

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
Campus de CAMPO GRANDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR - PMBqBM – SBBq

HENRIQUE RANIERI COVALI PONTES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA PEÇONHA E  
HEMOLINFA DE *Tityus paraguayensis***

CAMPO GRANDE - MS  
MARÇO - 2022

HENRIQUE RANIERI COVALI PONTES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA PEÇONHA E  
HEMOLINFA DE *Tityus paraguayensis***

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

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

CAMPO GRANDE - MS  
MARÇO - 2022

Ficha catalográfica com os dados fornecidos pelo autor

Covali-Pontes, Henrique Ranieri Covali Pontes.

Caracterização Bioquímica e Biológica da Peçonha e Hemolinfa de *Tityus paraguayensis* / Henrique Ranieri Covali Pontes; Orientador Malson Neilson de Lucena. -- Campo Grande, 2022.

79 p.

Dissertação (Mestrado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2022.

1. Escorpião. 2. Fosfolipásica. 3. Lipolítica. 4. Perfil proteico. 5. Proteolítica I. Lucena, Malson Neilson de. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

HENRIQUE RANIERI COVALI PONTES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA PEÇONHA E  
HEMOLINFA DE *Tityus paraguayensis***

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

03 de março de 2022

**Comissão Examinadora**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Santos Rodrigues  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mônica Cristina Tofolli Kadri  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

*Dedico este trabalho a três mulheres que representam grande fonte de inspiração em minha vida: minha mãe Dulci Covali pelo exemplo de honestidade e trabalho, sem a qual não teria alcançado tal feito; Prof.<sup>a</sup> Dra. Natalia Pasternak pelo exemplo de integridade científica no combate ao negacionismo; e Prof.<sup>a</sup> Dra. Jennifer Doudna cuja produção acadêmica me suscitou o interesse científico que hoje me motiva.*

*“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor”*

**Paulo Freire**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena por aceitar conduzir-me nessa jornada com excelência, acreditando em minha capacidade e me incentivando sempre à evolução pessoal e acadêmica. Agradeço sobretudo a todo o seu apoio e ensinamentos, mesmo diante de tantos desafios enfrentados ao longo desse período. Agradeço por me permitir conquistar meus sonhos e aceitar me orientar no doutorado, mais uma vez depositando sua confiança em mim.

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

Agradeço também aos colaboradores. Ao Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos – INBIO (UFMS), pela doação de amostras de rim para realização de experimentos relacionados a enzima ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ ) – ATPase. À Prof.<sup>a</sup> Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira do Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios – INBIO (UFMS), pelo auxílio nas análises de citotoxicidade e avaliação da atividade antitripanossômica. Ao Prof. Dr. Leonardo Sousa Carvalho da Coleção de História Natural da Universidade Federal do Piau – CHNUFPI (UFPI), pela identificação dos escorpiões utilizados no presente estudo. À Prof.<sup>a</sup> Dra. Giovana Cristina Giannesi e ao Me. Jonh Dayvan Maidana Serpa do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos – INBIO (UFMS), pelo auxílio na realização do ensaio de atividade lipolítica. E à Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo e o Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) – FACFAN (UFMS), pelo auxílio nas análises cromatográficas e avaliação da atividade antitriptica.

Agradeço aos colegas de bancada Mila Fernandes, Laís Corrêa, Romário Portilho, Igor Leal e Telma Rodrigues pela amizade e companheirismo no dia a dia do laboratório, e em especial, à Mila Fernandes pela inestimável ajuda na coleta de escorpiões.

A todos os professores que me ensinaram durante toda minha vida educacional e moldaram-me como o profissional que sou hoje, e em especial, à Prof.<sup>a</sup> Dra. Danielle Serra de Lima minha grande incentivadora.

Agradeço a minhas amigas e amigo de longa data por todo apoio, Bruna Sanae, Jéssica de Souza, Anne Sandim, Fernanda Nogueira, Karina Paulinelli, Ana Paula Sales, Rebeca Rocha, Leonardo de Carvalho, Thais da Glória e Carina de Araujo.

E por fim, agradeço imensamente minha mãe Dulci Covali, mulher trabalhadora e guerreira, por me aceitar como sou e dedicar toda sua vida a minha educação, garantindo um futuro para mim.

## RESUMO

- Caracterização bioquímica e biológica da peçonha e hemolinfa de *Tityus paraguayensis*

Os escorpiões são artrópodes pertencentes a ordem Scorpiones, com aproximadamente 2654 espécies descritas e distribuídas por diversos ecossistemas, sendo muitas destas endêmicas. Estes animais apresentam hemolinfa e glândulas de peçonha, contendo a peçonha que pode ser inoculada na presa pelo telson. Portanto, os escorpiões são animais peçonhentos, embora cerca de 50 espécies apresentem importância médica. Tanto a hemolinfa, quanto a peçonha apresentam componentes com diversas funções bioquímicas e biológicas, entre essas algumas de interesse farmacológico e/ou biotecnológico. Visto isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar bioquímica e biologicamente a peçonha e hemolinfa do escorpião endêmico de Mato Grosso do Sul, *T. paraguayensis*. Para este fim, foram realizadas as seguintes etapas: ensaios eletroforéticos; atividades proteolíticas, fosfolipásicas A<sub>2</sub>, lipolíticas e antitriptica; atividade antitripanossômica; avaliação da citotoxicidade; efeito da peçonha e hemolinfa sobre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) – ATPase; e obtenção de perfil cromatográfico. Observou-se nos ensaios eletroforéticos e cromatográficos que a peçonha apresenta uma grande diversidade de componentes, também se detectou atividade proteolítica, fosfolipásica e lipolítica, ademais a peçonha provocou um aumento de atividade da enzima (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) – ATPase e uma diminuição da viabilidade de formas epimastigota de *T. cruzi*. Não foram observadas citotoxicidade contra células normais e atividade antitriptica da peçonha de *T. paraguayensis*. A hemolinfa por sua vez, apresentou baixa diversidade de proteínas, além da presença de atividades proteolítica e lipolítica. Os resultados demonstram que a peçonha e hemolinfa de *T. paraguayensis* apresentam potencial para bioprospecção de compostos de interesse farmacológico e/ou biotecnológicos, necessitando de novos estudos para caracterizar e isolar estes componentes.

**Palavras-chave:** escorpião; fosfolipásica; lipolítica; perfil proteico; proteolítica.

## ABSTRACT

- Biochemical and biological characterization from *Tityus paraguayensis* venom and hemolymph

Scorpions are arthropods from the order Scorpiones, with approximately 2654 species described and distributed in the different ecosystems, many of which are endemic. These animals have hemolymph and venom glands, which can be inoculated into the prey by the telson. Therefore, scorpions are venomous animals, although about 50 species are of medical importance. Both the hemolymph and the venom have components with different biochemical and biological functions, including some of pharmacological and/or biotechnological interest. Therefore, the present study aimed to characterize biochemically and biologically the venom and hemolymph of the scorpion endemic to Mato Grosso do Sul, *Tityus paraguayensis*. For this purpose, the following steps were carried out: electrophoretic assay; proteolytic, phospholipasic, lipolytic and antitryptic activities; analysis of antitrypanosomal activity; assessment of cytotoxicity; the effect of venom and hemolymph on the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) – ATPase activity; and chromatographic assays. It was observed that the venom has a great diversity of components, as well as detected proteolytic, phospholipasic and lipolytic activity. In addition, the venom increased the activity of the enzyme (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) - ATPase and decreased the viability of epimastigote forms of *T. cruzi*. No cytotoxicity against normal cells and antitryptic activity were observed to *Tityus paraguayensis* venom. The hemolymph showed low protein diversity, but it was seen the proteolytic and lipolytic activities. The results demonstrate that the *Tityus paraguayensis* venom and hemolymph have potential for bioprospecting for compounds of pharmacological and/or biotechnological interest, requiring further studies to characterize and isolate these components.

