acumular quantidade suficiente de cada uma das frações, para análise por espectrometria de massas.

Diferentemente das estruturas conhecidas para o veneno desses animais, compostos estes conhecidos por atuarem em canais iônicos, os pequenos peptídeos aqui descritos possuem estrutura linear e não formam pontes dissulfeto, pois não possuem resíduos de cisteína em sua sequência primária. Estes peptídeos parecem se encaixar

numa classe de pequenos peptídeos lineares, que não apresenta ponte dissulfeto (NDBPs), descrita recentemente para venenos de escorpiões.

Optou-se pela síntese química de dois destes peptídeos (Fração 14 e Fração 18) para caracterização funcional dos mesmos:

- O peptídeo presente na Fração 14 não apresentou atividade para os inúmeros ensaios biológicos realizados e futuramente será testado para diversas outras atividades biológicas permitindo melhor compreensão de sua função no veneno destes animais;
- O peptídeo presente na Fração 18 apresentou efeito nociceptivo e edematogênico acentuado, sendo comparável aos efeitos da carragenina. Sua via de ação está ainda está sendo estudada, para melhor compreensão da ativação dos efeitos farmacológicos. Ressaltamos que, embora o veneno de escorpiões seja descrito como causador de efeito nociceptivo intenso, estudos realizados até o presente não descreveram efeito nociceptivo para nenhuma toxina isolada destes animais. Sendo assim, o peptídeo presente na Fração 18 é o primeiro peptídeo isolado de *T. serrulatus*, com efeito nociceptivo caracterizado;
- Além disso, o peptídeo da Fração 18 apresentou efeito antibiótico, quando comparado aos dados descritos em literatura para outros peptídeos oriundos de veneno de escorpiões, e parece ter papel fundamental no efeito antibiótico na mistura complexa dos compostos do veneno.

Os outros peptídeos descritos serão sintetizados e terão os mesmo ensaios realizados para compreensão de sua atividade biológica e caracterização estrutural detalhada.

Futuramente, análises do veneno bruto serão realizadas por espectrometria de massas *on-line*, em espectrômetro de massas LC/MS IT-ToF para que com maior acurácia e alta resolução novos peptídeos presentes em baixa quantidade no veneno possam ser identificados e sequenciados.

Outras espécies de escorpião (*Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*) terão seus venenos analisados com a estratégia utilizada para *Tityus serrulatus* a fim de se realizar suposições filogenéticas em termos de arsenal molecular e de sucesso evolutivo deste grupo animal tão bem sucedido evolutivamente.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K. R.; WEISS, C. The occurrence of 5-hydroxytryptamine in scorpion venom. **J. Exp. Biol.**, United Kingdom, v. 35, p. 39-41, 1958.

ADERMANN, K.; JOHN, H.; STA" NDKER, L.; FORSSMANN, W. Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. **Current Opinion in Biotechnology**, United Kingdom, vol.15, p.599–606, 2004.

ALI, A.; STOEVA, S.; SCHUTZ, J.; KAYED, R.; ABASSI, A.; ZAIDI, Z. H.; VOELTER, W. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, United States, (Part A), v. 121, p. 323 – 332, 1998.

AZEVEDO-MARQUES, M.M. Animais Peçonhentos de Importância Médica no Brasil. Diagnóstico e condutas nos acidentes por escorpiões e abelhas. **Revista da Soc. Bras. de Med. Trop.**, Brazil, v. 27, p. 683-688, 1994.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, N.B. Efeito das interações Peptídeo-Peptídeo e Peptídeo-Membrana nas Atividades Funcionais das Toxinas Peptídicas do Veneno da Vespa Social *Agelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera, Vespidae). Rio Claro, 67p. Dissertação em Biologia Celular e Molecular – IB/UNESP-Rio Claro, 2007.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B.; SAIDEMBERG, D. M.; PALMA, M. S. Profiling the peptidome of the venom from the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Journal Of Proteomics**, Netherlands, v. 74, p. 2123 – 2137, 2011.

BARONA J.; BATISTA C. V.; ZAMUDIO F.Z.; GOMEZ-LAGUNAS F.; WANKE E.; OTERO R.; POSSANI L. D. Proteomic analysis of the venom e characterization of toxins specific for NaC – and KC –channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1764: 76, 2006.

BATISTA, C.V.; DEL POZO, L.; ZAMUDIO, F.Z.; CONTRERAS, S.; BECERRIL, B.; WANKE, E.; POSSANI, L.D. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of pralines on mass spectrometry analysis of toxins. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Netherlands, v. 803, p. 55–66, 2004.

BATISTA, C.; D'SUZE, G.; GOMEZ, F.; ZAMUDIO, F.; SEVCIK, C.; POSSANI, L. D. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. **Proteomics**, v. 6, p. 3718–3727, 2006.

BATISTA, C.V.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S.A.; SALAS-CASTILLO, S.P.; ZAMUDIO, F.Z.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L.D. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, United States, Part C, v. 146, p. 147–157, 2007.

- BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F.I.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANDA, E.S.; FLETCHER, P.L.JR.; MARTIN, B.M.; POSSANI, L.D. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem J.**, United Kingdom, v. 313(3), p. 753-760, 1996.
- BORGES, A.; ALFONZO, M.J.; GARCIA, C.C.; WINAND, N.J.; LEIPOLD, E.; HEINEMANN, S.H. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel b-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. **Toxicon**, United Kingdom, v. 43, p. 671–684, 2004.
- BORGES, A.; ROJAS-RUNJAIC, F.J. *Tityus perijanensis* Gonzalez-Sponga (Scorpiones, Buthidae): molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. **Toxicon**. v. 50 (7), p. 1005–1010. 2007.
- BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion a-toxins. **Toxicon**, United Kingdom, v.49, p. 142–158, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília (DF), 2001.
- BRECI, L.A.; TABB, D.L.; YATES, J.R.; WYSOCKI, V.H. Cleavage N-Terminal to Proline: Analysis of a Database of Peptide Tandem Mass Spectra. **Anal. Chem.**, United States, v. 75, p. 1963-1971, 2003.
- BRINGANS, S.; ERIKSEN, S.; KENDRICK, T.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; LIVK, A.; LOCK, R.; LIPSCOMBE, R. Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion). **Proteomics**, Germany, v. 8, p. 1081–1096, 2008.
- BÜCHERL, W. Dosagem comparada da atividade dos extratos glândulares e do veneno puro de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling) 1891. **Mem. Inst. Butantan**, 25, 1-21, 1953.
- BÜCHERL, W. **Escorpionismo no Brasil**. Memórias do Instituto Butantan, v. 34, p. 9 - 24, 1969.
- BUDNIK, B.A.; NIELSEN, M.L.; OLSEN, J.V.; HASELMANN, K.F.; HÖRTH, P. Can relative cleavage frequencies in peptides provide additional sequence information? **J. Mass Spectrom.**, United States, v. 219, p. 283–294, 2002.
- CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. **Rev Neurol**, 35: 1037-48, 2002.
- CALISKAN, F.; GARCÍA, B.I.; CORONAS, F.I.; BATISTA, C.V.; ZAMUDIO, F.Z.; POSSANI, L.D. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. **Toxicon**, United Kingdom, v.48(1): p.12-22, 2006.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, Netherlands, vol. 583, p. 1736–1743, 2009.

- CAMARGOS, T.S.; RESTANO-CASSULINI, R.; POSSANI, L.D.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J.; SCHWARTZ, C.A.; ALVES, E.M.; DE FREITAS, S.M.; SCHWARTZ, E.F. The new kappa-KTx 2 5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Peptides**, United States, v. 32(7): p.1509–17, 2011.
- CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D.; e MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. **Nature**, United Kingdom, v.296, n.5852, p.90-1, 1982.
- CATTERALL, W. A. The molecular basis of neuronal excitability. **Science**, United States, v. 223 (4637): p. 653-61, 1984.
- CATTERALL, W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.**, United States, v.20, p.15-43, 1980.
- CATTERALL, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, United States, v. 26, p. 13–25, 2000.
- CHEN, W.; YANG, X.; YANG, X.; ZHAI, L.; LU, Z.; LIU, J.; YU, H. Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. **Peptides**, New York, v. 29, n. 11, p. 1887-1892, 2008.
- CLYNEN, E.; BAGGERMAN, G.; VEELAERT, D.; CERSTIAENS, A.; VAN DER HORST, D.; HARTHOORN, L.; DERUA, R.; WAELKENS, E.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Eur. J. Biochem.**, Germany, v. 268, n. 7, p. 1929-1939, 2001.
- CLYNEN, E.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. The use of peptidomics in endocrine research. **Gen. Comp. Endocrinol.**, United States, v. 132(1): p. 1-9, 2003.
- COHEN, L.; LIPSTEIN, N.; GORDON, D. Allosteric interactions between scorpion toxin receptor sites on voltage-gated Na channels imply a novel role for weakly active components in arthropod venom. **FASEB J**, United States, v. 20, E1360–E1367, 2006.
- COLOGNA, C.T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, Netherlands, v. 16, p. 920-932, 2009.
- COLOGNA, C. T. Isolamento e caracterização estrutural e funcional da TS15, uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia Ribeirão Preto, 2010.
- COLOGNA, C.T.; PEIGNEUR, S.; ROSA, J.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; VARANDA, W.A.; TYTGAT, J.; ARANTES, E.C. Purification and characterization of

- Ts15 the first member of a new  $\omega$ -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, United Kingdom, 58(1): p.54–61, 2011.
- CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; VILLEGAS, E.; BARNHAM, K. J.; HE, W.; NOROTON, R. S.; NAKAJIMA, T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. **Biochem. J.**, United Kingdom, 359, 35 – 45, 2001.
- COUNTERMAN, A.E.; CLEMMER, D.E. Cis-Trans Signatures of Proline-Containing Tryptic Peptides in the Gas Phase. **Anal. Chem.**, Washington, v. 74, n. 9, p. 1946-1951, 2002.
- COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J.-M.; ROCHAT, H. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. **Toxicon**, United Kingdom, v. 20, p. 9–16, 1982.
- COUTINHO-NETTO, J.; ABDUL-GHANI, A.S.; NORRIS, P.J.; THOMAS, A.J.; BRADFORD, H.F. The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex *in vivo* and *in vitro*. **J. Neurochem.**, United States, v. 35(3), p. 558-565, 1980.
- COYLE, B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. **Biometals**, London, v. 16, n. 2, p. 321-329, 2003.
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de Massa de Proteínas. **Rev. Biotec. Ciência & Desenv.**, v. 36, 2006.
- CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; OLIVEIRA, J.S.M.; HERING, S.E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Rev. do Inst. de Med. Trop. de SP**, v. 36, p. 67-76, 1994.
- CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, Jackson, v. 17, p. 589-592, 1991.
- DAI, L.; YASUDA, A.; NAOKI, H.; CORZO, G.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 286, p. 820 – 825, 2001.
- DAI, L.; CORZO, G.; NAOKI, H.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 293, p. 1514 – 1522, 2002.
- DAVIS, J.; JONES, A.; LEWIS, R. J. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. **Peptides**, United States, v. 30, p. 1222–1227, 2009.