**Keywords:** scorpion; lipolytic; phospholipasic; protein profile; proteolytic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Eramoscorpius brucensis*, escorpião fóssil aquático (Fonte: modificado de WADDINGTON; RUDKIN; DUNLOP, 2015).....21
- Figura 2.** Morfologia externa dorsal e ventral de um escorpião: ps) prossoma; ms) mesossoma; mt) metassoma; pd) pedipalpo; ql) quelícera; pe) perna; et) esterno; pn) pentes es) par de estigmas respiratórios do sexto segmento mesossomal; tl) télson. (Fonte: Extraído de BRAZIL; PORTO, 2010).....22
- Figura 3.** Fotografias de um escorpião da espécie *Tityus paraguayensis*, A - vista dorsal; B - vista ventral (Fonte: acervo do autor).....26
- Figura 4:** Perfil eletroforético de 20 µg da peçonha de *Tityus paraguayensis* (T.p) realizado através de SDS-PAGE 15% (A) e SDS-PAGE 16,5% (B). Os números e letras em vermelho fazem referência as bandas abordadas no texto.....48
- Figura 5:** Perfil eletroforético de 20 µg da hemolinfa (H T.p), fração plasma (H T.p-P) e hemócitos (H T.p-H) de *Tityus paraguayensis*, realizado através de um SDS-PAGE 15%.....50
- Figura 6:** Zimograma feito com 20 µg da peçonha (T.p), hemolinfa (H T.p), plasma (H T.p-P) e hemócitos (H T.p-H) de *Tityus paraguayensis* através de uma eletroforese (SDS-PAGE 15%) com gelatina a 0,25 mg/mL.....51
- Figura 7:** Atividade lipolítica da peçonha, hemolinfa e suas frações (plasma e hemócitos) de *Tityus paraguayensis*, expressa em U/mg. A barra representa o desvio padrão dos experimentos. As letras diferentes representam as amostras estatisticamente diferentes, análises ANOVA e teste de Tukey foram realizadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.....54
- Figura 8:** Atividade antitriptica analisada em 2 µg de peçonha, hemolinfa e suas frações (plasma e hemócitos) de *Tityus paraguayensis*, além do controle. No eixo y se encontra absorbância observada em cada amostra e no eixo x o tempo de incubação. A barra representa o desvio padrão dos experimentos, análises ANOVA e teste de Tukey foram realizadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.....55
- Figura 9:** Atividade antitripanossômica analisada em diferentes concentrações de peçonha de *Tityus paraguayensis* e controle. No eixo y se encontra a viabilidade de formas epimastigota de *T. cruzi* (%), e no eixo x as concentrações (µg/mL). A barra representa o desvio padrão dos

experimentos, sendo o asterisco indicativo do tratamento que apresentou diferença significativa em relação ao controle, obtido através ANOVA e teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.....57

**Figura 10:** Atividade citotóxica analisada em diferentes concentrações de peçonha de *Tityus paraguayensis* e controle. No eixo y se encontra a viabilidade celular (%), e no eixo x as concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ). A barra representa o desvio padrão dos experimentos, foram realizadas análises ANOVA e teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.....58

**Figura 11:** Atividade pNPPase da enzima NKA em duas concentrações (1 e 10  $\mu\text{g}$ ) da peçonha de *Tityus paraguayensis*, expressa em nmol de Pi/min/mg. A barra representa o desvio padrão dos experimentos, sendo o asterisco indicativo do tratamento que apresentou diferença significativa em relação ao controle, análises ANOVA e teste de Tukey foram realizadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.....59

**Figura 12:** Perfil cromatográfico obtido através da eluição de 3 mg de peçonha liofilizada de *Tityus paraguayensis* em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com um gradiente de 5% a 95% de solução B.....61

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Níveis clínicos dos acidentes com escorpiões e seus respectivos sintomas.....25
- Tabela 2.** Número de acidentes escorpiônicos notificados anualmente, divididos por região de ocorrência. A tabela também fornece os dados para o estado de Mato Grosso do Sul (MS) em específico. \* Dados de 2020 do Espírito Santo não estão disponíveis neste sistema pois são oriundos do Sistema de Informação e-SUS VS, em uso pelo estado desde janeiro de 2020....28
- Tabela 3.** Atividade fosfolipásica da peçonha, plasma e hemócitos de *T. paraguayensis*, expressa em U/mg e seguida de seu respectivo desvio padrão amostral. O sinal negativo (-) indica a não detecção de atividade na amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.....53
- Tabela 4.** Atividade pNPPase da enzima NKA quando exposta a diferentes concentrações (1 e 10 µg) de hemócitos, plasma e hemolinfa de *T. paraguayensis*, expressa em nmol de Pi/min/mg e seguida de seu respectivo desvio padrão amostral. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.....60
- Tabela 5.** Dados de altura do pico (mAU) e altura relativa (%) de cada um dos picos obtidos através da eluição de 3 mg de peçonha liofilizada de *Tityus paraguayensis* em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com um gradiente de 5% a 95% de solução B.....61
- Tabela 6.** Resultados obtidos no presente estudo, de acordo com cada amostra avaliada.....64

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAPNA	N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride
BPF	Fator de potencialização da bradicinina
Ca <sup>2+</sup>	Íon de cálcio
CaCl	Cloreto de cálcio
Cl <sup>-</sup>	Íon de cloro
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CS	Cisteína estabilizada
Da	Dalton
DBP	Peptídeo com ponte de dissulfeto
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
e-SUS VS	Estratégia de Informatização-Sistema Único de Saúde Vigilância em Saúde
EUA	Estados Unidos da América
G	Grama
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
IC50	Concentração inibitória de 50%
INBIO	Instituto de Biociências

K <sup>+</sup>	Íon de potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotássico
KDa	KiloDalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
LED-UV	Diodo Emissor de Luz – Luz Ultravioleta
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Molar
mAU	Miliunidades de Absorbância
MCE	Eletroforese capilar microfluídica
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Mato Grosso do Sul
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Na <sup>+</sup>	Íon de sódio
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Tetraborato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NDBP	Peptídeo sem ponte de dissulfeto
NKA	(Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase
nm	Nanômetro
nmol	Nanomols
Nº	Número
NTX	Noxiustoxina
°C	Grau Celsius
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrogênio iônico
Pi	Fosfato inorgânico

PIP	Peptídeo inibidor de protease
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato
®	Registrado
RPPN	Reserva Particular de Patrimônio Natural
RyRs	Receptor de rianodina
s	Segundo
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SNARE	Ligação de fator sensível a N-etilmaleimida solúvel
sp.	Espécie
sPLA <sub>2</sub>	Fosfolipases da família A2 secretadas
spp.	Espécies
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
V	Voltz
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µm	Micrometro
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1. Escorpiões.....	21
2.2. Escorpionismo.....	23
2.3. Toxinas Animais.....	28
2.4. Escorpiões: peptídeos.....	30
2.4.1. Peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs).....	30
2.4.2. Peptídeos sem pontes de dissulfeto (NDBPs).....	34
2.5. Escorpiões: enzimas.....	37
2.6. Hemolinfa.....	38
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1. Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1. Animais.....	41
4.2. Extração.....	41
4.3. Dosagem de proteínas.....	42
4.4. Eletroforese (SDS-PAGE).....	42
4.5. Atividade proteolítica.....	43
4.6. Atividade fosfolipásica.....	43
4.7. Atividade lipolítica.....	44
4.8. Atividade antitriptica.....	44
4.9. Atividade antitripanossômica.....	45
4.10. Atividade citotóxica.....	45
4.11. Efeito da peçonha e hemolinfa sobre a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+) - \text{ATPase}$ .....	46
4.12. Perfil espectrométrico da peçonha.....	46
4.13. Análises estatística.....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1. Eletroforese (SDS-PAGE).....	48
5.2. Atividade proteolítica.....	51
5.3. Atividade fosfolipásica.....	52
5.4. Atividade lipolítica.....	54

5.5. Atividade antitriptica.....	55
5.6. Atividade antitripanossômica.....	56
5.7. Atividade citotóxica.....	58
5.8. Efeito da peçonha e hemolinfa sobre a atividade da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ) – ATPase.....	59
5.9. Perfil cromatográfico da peçonha.....	61
5.10. Análise geral dos resultados.....	64
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida e Ordem Scorpiones, tendo representantes em todos os continentes com exceção dos polos (BRAZIL; PORTO, 2010). Entretanto, esses animais apresentam uma maior diversidade nas regiões subtropicais (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ et al., 2015), sendo em alguns países destas regiões um problema de saúde pública, visto a capacidade de algumas espécies de causar acidentes (ABROUG et al., 2020). Os casos de envenenamento podem apresentar níveis de gravidade distintos, dependendo da faixa etária e condições prévias de saúde da vítima (CHIPPAUX, 2012). Contudo, o tratamento mais indicado consiste na aplicação de um soro antiescorpiônico (MONTEIRO et al., 2019).

No Brasil, as espécies responsáveis pelos casos de envenenamento escorpiônico são pertencentes ao gênero *Tityus*, sendo a maioria dos acidentes graves registrados com quatro espécies: *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo), *Tityus bahiensis* (escorpião marrom), *Tityus stigmurus* (escorpião do nordeste) e *Tityus obscurus* (escorpião amazônico) (NENCIONI et al., 2018). No entanto, outras espécies também podem ser encontradas no Brasil, inclusive espécies endêmicas como o *Tityus paraguayensis* que ocorre no Paraguai, Argentina e apenas no estado de Mato Grosso do Sul em território brasileiro (CARVALHO et al., 2017).

As peçonhas apresentam uma grande complexidade química, sendo identificadas as seguintes classes de moléculas: lipídios, nucleotídeos, enzimas, amins biogênicas, componentes heterocíclicos, sais inorgânicos, aminoácidos livres, peptídeos, entre outros (ORTIZ et al., 2015). Em virtude dessa diversidade de compostos químicos, já foram identificadas diversas moléculas nas peçonhas de escorpiões com potencial atividade farmacológica. Como exemplo, tem-se a estigmurina, isolada de *Tityus stigmurus* e que apresenta atividade antimicrobiana e antiproliferativa para células tumorais e normais (PARENTE et al., 2018), e o peptídeo antifúngico Ts1 identificado na peçonha de *Tityus serrulatus* (SANTUSSI et al., 2017). A hemolinfa obtida de escorpiões se mostra também promissora na identificação de moléculas bioativas, sendo já descrita como fonte de peptídeos antimicrobianos (DE JESUS OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA JUNIOR, 2019).

Dessa forma, observa-se que há uma grande diversidade química nas peçonhas e hemolinfas de escorpiões, que se mostram como potenciais fontes para bioprospecção de moléculas com possível atividade biotecnológica e/ou farmacológica, como já identificado em trabalhos anteriores. No entanto, devido ao grande número de espécies e endemismo

encontrado nos escorpiões, se faz necessário a caracterização de moléculas encontradas em animais ainda pouco estudados, principalmente com um enfoque em espécies endêmicas, que podem apresentar possível potencial químico e biotecnológico ainda não explorado. Portanto, o presente estudo pretende analisar o potencial de uma espécie endêmica encontrada no estado de Mato Grosso do Sul, a espécie *Tityus paraguayensis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Escorpiões

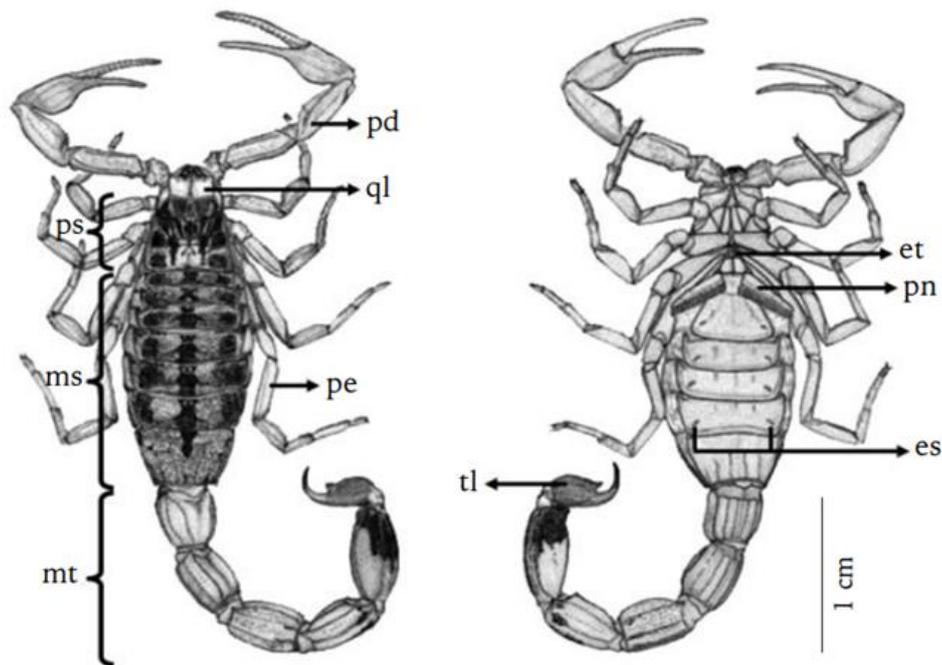
Os escorpiões são artrópodes pertencentes a classe Arachnida, juntamente com as aranhas (Araneae), opiliões (Opiliones), ácaros (Acari) e outros grupos menos conhecidos. Mais especificamente pertencem a ordem Scorpiones, que é composta por 22 famílias, 247 gêneros e cerca de 2654 espécies, contudo, estima-se que esse número seja ainda maior devido a subidentificação. Além disso, a identificação de algumas espécies ainda estão sob revisão, visto algumas divergências taxonômicas (BRAZIL; PORTO, 2010; REIN, 2022). Estes animais apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todos os continentes, com exceção dos polos, contudo, a maioria dos escorpiões identificados ocorrem nas regiões subtropicais (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ et al., 2015).

A história natural deste grupo de animais aponta-os como os artrópodes mais antigos, seus primeiros registros fósseis datam do período Siluriano, sendo que sua origem em ambientes aquáticos ou terrestres ainda é discutida. O primeiro exemplar fóssil já descrito de escorpiões data de 437,5 a 436,5 milhões de anos atrás, denominado *Parioscorpio venator*, foi encontrado no estado de Wisconsin (EUA), contudo, o habitat exato deste organismo ainda é incerto (LOURENÇO, 2013; WENDRUFF et al., 2020). Durante a evolução de tal grupo poucas alterações morfológicas externas foram observadas (Figura 1), levando a diversos equívocos de classificação taxonômica durante a construção de sua história evolutiva (WADDINGTON; RUDKIN; DUNLOP, 2015).



**Figura 1.** *Eramoscorpius bruceus*, escorpião fóssil aquático (Fonte: modificado de WADDINGTON; RUDKIN; DUNLOP, 2015)

Entre suas principais características morfológicas externas, os escorpiões apresentam o corpo dividido em duas porções, prossoma (cefalotórax) e opistossoma (abdômen) (Figura 2). No prossoma se encontram inseridos seis pares de apêndices corporais, sendo estes, um par de pedipalpos com quelas utilizadas na captura de presas, um par de quelíceras próxima a região oral que auxilia na trituração de alimentos e quatro pares de apêndices locomotores. Além desses, na região dorsal se encontram um par de olhos, podendo haver olhos acessórios ou até mesmo ausência total de olhos a depender da espécie (STOCKMANN, 2015).



**Figura 2.** Morfologia externa dorsal e ventral de um escorpião: ps) prossoma; ms) mesossoma; mt) metassoma; pd) pedipalpo; ql) quelíceras; pe) perna; et) esternito; pn) pentes; es) par de estigmas respiratórios do sexto segmento mesossomal; tl) télson. (Fonte: Extraído de BRAZIL; PORTO, 2010).

O opistossoma por sua vez é dividido em duas regiões, mesossoma e metassoma. O mesossoma é a parte mais robusta do opistossoma, sendo composta por sete placas dorsais (esternitos) que podem ou não conter ornamentações. Em sua região ventral se encontram o opérculo genital, um par de pentes sensoriais e os espiráculos (estigmas) respiratórios distribuídos em pares pelas placas ventrais (esternitos). A junção destes esternitos é feita através das membranas articulares e pleurais (lateralmente) (STOCKMANN, 2015).

O metassoma, conhecido popularmente como cauda, é a parte mais estreita do opistossoma, composto por cinco esternitos que recobrem toda a circunferência não havendo membrana pleural e ao final dos segmentos se encontra o ânus do animal e o télson. O télson é uma estrutura globular responsável por abrigar um par de glândulas de peçonha que estão cobertas por tecido muscular que se contrai expelindo a peçonha quando necessário.

Para inoculação em suas presas, o télson também conta com um agulhão cuja ponta apresenta dois canais de liberação da peçonha, sendo uma estrutura rígida e pontiaguda que penetra nas presas (STOCKMANN, 2015).

A diversidade adaptativa encontrada nos escorpiões permite que estes ocupem desde regiões desérticas até cavernas úmidas, mostrando assim, características e estratégias especializadas para ocupar diferentes nichos (NAVIDPOUR, 2021; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; FRANCKE; PRENDINI, 2014). No entanto, existem também espécies chamadas de generalistas, sendo essas capazes de ocupar mais de um tipo de ambiente. Algumas espécies também podem ocupar regiões com grandes alterações ambientais causadas pelo homem, como edificações em áreas urbanas e rurais (LOURENÇO, 2018).

A alimentação dos escorpiões é bem diversa podendo variar de insetos (como baratas, grilos, larvas, entre outros), pequenos vertebrados e até mesmo ao canibalismo em condições de escassez alimentar. Tendo em vista que alguns dos artrópodes, dos quais os escorpiões se alimentam, podem ser nocivos para os humanos, os escorpiões podem atuar também no controle de pragas. Durante o processo de forrageamento, os escorpiões se utilizam dos pedipalpos para a captura da presa e apenas quando essa apresentar resistência será utilizada a peçonha para paralisar e iniciar a digestão (MARTINS et al., 2008).