DE LA VEGA, R.C.R.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure function relationships and evolution. **Toxicon**, United Kingdom, v.46, n.8, Dec 15, p.831-44. 2005.

DE LIMA, M.E.; FIGUEIREDO, S.G.; PIMENTA, A.M.; SANTOS, D.M.; BORGES, M.H.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L.C.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, United States, v. 146, p. 264-279, 2007.

DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E. e STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **Am J Physiol**, United States, v.264, n.2 Pt 1, Feb, p.C361-9, 1993.

DIANOUS, S.; HOARAU, F.; ROCHAT, H. Re-examination of the specificity of the scorpion *Androctonus australis* Hector insect toxin towards arthropods. **Toxicon**, United Kingdom, v. 25, p. 411-417, 1987.

DIEGO-GARCIA, E.; BATISTA, C. V.; GARCIA-GOMEZ, B. I.; LUCAS, S.; CANDIDO, D. M.; GOMEZ-LAGUNAS, F. e POSSANI, L. D. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. **Toxicon**, United Kingdom, v.45, n.3, p.273-83. 2005.

DINIZ, C. R. e GONCALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v.41, p. 470-7, 1960.

DOHTSU, K.; OKUMURA, K.; HAGIWARA, K.; PALMA M.S.; NAKAJIMA, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera-Vespidae). **Natural Toxins**, United States, v. 1, p.271-276, 1993.

D'SUZE, G.; SEVCIK, C. Scorpion venom complexity fractal analysis. Its relevance for comparing venoms. **J Theor Biol**. v.267(3), p.405-16, 2010.

ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. **Toxicon**, United Kingdom, v. 43, p. 555-574, 2004.

ESCOUBAS, P.; SOLLID, B.L.; KING, G.F. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. **Toxicon**, United Kingdom, v. 47, p. 650-663, 2006.

FAJLOUN, Z.; FERRAT, G.; CARLIER, E.; FATHALLAH, M.; LECOMTE, C.; SANDOZ, G.; DI LUCCIO, E.; MABROUK, K.; LEGROS, C.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; SABATIER, J. M. e DE WAARD, M. Synthesis, <sup>1</sup>H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins. **J. Biol Chem.**, United States, v.275, n.18, p.13605-12. 2000.

- FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, United States, v. 246, p. 64–71, 1989.
- FERREIRA, L. A. F.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin-potentiating peptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, United Kingdom, v. 31, p. 941 – 947, 1993.
- FONTANA, R.; MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; KONNO, K.; CÉSAR, L. M. M., MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**, New York, v. 25, n. 6, p. 919-928, 2004.
- FROY, O.; ZILBERBERG, N.; GORDON, D.; TURKOV, M.; GILLES, N.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; LORET, E.; OREN, D.A.; SHAANAN, B.; GUREVITZ, M. The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins. **J. Biol. Chem.**, United States, v. 274, p.5769–5776, 1999.
- FRY, B.G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S.F.; VIDAL, N.; POELMANN, R.E.; NORMAN, J.A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Mol. Cell Proteomics.**, United States, v. 7, p. 215–246, 2008.
- FRY, B.G.; VIDAL, N.; VAN DER WEERD, L.; KOCHVA, E.; RENJIFO, C. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **J. Proteomics**, Netherlands, v. 72, p. 127–136, 2009.
- GIMENEZ-GALLEGO, G.; NAVIA, M. A.; REUBEN, J. P.; KATZ, G. M.; KACZOROWSKI, G. J. e GARCIA, M. L. Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 3329–3333, 1988.
- GOLDSTEIN, E. **Berl Ber.** v. 39, p.691, 1886.
- GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the brazillian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Mem Inst Butantan**, Brazil, v.33, n.3, p.899-902. 1966.
- GORDON, D.; ILAN, N.; ZILBERBERG, N.; GILLES, N.; URBACH, D.; COHEN, L.; KARBAT, I.; FROY, O.; GAATHON, A.; KALLEN, R.G.; BENVENISTE, M.; GUREVITZ, M. An ‘Old World’ scorpion b-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels: a possible link towards diversification of b-toxins. **Eur. J. Biochem.**, United Kingdom, v. 270, p. 2663–2670, 2003.
- GOUDET, C.; CHI, C.W.; TYTGAT, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. **Toxicon**, United Kingdom, v. 40, p. 1239–1258, 2002.
- GOYFFON, M.; KOVOOR, J. Chactoid venoms. *Arthropod venoms*, p. 395-418, 1978.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M. e WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, United Kingdom, v.47, n.3, p.348-55, 2006.