Outro aspecto da história de vida dos escorpiões é a capacidade de algumas espécies de reproduzir-se de maneira assexuada. Este tipo de reprodução é denominado partenogênese e caracteriza-se por meio do desenvolvimento de óvulos não fertilizados. Tal fenômeno já foi descrito em mais de 11 espécies, sendo que *Tityus serrulatus* foi a primeira a ser relatada. Geralmente, todos os indivíduos da prole são fêmeas, contudo, a existência de proles derivadas de partenogênese composta de machos também já foi relatado, como exemplo em *Tityus metuendus* (LOURENÇO, 2008).

## **2.2. Escorpionismo**

Uma característica importante ligada a estes animais é a ocorrência de acidentes escorpiônicos, tal quadro ocorre quando os escorpiões se utilizam da peçonha como uma estratégia de defesa em momentos que se sentem ameaçados. Como descrito anteriormente, algumas espécies destes animais ocupam ambientes antropizados e tal proximidade pode acarretar acidentes (LOURENÇO, 2015; PUCCA et al., 2015). Esses acidentes se não tratados

podem ser fatais em alguns casos dependendo da gravidade clínica, sendo um problema de saúde pública negligenciada em países tropicais e subtropicais, onde ocorrem grande diversidade de espécies (ABROUG et al., 2020).

Todos os escorpiões apresentam glândulas produtoras de peçonha, contudo, um número pequeno é responsável pelos acidentes, cerca de 50 espécies. Dos espécimes causadores de acidentes, 95% pertencem a família Buthidae, sendo as exceções membros das famílias Hemiscorpiidae e Scorpionidae (LOURENÇO, 2018). No velho mundo (Europa, Ásia e África) os gêneros *Androctonus*, *Hottentotta*, *Buthus*, *Leiurus*, *Parabuthus*, *Hemiscorpius*, *Mesobuthus*, *Nebo*, *Odontobuthus*, *Orthochirus*, *Compsobuthus*, *Buthacus* e *Apistobuthus* são os gêneros de interesse médico. Em contra partido, no novo mundo (América) apenas dois gêneros são responsáveis pelos acidentes, sendo estes *Centruroides* e *Tityus* (WARD; ELLSWORTH; NYSTROM, 2018).

Anualmente ocorrem cerca de 1.2 milhões de casos de envenenamento e 3.250 mortes causados por escorpiões em todo o mundo. A maior parte desses números ocorrem no Norte do Saara, Oriente Médio, Sul da Índia, México e Brasil (ABROUG et al., 2020). Tal situação pode ser explicada por dois principais fatores: maior diversidade de espécies nessas regiões e pela maior dificuldade do acesso a cuidados médicos após os casos de envenenamento, uma vez que essas regiões condizem em sua maioria com países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. As manifestações clínicas podem variar entre os níveis leve (apenas sintomas locais), moderado (sintomas locais e sistêmicos de baixa intensidade) e grave (sintomas locais e sistêmicos de alta intensidade) (Tabela 1) (CHIPPAUX, 2012)

O nível de gravidade clínica apresentada em cada caso é variável, contudo, é importante salientar a maior incidência de casos graves e óbitos em crianças (provavelmente relacionado a maior concentração de toxinas no sangue devido a menor superfície corporal) e idosos (possivelmente relacionado a diminuição da excreção renal das toxinas e uma diminuição da atividade do sistema imunológico). Além destes, fatores como espécie e tamanho do escorpião, quantidade de peçonha inoculada (ocorrência de picadas “secas”: sem inoculação de peçonha), região do corpo onde ocorreu a picada e sensibilidade do paciente as toxinas presentes na peçonha, provocam grande diversidade nos quadros clínicos descritos nos pacientes (ARAÚJO et al., 2017; HAUKE; HERZIG, 2017; PUCCA et al., 2015)

**Tabela 1.** Níveis clínicos dos acidentes com escorpiões e seus respectivos sintomas

Nível	Sintomas
Leve (grau I)	Dor local (às vezes associada a parestesia local, eritema, equimoses)
Moderado (grau II)	Idem grau I; hipertermia; sintomas cardiovasculares e respiratórios (taquicardia, arritmia, dispneia, hipertensão/hipotensão, anormalidades eletrocardiográficas, priapismo, salivação, sudorese, broncorreia, náuseas, vômito, diarreia, micção); distensão abdominal; cólicas abdominais; doenças neuromusculares (disfunção dos músculos esqueléticos ou cranianos: confusão, agitação, fasciculação, distonia, distúrbios da visão, ptose, movimentos oculares aberrantes); distúrbios biológicos (hiperleucocitose, hiperglicemia, acidose)
Grave (grau III)	Idem grau II; falha multivisceral; sintomas cardiovasculares (insuficiência cardíaca, choque cardiogênico, edema pulmonar); doenças neuromusculares (convulsões, paralisia); distúrbios biológicos (aumentando os biomarcadores de necrose celular, anomalias eletrolíticas)

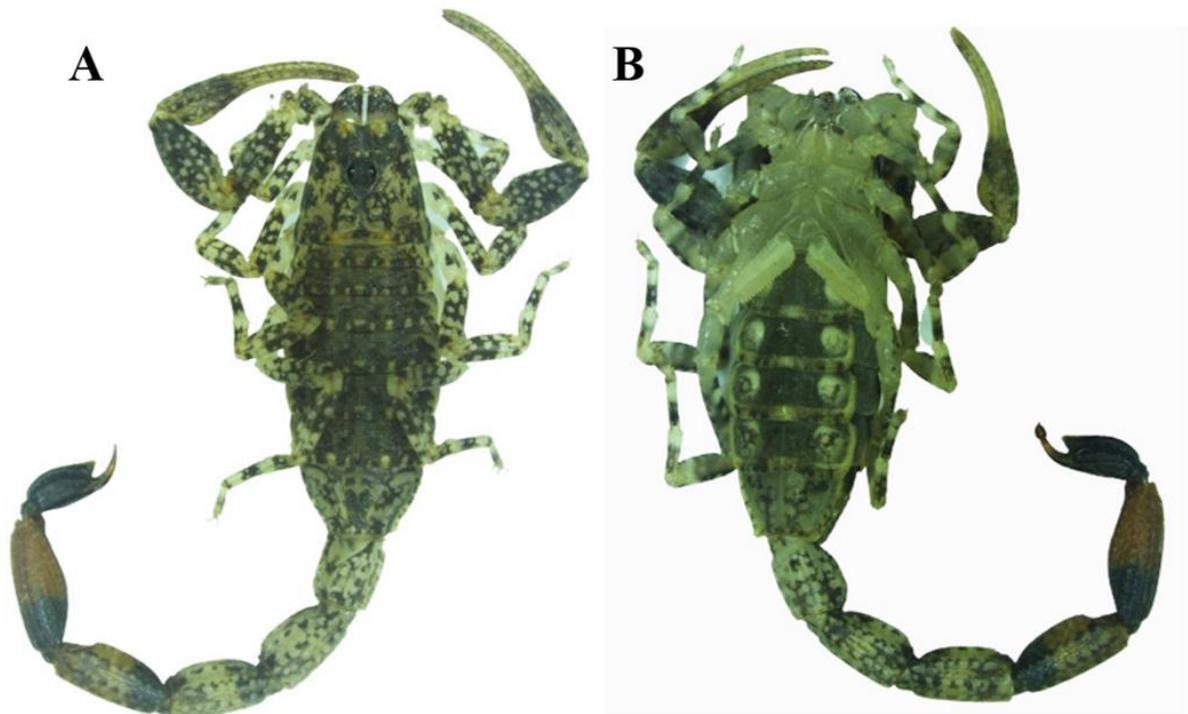
**Fonte:** modificado de CHIPPAUX, 2012

No Brasil, são registradas cerca de 131 espécies de escorpiões, distribuídas em 4 famílias e 22 gêneros, contudo, apenas animais pertencentes ao gênero *Tityus* sp. são responsáveis pela maioria dos acidentes em todo território nacional, sendo cerca de quatro espécies as principais causadoras (BRAZIL; PORTO, 2010). A espécie *Tityus bahiensis* é a principal causadora de acidentes no estado de São Paulo, mas pode também ser encontrado em todo o Sudeste, Sul e parte do Centro-Oeste e Nordeste. *T. stigmurus*, chamado popularmente de escorpião amarelo do Nordeste, ocorre em toda região Nordeste causando diversos acidentes. O escorpião preto da Amazonia, pertence a espécie *T. obscurus* (sinônimo *Tityus paraensis*), é o principal causador de acidentes na região Norte do país, sendo recentemente encontrado também no estado de Mato Grosso. Entretanto, a principal espécie causadora de acidentes em todo país é o *T. serrulatus* (BRASIL, 2009; NENCIONI et al., 2018)

O estado de Mato Grosso do Sul apresenta um número pequeno de espécies de espécies quando comparado aos demais estados do Brasil, no entanto, ainda assim detém metade da diversidade de espécies encontradas na região Centro-Oeste. Existem dezesseis espécies já descritas no estado, porém três dessas carecem de confirmação taxonômica. Essas

espécies estão distribuídas em duas famílias (Bothriuridae e Buthidae) e cinco gêneros (*Bothriurus*; *Brachistosternus*; *Brazilobothriurus*; *Ananteris*; *Tityus*). Entre essas são encontradas *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, conhecidos causadores de acidentes escorpionicos. Há também ocorrência de espécies endêmicas, como *Brazilobothriurus pantanalensis*, *Bothriurus pora* e *Tityus paraguayensis* (CARVALHO et al., 2017).