GUARNIERI, M. C. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia. **Ação deletéria e benéfica das peçonhas de serpentes, aranhas, escorpiões e insetos**. Recife, p. 16-21, 1998.

GUREVITZ, M.; KARBAT, I.; COHEN, L.; ILAN, N.; KAHN, R.; TURKOV, M.; STANKIEWICZ, M.; STÜHMER, W.; DONG, K.; GORDON, D. The insecticidal potential of scorpion b-toxins. **Toxicon**, United Kingdom, v. 49, p. 473–489, 2007.

GUREVITZ, M.; ZILBERBERG, N.; FROY, O.; URBACH, D.; ZLOTKIN, E.; HAMMOCK, B.D.; HERMANN, H.; MOSKOWITZ, H.; CHEJANOVSKY, N. **Utilization of scorpion insecticidal neurotoxins and baculoviruses for the design of novel selective biopesticides**. In: ROSED D. Ed. Modern agriculture and the environment. Lancaster: Kluwer, p. 81-96, 1996.

GURR, G.M.; HORNE, P.; PAGE, J.; ASH, G.J.; PILKINGTON, L.J. Australia and New Zealand biocontrol conference: Emerging themes, future prospects. **Biological Control**, v.52, Issue 3, p. 195-197, 2010.

GWEE, M. C. E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Autonomic effects of some scorpions venoms and toxins. **Clin Exp. Pharmacol. Physiol.** v.29, p. 795-801, 2002.

HANKS, G.W.; CONNO, F.; CHERNY, N.; HANNA, M.; KALSO, E.; MCQUAY, H. J.; MERCADANTE, S.; MEYNADIER, J.; POULAIN, P.; RIPAMONTI, C.; RADBRUCH, L.; CASAS, J.R.; SAWE, J.; TWYCCROSS, R.G.; VENTAFRIDDA, V. Expert Working Group of the Research Network of the European Association for Palliative Care. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. **Br J Cancer**. V. 84(5), p.587-93, 2001.

HERING, E.S.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P. TITYUS (ESCORPIÃO AMARELO) IN: NICOLELLA, A.; BARROS, E.; TORRES, J.B.; MARQUES, M.G. (eds) **Acidentes com animais peçonhentos**. Capítulo VII, p. 141-148, 1997.

HERZIG, V.; WOOD, D.L.A.; NEWELL, F.; CHAUMEIL, P.; KAAS, Q.; BINFORD, G. J.; NICHOLSON, G. M.; GORSE, D.; KING, G. F. "ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures". **Nucleic Acids Res.**, England, v. 39 p.653-7, 2011.

HIDE, I.; BENNET, J. P.; PIZZEY, A.; BOONEN, G.; SAGI, D. B.; GOMPERTS, B. D.; TATHAM, P. E. R. Degranulation of individual mast cell in response to Ca<sup>2+</sup> and guanine nucleotides: an all-or-none event. **J. Cell Biol.**, New York, v. 123, n. 3, p. 585-593, 1993.

HILLE, B. **Mechanism of block In: Ion Channels of excitable membranes**, Sunderland: Sinder assoc Inc., p. 390-422, 1992.

- HMR, Z.S.; HYLAND, K.E.; KINZELBACH, R.; AMR, S.S.; DEFOSSE, D. **Scorpions et piqures de scorpions en Jordanie**. Bulletin de al Societe de Pathologic Exotique Filiales p. 369, 1989.
- HOREN, W.P., 1972. Insect and scorpion sting. **J. Am. Med. Assoc.** v. 221, p. 894–898.
- KLEINBAUM, D.; KUPPER, L.L.; MULLER, K.E.; NIZAM, A. Analysis of repeated measures data: **Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods**. New York, NY Brooks/Cole Publishing Company, 1998.
- IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; VIEIRA PORTARO, F.C.; STOCKLIN, R.; MARTINS DE CAMARGO, A.C.; PIMENTA, D.C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides.**, United States, v. 25, n.7, p. 1085–1092, 2004.
- ISMAIL, M.; EL-ASMAR, M. F. e OSMAN, O. H. Pharmacological studies with scorpion (*Palamneus gravimanus*) venom: evidence for the presence of histamine. **Toxicon**, United Kingdom, v.13, p.49-56, 1975.
- JOHNSTONE, R. A. W.; ROSE, M. E. (Eds.) **Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists**. New York: Cambridge University Press. 2 Ed. 501p., 1996.
- JONSSON, A.P. Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. **Cell Mol. Life Sci.**, Switzerland, v. 58, p. 868-884, 2001.
- JOVER, E.; BABLITO, J.; COURAUD, F. Binding of b-scorpion toxin: a physicochemical study. **Biochemistry**, United States, p.1147-1152, 1984.
- KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Dalton, **Anal. Chem.**, United States, v. 60, p. 2299-2301, 1988.
- KARBAT, I.; TURKOV, M.; COHEN, L.; KAHN, R.; GORDON, D.; GUREVITZ, M.; FROLOW, F. X-ray structure and mutagenesis of the scorpion depressant toxin LqhIT2 reveals key determinants crucial for activity and anti-insect selectivity. **J. Mol. Biol.**, United Kingdom, v. 366(2): p.586-601. Epub 2006.
- KOBAYASHI, Y.; TAKASHIMA, H.; TAMAOKI, H.; KYOGOKU, Y.; LAMBERT, P.; KURODA, H.; CHINO, N.; WATANABE, T. X.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S. e ET AL. The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion channel blocking neurotoxic peptides. **Biopolymers**, United States, v.31, p.1213-20. 1991.
- KONNO, K.; HISADA, M.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; YASUHARA, T.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; PALMA, M.S.; YAMANE, T.; NAKAJIMA, T. Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp (*Cyphononyx dorsalis*) guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI TOF) mass spectrometry. **Toxicon**, United Kingdom, v. 39, n.8, p. 1257–1260, 2001.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cell. Mol. Life. Sci.**, Switzerland, v.60, p.2651-68, 2003.

LEGROS, C.; CEARD, B.; VACHER, H.; MARCHOT, P.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. **Biochim. Biophys. Acta.**, Netherlands, v. 1723 (1-3), p. 91-99, 2005.

LIPPENS, G.; NAJIB, J.; WODAK, S. J.; TARTAR, A. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. **Biochemistry**, v. 34, p.13-21, 1995.

LIPPINCOTT, J.; APOSTOL, I. Carbamylation of cysteine: a potential artifact in peptide mapping of hemoglobins in the presence of urea. **Anal Biochem.**, United States, v. 267, p. 57-64, 1999.

LORET EP.; SAMPIERI F.; GRANIER C.; MIRANDA F.; ROCHAT H. Scorpion toxins affecting insects. In: CONN MP. Ed. **Neurotoxins**, United Kingdom, San Diego: Academic Press, 423p., 1992.

LOURENÇO, W. R. Humicolous microcharmids scorpions: a new genus and species from Madagascar. **C. R. Biol.** v. 327, p. 77-83, 2004.

LUCAS, S.M.; SILVA-JÚNIOR, P.I. **Acidentes por escorpiões I**, in: Schvartsman, S. (Ed.), *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. Sarvier, São Paulo, p. 211-215, 1992.

LUO, F.; ZENG, X. C.; HAHIN, R.; CAO, Z. J.; LIU, H. e LI, W. X. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism. **Peptides**, United States, v.26, n.12, p.2427-33. 2005.

MADSEN, J.A.; BRODBELT, J.S. Simplifying Fragmentation Patterns of Multiply Charged Peptides by N-Terminal Derivatization and Electron Transfer Collision Activated Dissociation. **Anal. Chem.**, United States, v. 81, p. 3645-3653, 2009.

MAGALHÃES, O. **O Escorpionismo**. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz. IV Memória, 1945.

MAGALHÃES, O.; TUPYNAMBÁ, A. **Escorpionismo**. Brasil Médico, p. 28-29, 1938.

MAO, X.; CAO, Z.; YIN, S.; MA, Y.; WU, Y.; LI, W. Cloning and characterization of BmK86, a novel K<sup>+</sup>-channel blocker from scorpion venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 34, p. 360:728, 2007.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C. e SOARES, M. A. *Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas*. 1 ed. Ribeirão Preto, SP – FUNPEC-Editora, 2011. 140p.

- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H. e BOUGIS, P. E. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. **FEBS Lett**, v.342, n.2, Apr 4, p.181-4. 1994.
- MEKI, A. M. A.; NASSAR, A. Y.; ROCHAT, H. A bradykininpotentiating peptide (peptide K 12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, United States, v. 16, p. 1359 – 1365, 1995.
- MÉNEZ, A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? **Toxicon**, United Kingdom, v. 36, n.11, p. 1557–1572, 1998.
- MÉNEZ, A. **Perspectives in Molecular Toxinology**, John Wiley & Sons Ltd., p.107 - 123, 2002.
- MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. “Venomics” or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, United Kingdom, v. 47, p. 255–259, 2006.
- MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 18, n. 6, p. 636-642, 2004.
- MANZOLI-PALMA, M.F.; GOBBI, N.; PALMA, M.S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 9(2):174-185, 2003.
- MERRIFIELD, B. Solid-Phase synthesis. **Science**, Washington, v. 232, n. 4748, p. 341-347, 1986.
- MEYER, B.; PAPASOTIRIOU, D. G.; KARAS, M. 100% protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics. **Amino Acids**, Austria, v. 41, p. 291–310, 2011.
- MILJANICH, G. P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Curr. Med. Chem.**, Sharjah, v. 11, n. 23, p. 3029-3040, 2004.
- MILLER, C.; MOCZYDŁOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. **Nature**, United Kingdom, v. 313, p. 316-318, 1985.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Escorpionismo**. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Escorpionismo, p.39-47, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde/Centro de vigilância **Epidemiológica: Manual de Diretrizes para atividades de controle de Escorpiões**. São Paulo. 48pp., 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretário de Vigilância e saúde. Boletim eletrônico epidemiológico: **Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública**. São Paulo, 17 pp., 2009

MIYASHITA, M.; MATSUSHITA, N.; SAKAI, A.; NAKAGAWA, Y.; MIYAGAWA, H. Purification and characterization of a novel short-chain insecticidal toxin with two disulfide bridges from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*. **Toxicon**, v. 50 (06), p. 861–867, 2007

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; THEVISSSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J. e VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **Eur. J. Biochem.**, United Kingdom, v.269, n.19, p.4799-810, 2002.