A espécie *Tityus paraguayensis* (Figura 3) apresenta uma ocorrência restrita ao estado de Mato Grosso do Sul em território brasileiro, podendo ser encontrado também no Paraguai e norte da Argentina. É encontrada principalmente em áreas de Cerrado, embora já haja relatos de sua presença também no Pantanal e Chaco (LOURENÇO, 1992; YAMAZAKI et al., 2015). Esses animais apresentam cerca de 28 a 35 mm de comprimento com pigmentação escura variegada por todo corpo e 2n: entre 16 e 18 cromossomos. Existem também algumas espécies com semelhanças físicas ao *T. paraguayensis*, como o *T. mattogrossensis*, contudo, não ocorrem no estado de Mato Grosso do Sul. (ALMEIDA, 2010; MATTOS et al., 2013). No entanto, ainda são escassas as informações a respeito da espécie *Tityus paraguayensis*, principalmente nos campos toxicológico e bioquímico, indicando uma necessidade de estudos para melhor compreensão deste animal.



**Figura 3.** Fotografias de um escorpião da espécie *Tityus paraguayensis*, A - vista dorsal; B - vista ventral (Fonte: acervo do autor)

Além de representar a maioria dos casos, os acidentes ocasionados por escorpiões da espécie *T. serrulatus* são responsáveis pela maioria dos quadros graves e óbitos no Brasil. Essa espécie foi descrita inicialmente no estado de Minas Gerais, mas devido sua ampla capacidade de viver em ambientes antropizados, associado à sua habilidade de se reproduzir em grande escala por meio da partenogênese (assexuadamente), houve um grande aumento da distribuição desta espécie pelo país, sendo hoje encontrado em 19 dos 27 estados, sobrepondo-se as espécies de escorpiões nativos (CUPO, 2015; TORREZ et al., 2019). Estudos demonstram que essa espécie também é resistente a jejuns prolongados, sobrevivendo até 400 dias sem alimento (PIMENTA et al., 2019).

No Brasil, os acidentes com escorpiões também são um problema de saúde pública negligenciado, tendo nos últimos anos ocorrido uma crescente no número de envenenamentos notificados em todo o Brasil, sendo o mesmo observado no estado de Mato Grosso do Sul em específico (Tabela 2). Isto ocorre, entre outros, pelo crescimento desordenado das grandes cidades sem infraestrutura adequada (saneamento básico, coleta de lixo, entre outros), invadindo áreas florestais e gerando ambientes adequados para a proliferação de espécies sinantrópicas (TORREZ et al., 2019). Além disso, fatores como exposição a lixo, entulhos e falta de saneamento básico aumentam a probabilidade da ocorrência de acidentes, uma vez que algumas espécies de escorpiões, como *T. serrulatus*, estão associadas a esses ambientes (BARBOSA et al., 2003). Também é importante ressaltar que a maioria dos acidentes ocorrem entre os meses de outubro e janeiro, que são em geral os mais quentes e chuvosos do ano (RECKZIEGEL; PINTO JUNIOR, 2014).

Os tratamentos utilizados nos pacientes acometidos nos casos de envenenamento, variam de acordo com a sintomatologia apresentada. Em casos leves com apenas sintomas locais, o tratamento se baseia na administração de medicamentos para mitigação dos sintomas (analgésicos, anestésicos locais, entre outros), acompanhado de uma observação de 6 horas do paciente a fim de avaliar a progressão dos sintomas. Os casos que apresentam sintomas sistêmicos, moderados e graves, a utilização de soros antiescorpiônicos é recomendada, acompanhado se necessário de tratamentos de suporte a vida (ventilação mecânica, drogas vasoativas, entre outras) (CUPO, 2015). No entanto, é importante destacar que o tratamento com soros antiescorpiônicos não apresenta especificidade quanto à espécie do escorpião, uma vez que os soros são polivalentes, sendo obtidos a partir da peçonha apenas dos escorpiões mais prevalentes da região ou até mesmo de uma associação de peçonhas de escorpiões e aranhas (MONTEIRO et al., 2019).

**Tabela 2.** Número de acidentes escorpiônicos notificados anualmente, divididos por região de ocorrência. A tabela também fornece os dados para o estado de Mato Grosso do Sul (MS) em específico. \* Dados de 2020 do Espírito Santo não estão disponíveis neste sistema pois são oriundos do Sistema de Informação e-SUS VS, em uso pelo estado desde janeiro de 2020.

Ano	Região					Total
	Centro-Oeste	Nordeste	Norte	Sudeste	Sul	
2020*	10.249 (MS - 2.892)	62.814	5.457	66.661	4.379	149.563
2019	10.168 (MS - 2.535)	73.367	5.832	73.317	4.389	167.085
2018	8.224 (MS - 2.131)	68.109	4.903	71.769	4.049	157.059
2017	6.244 (MS - 1.587)	56.093	4.352	54.441	3.012	124.142
2016	4.534 (MS - 1.002)	39.267	3.214	41.769	2.225	91.009
2015	3.946 (MS - 1.100)	38.104	3.619	37.757	2.482	85.908

**Fonte:** dados extraídos da plataforma SINAN - Ministério da Saúde

### 2.3. Toxinas animais

A síntese de moléculas biologicamente ativas para defesa e/ou predação é observada em um grande número de táxons, e entre essas um que tem chamado atenção devido ao seu potencial farmacológico e biotecnológico são as toxinas animais (COLE; BREWER, 2019). Estima-se que a produção de toxinas nos Metazoários surgiu cerca de 101 vezes independentemente em pelos menos 8 filos diferentes, a partir de moléculas não tóxicas. Mesmo que as principais funções das toxinas animais se concentrem na defesa e/ou predação, sabe-se que essas moléculas podem estar envolvidas também em outros processos, como acasalamento, competição intraespecífica e dispersão de prole (SCHENDEL et al., 2019). Dada tal diversidade funcional e distribuição, é provável que a produção de toxinas esteja relacionada com os processos evolutivos e biogeográficos de determinados grupos animais (ARBUCKLE, 2021)

As toxinas animais são misturas complexas de moléculas, compostas em sua grande maioria de proteínas (enzimáticas e/ou não) e peptídeos, contudo, também podem apresentar

outros componentes, podendo haver centenas de diferentes componentes na toxina de um mesmo animal. Essas moléculas são produzidas em glândulas específicas distribuídas pelo corpo dos indivíduos, espécies (exemplos: escorpiões, serpentes) que apresentam órgãos para inoculação de peçonha são denominados peçonhentos, enquanto espécies (exemplos: sapos, salamandras) que não apresentam órgãos inoculadores são chamados apenas de venenosos (UTKIN, 2015). Também é importante destacar que algumas espécies desenvolveram capacidade de modular quantitativamente e qualitativamente as toxinas liberadas, utilizando estratégias específicas para cada situação (SCHENDEL et al., 2019). Isso ocorre devido ao alto gasto energético desempenhado na síntese dos componentes de toxinas, favorecendo estratégias como picadas “secas” (picadas sem inoculação de toxinas) e *prevenon* (inoculação de outras substâncias não tóxicas), utilizadas por algumas espécies de escorpiões para minimizar o gasto de toxinas (EVANS et al., 2019).

Como já citado, a diversidade molecular e funcional dos venenos e/ou peçonhas animais tem estimulado as pesquisas que buscam caracterizar essas moléculas e aplicá-las, tal fato também é favorecido pelo crescente aprimoramento das técnicas “ômicas” empregadas nesses trabalhos (WALKER et al., 2020). Já existem diversos fármacos no mercado derivados de toxinas animais e ainda uma série de outros em desenvolvimento, como exemplos temos o Aggrestat® (tirofiban) e Integrilin® (eptifibatide) ambos são fármacos inibidores da agregação plaquetária derivados da equistatina, molécula sintetizada por algumas espécies de serpentes. Outro exemplo é o Prialt® (ziconotida), fármaco utilizado no tratamento de dores crônicas, produzido a partir de estudos das toxinas sintetizadas por caracóis-cone (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018).