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from Southern Africa. **Eur. J. Biochem.**, United Kingdom, v. 268, p. 1 – 12, 2002.

MOSBAH, A.; KHARRAT, R.; FAJLOUN, Z.; RENISIO, J. G.; BLANC, E.; SABATIER, J. M.; EL AYEB, M. e DARBON, H. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. **Proteins**, United States, v.40, p. 436-42, 2000.

MÜLLER, G.J. Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious envenomations. **S. Afr. Med. J.**, South Africa, v. 83, p. 405–411, 1983.

MYLES, D.C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Curr. Opin. Biotechnol.**, United Kingdom, v. 14, n.6, p. 627–633, 2003.

NASCIMENTO Jr E.B., COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; ROCHA, L.T.; SOUZA, A.L.; GLO'RIA, M.B.; MORAES-SANTOS, T.; COELHO, M.M. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, United Kingdom, v. 45 (5), p. 585–593, 2005.

NICOLAS, G.; VIATTE, L.; LOU, D.Q.; BENNOUN, M.; BEAUMONT, C.; KAHN, A.; ANDREWS, N.C.; VAULONT, S. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. **Nat Genet.**, United States, v. 34, p. 97-101, 2003.

NICHOLSON, G.M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. **Toxicon**, United Kingdom, v.49, No.4, p. 490-512, 2007.

NIRTHANAN, S.; PIL, J.; ABDEL-MOTTALEB, Y.; SUGAHARA, Y.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; JOSEPH, J. S.; SATO, K. e TYTGAT, J. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. **Biochem Pharmacol.**, United States, v.69, n.4, Feb 15, p.669-78, 2005.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; SOMODI, S.; FERNANDEZ, J. A.; ZAMUDIO, F. Z.; BECERRIL, B.; VARGA, Z.; PANYI, G.; GASPARG, R. e POSSANI, L. D. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K<sup>+</sup> channels of T cells. **Toxicon**, United Kingdom, v.46, p.418-29, 2005.

OREN, D.A.; FROY, O.; AMIT, E.; KLEINBERGER-DORON, N.; GUREVITZ, M.; SHAANAN, B. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha-helix at the C-terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. **Structure**, United States, v. 6, p.1095–1103, 1998.

OUKKACHE, N.; ROSSO, J.P.; ALAMI, M.; GHALIM, N.; SAÏLE, R.; HASSAR, M.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. New analysis of the toxic compounds from the *Androctonus mauretanicus mauretanicus* scorpion venom. **Toxicon** United Kingdom, v.51(5), p.835-52, 2008.

PESSINI, A.C.; KANASHIRO, A.; MALVAR DDO C.; MACHADO, R.R.; SOARES, D.M.; FIGUEIREDO, M.J.; KALAPOTHAKIS, E.; SOUZA, G.E. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. **Toxicon**, United Kingdom, v.52(7), p.729-36, 2008.

PIMENTA, A.M.; STOCKLIN, R.; FAVREAU, P.; BOUGIS, P.E.; MARTIN EAUCCLAIRE, M.F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid. Commun. Mass. Spectrom.**, United Kingdom, v. 15, p. 1562–1572, 2001.

PIMENTA, A.M.; ALMEIDA, F.M.; DE LIMA, M.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass. Spectrom.**, United Kingdom, v. 17, p. 413–418, 2003.

PIMENTA, A.M.C.; LEGROS, C.; ALMEIDA, F.M.; MANSUELLE, P.; DE LIMA, M.E.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. **Biochem.Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 301, n.4, p.1086–1092, 2003.

PIMENTA, A. M. C.; DE LIMA, M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms **Journal of Peptide Science**, United States, v.11, p. 670–676, 2005a.

PIMENTA, A.M.C.; RATES, B.; BLOCH, C. JR.; GOMES, P.C.; SANTORO, M.M.; DE LIMA, M.E.; RICHARDSON, M.; CORDEIRO, M.N. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, United Kingdom, v. 19, n.1, p. 31–37, 2005b.