Além destes, outro exemplo é o Captopril®, medicamento utilizado no tratamento de hipertensão. Este medicamento teve como ponto de partida, os estudos realizados pelo farmacologista brasileiro Sérgio Henrique Ferreira, que identificou na peçonha de *Bothrops jararaca* um peptídeo que inibe a enzima conversora de angiotensina (ECA), que converte angiotensina I (inativa) em angiotensina II (ativa) e degrada a bradicinina, a qual é responsável pela diminuição da pressão arterial. Esse peptídeo foi chamado de (BPF), e a partir de estudos moleculares de sua estrutura foi possível o desenvolvimento do fármaco Captopril®, sendo um dos principais medicamentos utilizados no tratamento de hipertensão (MACÊDO, 2011).

As peçonhas de escorpiões apresentam também uma grande diversidade química, podendo variar entre as diferentes espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie,

além disso características ambientais e sazonais também podem influenciar em suas composições (CORDEIRO et al., 2015). Em linhas gerais, seus componentes podem ser divididos em dois grupos, moléculas não proteicas (que inclui entre outros muco, polissacarídeos, lipídeos, nucleotídeos, sais inorgânicos, metais, entre outros) e moléculas proteicas (peptídeos, enzimas e proteínas não enzimáticas) (AKBAR et al., 2021). Entre essas, os peptídeos e enzimas representam as classes mais amplamente estudadas, sendo abordadas em detalhe nos próximos tópicos. Em um trabalho recente com o escorpião mexicano *Megacormus gertschi* foi identificado também a presença de um alcaloide, uma classe de moléculas até então desconhecida nas peçonhas de escorpiões (BANERJEE et al., 2018).

## **2.4. Escorpiões: peptídeos**

Os peptídeos representam cerca de 5% do peso seco das peçonhas escorpiônicas, que podem conter diversos peptídeos diferentes. Estes podem ser classificados de diferentes formas, podendo ser considerado sua estrutura, locais-alvo, importância farmacológica, entre outros (HMED; SERRIA; MOUNIR, 2013). Um modelo de classificação estrutural amplamente utilizado é o agrupamento dos peptídeos em duas grandes classes: peptídeos com pontes dissulfeto (*disulfide-bridged peptides*: DBPs) e peptídeos sem pontes dissulfeto (*non-disulfide-bridged peptides*: NDBPs) (ZENG; CORZO; HAHN, 2005). Sendo já identificados aproximadamente 3000 peptídeos DBPs e 200 peptídeos NDBPs, estima-se que esse número represente menos de 2% do total de peptídeos presentes nas peçonhas escorpiônicas (ZHONG et al., 2017).

### **2.4.1. Peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs)**

Essa classe de peptídeos apresenta muitas moléculas já identificadas e caracterizadas na literatura, sendo que comumente contêm entre três e cinco pontes dissulfeto e entre 28-120 resíduos de aminoácidos (ZHONG et al., 2017), enovelam-se por um domínio  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteína, sendo portanto uma alfa-hélice ligada a duas ou mais folhas-betas por pontes dissulfeto (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; VIDAL; POSSANI, 2013). Estes peptídeos são caracterizados, em sua maioria, por alterarem o funcionamento dos canais iônicos, sendo relacionados com os efeitos neurotóxicos observados nos acidentes escorpiônicos (BHAVYA et al., 2016), podendo afetar mamíferos, insetos e crustáceos (ZHONG et al., 2017).

Os canais iônicos são complexos proteicos transmembrana formadores de poros, responsáveis pelo controle da passagem de íons pelas membranas biológicas, atuando na manutenção de diversos processos fisiológicos, como controle da excitabilidade das células neuronais, musculares e cardíacas, sinalização celular, proliferação celular, transporte transepitelial, entre outros (HUANG et al., 2017; ZHENG et al., 2021). Os canais iônicos por sua vez apresentam uma grande diversidade estrutural e funcional, sendo descrito cerca de 400 genes de canais iônicos diferentes, dos quais muitos podem realizar *splicing* alternativo em diferentes tecidos, aumentando ainda mais sua diversidade (STRICKLAND et al., 2019).

De acordo com controle da abertura e fechamento destes canais, pode-se classifica-los em: canais voltagem dependentes (realizam a abertura/fechamento a depender do potencial de membrana), canais dependentes de ligante (realizam a abertura/fechamento a depender de um ligante específico) e canais mecanicamente sensíveis (realizam a abertura/fechamento a depender do estiramento da membrana a qual está inserido) (BOSE; CIEŠLAR-POBUDA; WIECHEC, 2015). Os canais iônicos também apresentam uma especificidade aos íons que transportam, havendo canais específicos para sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (DEHGHANI-SAMANI; MADRESEH-GHAHFAROKHI; DEHGHANI-SAMANI, 2019).

Dada tal especificidade quanto ao alvo molecular dos peptídeos deste grupo, tipicamente eles são subclassificados de acordo com o tipo de canal iônico com o qual interagem, portanto, esses podem ser peptídeos moduladores de canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (HOUSLEY et al., 2017; MOUHAT et al., 2004):

#### **a) Peptídeos moduladores de canais de sódio ( $\text{Na}^+$ )**

Os peptídeos pertencentes a esse grupo apresentam entre 58 e 76 resíduos de aminoácidos com massa entre 6.5 e 8.5 kDa, tendo como núcleo de sua estrutura tridimensional três pontes dissulfeto. Esses peptídeos podem ser classificados de acordo com seus efeitos fisiológicos e sítios de ligação ao canal, sendo que as alfa-toxinas ( $\alpha$ -NaScTx) se ligam ao receptor 3 impedido o processo de inativação do canal, e as beta-toxinas ( $\beta$ -NaScTx) se ligam ao receptor 4 alterando o limiar de ativação do canal (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2007).

Esses dois tipos de toxinas também podem ser subdivididos. As alfa-toxinas em outras 3 classificações: 1- toxinas clássicas alfa (seletiva para mamíferos); 2 - toxinas anti-insetos (seletiva para insetos); 3 - toxinas semelhantes a alfa (atua em mamíferos e insetos)

(GORDON et al., 2007). Já as beta-toxinas são divididas em outros 4 grupos: 1 - beta-toxinas anti-mamíferos (encontradas apenas no gênero *Centruroides*); 2 - beta-toxina ativas em mamíferos e insetos; 3 - beta-toxinas excitatórias seletivas a insetos; 4 - beta-toxinas depressoras seletivas a inseto (ESCALONA; POSSANI, 2013)

Existem muitos peptídeos descritos neste grupo, como exemplos temos o peptídeo Tf2 isolado na peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*, que se trata de uma beta-toxina com seletividade a mamíferos e insetos (CAMARGOS et al., 2015). Os peptídeos MeuNaTx $\alpha$ -4 e MeuNaTx $\alpha$ -5 são alfa-toxinas, sendo MeuNaTx $\alpha$ -4 direcionado a insetos e MeuNaTx $\alpha$ -5 a mamíferos, ambos foram identificados em escorpiões da espécie *Mesobuthus eupeus* (ZHU et al., 2012). Além destes a beta-toxina Cn8, formada por 67 resíduos de aminoácidos, apresenta quatro pontes dissulfeto e massa molecular de 7626 Da, foi caracterizada na peçonha do escorpião *Centruroides noxius*, apresentando atividade contra canais de mamíferos (SCHIAVON et al., 2012).

#### **b) Peptídeos moduladores de canais de potássio (K<sup>+</sup>)**

Os peptídeos moduladores de canais de potássio têm de 23 a mais de 64 resíduos de aminoácidos (BERGERON; BINGHAM, 2012). Existem duas conformações estruturais, que apresentam cistina estabilizada (CS), comuns encontradas nesses peptídeos, o motivo CS $\alpha\beta$  formado por uma ou duas hélices  $\alpha$  curtas conectadas a uma folha  $\beta$  antiparalela de fita tripla estabilizada por três ou quatro ligações dissulfeto, e o motivo CS $\alpha\alpha$  formado por duas hélices  $\alpha$  curtas conectadas por uma volta  $\beta$  (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Suas subclassificações se baseiam na sequência de resíduos de aminoácidos e no emparelhamento de cisteínas, formando quatro famílias de peptídeos: família  $\alpha$ -KTx, família  $\beta$ -KTx, família  $\gamma$ -KTx e família  $\kappa$ -KTx (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015).