- PINHEIRO, C.B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na<sup>+</sup> channels. **Acta Cryst. D.**, v. 59, p. 405–415, 2003.
- PINTAR, A.; POSSANI, L.D.; DELEPIERRE, M. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β scorpion neurotoxin acting on sodium channels. **J. Mol. Biol.**, United Kingdom, v. 287, p. 359–367, 1999.
- POSSANI, L.D.; ALAGON, A.C.; FLETCHER JR, P.L.; ERICKSON, B.W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Biochem. Biophys.** v. 180 (2), p. 39-403, 1977.
- POSSANI, L. D. **Structure of scorpion toxins.** In: A. T. Tu (Ed.). *Handbook of Natural Toxins*. New York: Marcel Dekker, INC., Structure of scorpion toxins, v.2, p.513-550, 1984.
- POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M. e TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. **Eur. J. Biochem.**, United Kingdom, v.264, n.2, Sep, p.287-300, 1999.
- POSSANI, L.D.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.; BECERRIL, B.; Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, France, v. 82, p. 861–868, 2000.
- POUVREAU, S.; CSERNOCH, L.; ALLARD, B.; SABATIER, J.M.; WAARD, M.; RONJAT, M.; JACQUEMOND, V. Transient Loss of Voltage Control of Ca<sup>2+</sup> Release in the Presence of Maurocalcine in Skeletal Muscle. **Biophys. J.**, United States, v. 91(6): p. 2206–2215, 2006.
- PRATES, M.V.; SFORCA, M.L.; REGIS, W.C.; LEITE, J.R.; SILVA, L.P.; PERTINHEZ, T.A.; ARAUJO, A.L.; AZEVEDO, R.B.; SPISNI, A.; BLOCH, C. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **J. Biol. Chem.**, United States, v. 279, n. 13, p. 13018–13026, 2004.
- QUISTAD, G.B.; DENNIS, P.A.; SKINNER, W.S. Insecticidal activity of spider (Araneae) Centipede (Chilopoda), Scorpion (Scorpionida), and Snake (Serpentes) Venoms. **J. Econ. Entomol.**, United States, v. 85, p. 33-9, 1992.
- RATES, B.; FERRAZ, K.K.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, United Kingdom, v.52(5), p.611-8, 2008.
- REGEV, A.; RIVKIN, H.; INCEOGLU, B.; GERSHBURG, E.; HAMMOCK, B.D.; GUREVITZ, M.; CHEJANOVSKY, N. Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. **FEBS Lett.**, Netherlands, v. 537, p.106–110, 2003.
- RIMSZA, M.E.; ZIMMERMAN, D.R.; BERGESON, P.S. Scorpion envenomation. **Pediatrics**, v. 66, p. 298–301, 1980.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. **Adv Cytopharmacol**, United States, v.3, p.325-34, 1979.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. **Biomed. Mass Spectrom.**, vol. 11, n. 11, p. 601, 1984.

SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPPO NETO, F.; GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T1IV (TsTXIII) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, United Kingdom, v. 29(6), p. 663 – 672, 1991.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. Excitation and sensitization of the articular afferents from cat's knee joint by prostaglandins E2. **J. Physiol.**, United Kingdom, v. 403, p. 91-104, 1988.

SCHMIDT, J.O. **Allergy to Hymenoptera venoms**. In: Piek T, ed. *Venoms of the Hymenoptera*. London: Academic Press, p. 509-546, 1986.

SCHULZ-KNAPPE, P.; SCHRADER, M.; STÄNDKER, L.; RICHTER, R.; HESS, R.; JÜRGENS, M.; FORSSMANN, W.G. Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. **J Chromatogr A**, Netherlands, v. 776, p.125-132, 1977.

SCHULZ-KNAPPE, P.; ZUCHT, H.D.; HEINE, G.; JÜRGENS, M.; HESS, R.; SCHRADER, M. Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. **Comb Chem High Throughput Screen**, Netherlands, v.4, n.2, p.207-17, 2001.

SCHWARTZ, E.F.; DIEGO-GARCIA, E.; DE LA VEGA, R.C.R.; POSSANI, L.D. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). **BMC Genomics**, United Kingdom, v. 8, p.119, 2007.

SCHWARTZ, E. F.; CAMARGOS, T. S.; ZAMUDIO, F. Z.; SILVA, L. P.; BLOCH, C. JR.; CAIXETA, F.; SCHWARTZ, C. A.; POSSANI, L. D. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Toxicon**, v. 51(8), p. 1499-508, 2008.

SIMARD, M.J.; WATT, D.D. **Venoms and toxins**. In: Polis GA, editor. *The biology of scorpions*, New York: Stanford University Press, p. 414-44, 1990.

SITARAM, N.; NAGARAI, R. Interaction of the 47-residue antibacterial peptide seminaplasmin and its 13-residue fragment which has antibacterial and hemolytic activities with model membranes. **Biochemistry**, v.32, p.3124-3130, 1993.

SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity, **Biochim. Biophys. Acta**, Netherlands, v. 1462, p. 29–54, 1999.

SRINIVASAN, K.N.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN, P.T.; CHEW, K.C.; CHENG, B.; KINI, R.M.; KOH, J.L.Y.; SEAH, S.H.; BRUSIC, V. Scorpion, a

molecular database of scorpion toxins. **Toxicon**, United Kingdom, v. 40, n.1, p. 23–31, 2002.

STARK, G.R. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. Reactions with amino and carboxyl groups. **Biochemistry**, United States, v. 4, n.6, p.1030-6, 1965.

STRUGATSKY, D.; ZILBERBERG, N.; STANKIEWICZ, M.; ILAN, N.; TURKOV, M.; COHEN, L.; PELHATE, M.; GILLES, N.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. Genetic polymorphism and expression of a highly potent scorpion depressant toxin enables refinement of the effects on insect Na-channels and illuminates the key role of Asn-58. **Biochemistry**, United States, v. 44, p. 9179–9187, 2005.

SWINDELLS, M.B.; OVERINGTON, J.P. Prioritizing the proteome: identifying pharmaceutically relevant targets. **Drug Discov. Today**, United Kingdom, vol. 7, n.9, p.516–521, 2002.

SYKA, J.E.P.; COON, J.J.; SCHROEDER, M.J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, United States, v.101, p.9528–9533, 2004.

THEAKSTON, R.D.; KAMIGUTI, A.S. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. **Toxicon**, United Kingdom, v. 40, n.5, p. 579–651, 2002.

TOLEDO, D.V.; NEVES, A.G.A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, United States, 55B, p. 249-253, 1976.

TORRES-LARIOS, A.; GURROLA, G. B.; ZAMUDIO, F. Z.; POSSANI, L. D. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of scorpion *Hadrus aztecus*. **Eur. J. Biochem.**, United Kingdom, 267, p. 5023 – 5031, 2000.

TUICHIBAEV, M. U.; AKHMEDOVA, N. U.; KAZAKOV, I.; KORNEEV, A. S.; GAGEL'GANS, A. I. Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*, structure and function. **Biokhimiia**, Moskva, v. 53, n. 2, p. 219-226, 1988.

TYTGAT, J.; CHANDY, K.G.; GARCIA, M.L.; GUTMAN, G.A.; MARTIN EAUCLAIRE, M.F.; VAN DER WALT, J.J.; POSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends. Pharmacol. Sci.**, United Kingdom, v. 20, p. 444–447, 1999.

VALDIVIA, H. H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W. J.; CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v.89, n.24, 12185-9, 1992.

VALDIVIA, H. H.; POSSANI, L. D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. **TCM**, France, v.8, n.3, p.111-118, 1998.

- VANDENDRIESSCH, T.; OLAMENDI-PORTUGA, T.; ZAMUDIO, F.Z.; LOURIVAL D. POSSANI, L.D.; TYTGAT, J. Isolation and characterization of two novel scorpion toxins: The  $\alpha$ -toxin-like CeII8, specific for Na v1.7 channels and the classical anti-mammalian CeII9, specific for Na v1.4 channels. **Toxicon**, United Kingdom, v. 56, n. 4, pp. 613-623, 2010.
- VERDONCK, F.; BOSTEELS, S.; DESMET, J.; MOERMAN, L.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; TYTGAT, J.; VAN DER WALT, J. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). **Cimbebasia**, Namibia, v. 16, p. 247 – 260, 2000.
- WANG, D.; KALUME, D.; PICKART, C.; PANDEY, A.; COTTER, R. J. Identification of protein ubiquitylation by electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sulfonated tryptic peptides. **Anal. Chem.**, United States, v.78, p. 3681–3687, 2006.
- WARRELL, D.A. **Animal poisons**. In: Manson-Bahr PEC, Bell DR, eds. Manson's Tropical Diseases. London: Bailliere Tindall, p.855-898, 1987.
- WARRELL, D.A. Snake bite, **Lancet**, United Kingdom, v. 375, n.9708, p. 77–88, 2010.
- WITTKER, S.; KAISER, T.; MISCHAK, H. Differential polypeptide display: the search for the elusive target. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, Netherlands, v. 803, p.17-26, 2004.
- WRIGHT, R. P.; CHAN, T. K.; HONETSCHLAGER, L.; HOWELL, D. E. e ODELL, G. V. Enzymes and toxins of the scorpion venom *Palamneus gravimanus*. **Toxicon**, United Kingdom, v.15, p.197-205, 1977.
- XIE, F.; SMITH, R. D.; SHEN, Y. Advanced proteomic liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 1261, p. 78– 90, 2012.
- YIBAO, M.; YONG, Z.; RUIPING, Z.; WEIPING, Z.; YAWEN, H.; YINGLIANG, W.; ZHIJIAN C.; LIN G.; e WENXIN, L. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. **Proteomics**, Germany, v. 10, p. 2471–2485, 2010.
- YOUNG, B.; HEATH, J. **Functional Histology**, A text and colour Atlas. 4th Edn., Hurchill Livingstone, New York, pp: 252-298, 2000.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, Netherlands, 16: 109-10, 1983.
- ZENG, X. C.; LI, W. X.; PENG, F.; ZHU, Z. H. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a Bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB Life**, United Kingdom, v. 49, p. 207 – 210, 2000.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; WANG, S. X.; ZHU, S. Y.; LUO, F. Precursor of a novel scorpion venom peptide (BmKn1) with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB Life**, United Kingdom, v. 51, p. 117 – 120, 2001.

ZENG, X. C.; WANG, S. X.; ZHU, Y.; ZHU, S. Y.; LI, W. X. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **Peptides**, United States, v. 25, p. 143 – 150, 2004.

ZENG, X. C.; CORZO, G. e HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB Life**, v.57, n.1, Jan, p.13-21. 2005.

ZHU, S.; LI, W.; ZENG, X.; JIANG, D.; MAO, X. e LIU, H. Molecular cloning and sequencing of two 'short chain' and two 'long chain' K(+) channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **FEBS Lett**, v.457, n.3, Sep 3, p.509-14. 1999.

ZLOTKIN, E. **Chemistry and pharmacology of buthinae scorpion venoms**. In: S. Bettini (Ed.). *Arthropd Venoms, Chemistry and pharmacology of buthinae scorpion venoms*, p.317-369, 1978.

ZLOTKIN, E., KADOURI, D., GORDON, D., PELHATE, M., MARTIN, M-F., ROCHAT, H., 1985. An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. **Arch. Biochem. Biophys.**, United States, v. 240, p. 877–887, 1985.

ZORN, T.M. Células Deciduais. In: Hernandes F Carvalho e Carla B Collares-Buzato. (Org. ). *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. 1 ed. Barueri-São Paulo: Manole, p. 346-356, 2005.

---

Prof. Dr. Mario Sergio Palma  
(Orientador)

---

Anally R. S. Menegasso  
(Aluna)