A família  $\alpha$ -KTx apresenta mais representantes entre as toxinas moduladoras de canais de potássio, podendo ainda ser classificada em outras 30 subfamílias de acordo com sua sequência (DIEGO-GARCÍA et al., 2013), tendo entre 23 e 42 resíduos de aminoácidos, com três ou quatro pontes dissulfeto e motivo CS $\alpha\beta$  (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; VIDAL; POSSANI, 2013). A família  $\beta$ -KTx apresenta cadeias mais longas com 50 a 75 resíduos de aminoácidos, podendo também ser divididas em subfamílias. Os peptídeos da família  $\gamma$ -KTx também são chamados de ergtoxinas, devido a sua capacidade de bloquear os canais do tipo canais ERG-K<sup>+</sup>, apresentam em média 42 a 47 resíduos de aminoácidos e quatro pontes

dissulfeto. Por fim, as toxinas da família  $\kappa$ -KTx tem cerca de 23 resíduos de aminoácido, sendo a única família a ter o motivo CS $\alpha\alpha$  (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015).

O primeiro peptídeo modulador de canais de potássio foi descrito em 1982, pertencente à família  $\alpha$ -KTx e recebeu o nome de noxiustoxina (NTX), tendo sido isolado do escorpião mexicano *Centruroides noxius* (SITGES; POSSANI; BAYON, 1986). Um exemplo de toxina da família  $\kappa$ -KTx é o peptídeo kappa-KTx 2.5 encontrado em escorpiões da espécie *Opisthacanthus cayaporum* (CAMARGOS et al., 2011). Além destes, o peptídeo Bs-KTx6 isolado da peçonha de *Buthus indicus*, apresentou alta atividade neurotóxica contra canais de potássio, tendo em sua estrutura 38 resíduos de aminoácidos, com 3 pontes dissulfeto e massa de 4115 Da (ALI et al., 2014). Já foram identificados esses peptídeos também na peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, como por exemplo Ts6 e Ts7, tendo Ts6 apresentado atividade contra 3 tipos de canais de potássio em baixas concentrações, e Ts7 que modula múltiplos canais, mostrando assim baixa seletividade (CERNI et al., 2014).

### c) Peptídeos moduladores de canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>)

A maioria dos peptídeos descritos nesse grupo afetam canais de cálcio dependentes de ligante, uma classe bem conhecida desses canais são os receptores de rianodina (RyRs), cuja ativação é mediada por rianodina. Esses canais apresentam diversas isoformas distribuídas pelos tecidos, como o RyR1 encontrado predominantemente no músculo esquelético e RyR2 em músculo cardíaco. Além desses, RyR3 está localizado no músculo liso, cérebro e nas células epiteliais, contudo, outros canais desta classe também podem ser encontrados nesses tecidos em menor quantidade (MACKRILL, 2002).

Os peptídeos deste grupo podem ser chamados também de calcinas, sendo capazes de modular a afinidade entre rianodina e os canais de cálcio dependentes de ligante, essas moléculas têm comumente massa entre 3758 Da e 4190 Da (XIAO et al., 2016). Citando alguns exemplos já descritos em peçonhas de escorpiões, temos a imperatoxina A (IpTxa), maurocalcina (Mca), hadrucalcina (HdCa), hemicalcina (Hca), entre outros (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Outra característica interessante desses peptídeos é que devido a sua estrutura molecular e caráter básico apresentam capacidade de atravessar a membrana celular, constituindo moléculas promissoras para estudos como transportadores de fármacos através da membrana (GURROLA et al., 2010).

#### **d) Peptídeos moduladores de canais de cloro (Cl<sup>-</sup>)**

As toxina moduladoras de canais de cloro são peptídeos curtos de 30 a 40 resíduos de aminoácidos com quatro pontes de dissulfeto e motivo estrutural CSαβ, semelhante as toxinas moduladoras de canais de potássio (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015). A primeira toxina desta classe identificada na peçonha de um escorpião, foi encontrada na espécie *Leiurus quinquestriatus*, sendo um peptídeo pequeno de caráter básico, massa de 4 kDa e quatro pontes de dissulfeto, denominado clorotoxina, que apresenta grande similaridade com as insetotoxinas, classe de pequenos peptídeos capazes de causar letalidade aos insetos (DEBIN; MAGGIO; STRICHARTZ, 1993). A partir deste, outras clorotoxinas foram identificadas, como por exemplo, o peptídeo AaCtx em *Androctonus australis*, que contém 34 resíduos de aminoácidos, sendo 8 cisteínas e massa teórica de 3590 Da (RJEIBI et al., 2011). Outra clorotoxina identificada é o BS-TX7, um peptídeo isolado de escorpiões da espécie *Buthus indicus*, com 35 resíduos de aminoácidos e massa de 3821 Da (ALI et al., 2016).

#### **e) Outros DBPs**

Contudo, ainda neste grupo existem alguns outros peptídeos com pontes dissulfeto que não modulam exclusivamente canais iônicos, sendo que estes também podem desempenhar atividade antimicrobiana (CARBALLAR-LEJARAZÚ et al., 2008), funcionar como defensinas (ROMERO-GUTIERREZ et al., 2017), inibidores de proteases (RANASINGHE; MCMANUS, 2013), entre outras. Citando um exemplo, o peptídeo SdPI identificado a partir do transcriptoma das glândulas de peçonha de escorpiões da espécie *Lychas mucronatus*, era até então o primeiro peptídeo inibidor de tripsina identificado em peçonhas de escorpiões (ZHAO et al., 2011). Além deste, o peptídeo *scorpine* isolado da peçonha do escorpião *Pandinus imperator* apresenta potente atividade antibacteriana e antimalárica, contendo 75 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e massa molecular de 8350 Da (CONDE; ZAMUDIO; RODR, 2000).

#### **2.4.2. Peptídeos sem pontes de dissulfeto (NDBPs)**

Esta classe de moléculas em contrapartida aos DBPs, dispõe de um grupo muito maior de funcionalidades e alvos moleculares, sendo que esses podem representar até um terço dos peptídeos presentes nas peçonhas escorpiônicas (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; POSSANI, 2015). Esses peptídeos têm entre 13 e 56 resíduos de aminoácidos, a maioria são catiônicos e

hidrofóbicos, quanto ao seu enovelamento exibe, com exceções, uma estrutura anfipática  $\alpha$ -helicoidal catiônica (AKBAR et al., 2021; ROMERO-GUTIERREZ et al., 2017). É possível enquadrar esses peptídeos em três grupos de acordo com a organização de suas  $\alpha$ -hélices: no primeiro, é observado a formação de um único domínio de  $\alpha$ -hélice e duas regiões enroladas aleatoriamente na extremidades da cadeia; no segundo, é encontrado duas regiões alfa-helicoidais separadas no meio por uma região enrolada aleatória; já o terceiro caracteriza-se por ter 100% de sua estrutura em  $\alpha$ -hélice (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014).

Como já dito, este grupo de moléculas tem uma grande diversidade multifuncional, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antimalárico, anticâncer, potencializador da bradicinina, imunomodulador, entre outros (ORTIZ et al., 2015). Visto isso, esses peptídeos são comumente classificados de acordo com a atividade biológica que desempenham (ROMERO-GUTIERREZ et al., 2017), e alguns dessas serão melhor explorados a seguir.

#### **a) Peptídeos antimicrobianos (AMPs)**

Os peptídeos com atividade antimicrobiana são encontrados em muitos táxons diferentes, são geralmente catiônicos, anfipáticos e sem cisteína, podendo desempenhar sua atividade por diferentes mecanismos (BAHAR; REN, 2013; HMED; SERRIA; MOUNIR, 2013). Entre seus mecanismos de ação, esses peptídeos podem ser classificados em dois grupos: disruptivos da membrana e não disruptivos da membrana. Os peptídeos disruptivos de membrana geralmente interagem com a membrana plasmática alterando a permeabilidade da bicamada fosfolipídica e ocasionando a morte celular. Já peptídeos não disruptivos da membrana, atravessam a membrana plasmática e interagem com macromoléculas do interior da célula levando também a morte celular (HUANG; HUANG; CHEN, 2010).

Nos escorpiões, já foram identificados diversos peptídeos deste grupo, sendo a parabutoporina (*Parabuthus schlechteri*) e hadrurina (*Hadrurus aztecus*), os primeiros peptídeos deste tipo descritos (ELGAR; DU PLESSIS; DU PLESSIS, 2006). O peptídeo VmCT1 foi sintetizado a partir do transcriptoma do escorpião *Vaejovis mexicanus*, e em estudos mostrou atividade contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tendo uma baixa atividade hemolítica (RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012). Citando outro exemplo, as toxinas meucina-13 e meucina-18 encontradas nos escorpiões *Mesobuthus eupeus*, também apresentaram atividade deletéria contra uma série de espécies bacterianas, sendo que meucina-18 teve resultados maiores entre os avaliados (GAO et al., 2009).

## **b) Peptídeos antitumorais**

A busca por compostos citotóxicos seletivos no combate ao câncer continua sendo uma grande necessidade, visto os altos índices de mortalidade (SIEGEL et al., 2021). Essa doença se caracteriza pelo crescimento anormal das células, devido a alguma mutação genética ocorrida (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Devido à necessidade da criação de novos fármacos seletivos para células tumorais, os metabólitos naturais têm se mostrado promissores nesta busca (DUEÑAS-CUELLAR et al., 2020). Um exemplo de composto com tal atividade foi isolado na peçonha de escorpiões da espécie *Androctonus mauritanicus*, é o peptídeo mauriporina, o qual apresentou atividade antiproliferativa e citotóxica seletiva contra três linhagens de câncer de próstata (ALMAAYTAH et al., 2013).

Outro peptídeo com interesse farmacológico foi isolado da peçonha de *Tityus serrulatus*. O CPP-Ts é um peptídeo composto por 68 resíduos de aminoácidos, capaz de atravessar a membrana celular, constituindo um possível sistema de administração de medicamentos. Além disso, após algumas modificações moleculares, o peptídeo apresentou seletividade, sendo internalizado apenas pelas células tumorais e perdendo sua toxicidade contra células saudáveis, tais características indicam o potencial quimioterápico desta molécula (OLIVEIRA-MENDES et al., 2018).

## **c) Peptídeos potencializadores de bradicinina**

A bradicinina é um peptídeo vasoativo envolvido no controle da pressão arterial, através do aumento da vasodilatação e da permeabilidade capilar levando a uma diminuição da pressão arterial. Por outro lado, a enzima conversora da angiotensina (ECA) realiza a inativação proteolítica da bradicinina, contribuindo para o aumento da pressão arterial. Uma série de peptídeos inibidores da ECA já foram bioprospectados, os chamados potencializadores de bradicinina (CAMARGO et al., 2012). Em escorpiões, a primeira toxina a apresentar essa atividade foi o peptídeo T de 13 resíduos de aminoácidos, encontrado na peçonha de escorpiões da espécie *Tityus serrulatus* (FERREIRA; ALVES; HENRIQUES, 1993). Posteriormente, o peptídeo K12 com 21 resíduos de aminoácidos foi isolado na peçonha de *Buthus occitanus* apresentando atividade potencializadora de bradicinina (MEKI; NASSAR; ROCHAT, 1995). Alguns peptídeos têm atividade multifuncional, como o peptídeo BmKbpp (*Mesobuthus martensi*) que apresenta atividade antimicrobiana, hemolítica e potencializadora de bradicinina (ZENG et al., 2012).

#### **d) Peptídeos antiprotozoários**

As enfermidades causadas por protozoários, como Doenças de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e malária (*Plasmodium* spp.), são consideradas doenças negligenciadas que afetam principalmente países tropicais resultando em alta mortalidade (VARIKUTI et al., 2018). Foi identificado a partir do transcriptoma da peçonha de escorpiões da espécie *Mesobuthus eupeus*, os peptídeos meucina-24 e meucina-25, ambos apresentaram atividade inibitória no desenvolvimento de *Plasmodium berghei* e causaram a morte de *Plasmodium falciparum* no interior das hemácias, além de não ser observado atividade hemolítica (GAO et al., 2010). Recentemente, na peçonha de *Tityus serrulatus* foi identificada atividade da peçonha bruta e algumas frações isoladas contra *Trypanosoma cruzi*, e que tal atividade está relacionada à sinalização nas células hospedeiras (PIMENTEL et al., 2021).

#### **2.5. Escorpiões: enzimas**

As peçonhas escorpiônicas apresentam também uma variedade de enzimas descritas, que contribuem também em sua toxicidade (FURTADO et al., 2020). As principais enzimas já encontradas nas peçonhas de escorpiões são: serino proteases, metaloproteases, cisteíno proteases, fosfolipases, hialuronidases, entre outras. Análises tem mostrado que os gêneros *Tityus*, *Centruroides*, *Megacormus*, *Thorellius*, *Serradigitus*, *Heterometrus* e *Hemiscorpius* apresentam uma maior diversidade enzimática entre os escorpiões (CID-URIBE et al., 2020).

As serino proteases, metaloproteases e cisteíno proteases são enzimas proteolíticas, hidrolisando ligações peptídicas. As serino protease recebem essa denominação devido a presença de um resíduo de serina central em sua estrutura que atua como sítio catalítico de clivagem (HEDSTROM, 2002), e um exemplo são as serino proteases identificadas na peçonha de *Tityus discrepans* com atividade fibrinogenolítica (BRAZÓN et al., 2014). A família das metaloproteases apresentam diversas classes, contudo, sua principal característica é a necessidade de um cofator metálico para que auxilie a clivagem, em sua maioria um átomo de zinco (NOSRATI et al., 2019). Estudos já demonstraram que essas enzimas atuam clivando proteínas importantes para homeostase da vítima nos acidentes escorpiônicos, exemplo disso é a anterase encontrado na peçonha de *T. serrulatus* que cliva as proteínas de membrana associadas a vesículas da família SNARE, interrompendo o transporte das vesículas e ocasionado a pancreatite (FLETCHER et al., 2010; ORTIZ et al., 2014). Várias metaloproteases já foram descritas nas peçonhas de escorpiões inclusive na espécie

*Centruroides tecomanus* (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2013). Por fim, as cisteíno proteases mostram a mesma característica das serino proteases, porém, apresentando uma cisteína em seu sítio catalítico (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016), e essas já foram relatadas em *T. bahiensis*, *T. serrulatus*, *T. obscurus* e *H. spadix* (CID-URIBE et al., 2020).

Enzimas fosfolipásicas realizam hidrólise de fosfolipídios, sendo a região de clivagem da molécula responsável pela classificação das diferentes famílias desta enzima, havendo famílias A, B, C e D, além de suas respectivas subfamílias. Algumas fosfolipases necessitam de um cofator para seu funcionamento, sendo essa também uma característica importante em sua classificação (ALOULOU et al., 2012). Em acidentes escorpiônicos os efeitos locais e sistêmicos ocasionados pelas fosfolipases ainda não foram devidamente descritos, contudo, já se sabe que essas enzimas podem estar envolvidas com efeitos cardiotoxícos, miotóxicos, inflamatório, entre outros (KRAYEM; GARGOURI, 2020). Exemplos destas enzimas podem ser encontradas na espécie *Scorpio maurus*, onde foi identificada uma fosfolipase da família A<sub>2</sub>, e em *Hemiscorpius lepturus* que apresenta uma fosfolipase da família D (LOUATI et al., 2013; MOEZ et al., 2020).

O ácido hialurônico é o principal substrato das hialuronidases, sendo este um importante componente das matrizes extracelulares. Quando essas enzimas realizam a degradação do ácido hialurônico aumentam a permeabilidade dos tecidos, permitindo a difusão de substâncias (GIRISH et al., 2009). Nas peçonhas, essa é uma característica muito desejada, pois permite uma maior distribuição da toxina, sendo encontrada em escorpiões da espécie *Buthus martensi* e *Tityus serrulatus* (FENG; GAO; GOPALAKRISHNAKONE, 2008; HORTA et al., 2014). Além dessas, existem também outras classes de enzimas encontradas com menor frequência em peçonhas de escorpiões, como lipases e nucleotidasas (CID-URIBE et al., 2020). Por outro lado, enzimas comumente encontradas em peçonhas e venenos animais, como L-aminoácido oxidases, ainda não foram identificadas em peçonhas escorpiônicas (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019).

## **2.6. Hemolinfa de escorpiões**

Os escorpiões apresentam três componentes principais em seu sistema circulatório: sistema vascular, sistema lacunar e a hemolinfa. O sistema vascular é composto por uma estrutura central de bombeamento (análogo ao coração) e por vasos que se ramificam pelos tecidos transportando hemolinfa. O sistema lacunar por sua vez é composto por espaços livres

entre os órgãos, denominados seios e lacunas, estando delimitados por uma membrana e não conectados estruturalmente ao sistema vascular. (KLUSSMANN-FRICKE; PRENDINI; WIRKNER, 2012).

A hemolinfa é um fluido circulatório encontrado em vários táxons de invertebrados, e nesses cumpre os papéis realizados pelo sangue e linfa em mamíferos. Entre suas funções estão o transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios, catabólitos e células do sistema imunológico (hemócitos). Assim sendo, o termo hemolinfa compreende os hemócitos e as substâncias intercelulares líquidas, tendo a denominação correta soro da hemolinfa, contudo, pode ser encontrada descrita vulgarmente como plasma. A proteína responsável pelo transporte de oxigênio na hemolinfa é a hemocianina, e diferente da hemoglobina, está livre no soro de hemolinfa, sendo uma proteína de alta massa molecular associada a íons de cobre (GIANAZZA et al., 2021).

Já foram descritos uma serie de peptídeos antimicrobianos (AMPs) da classe das defensinas e peptídeos moduladores de canais iônicos nas hemolinfas de escorpiões (EHRET-SABATIER et al., 1996; MENG et al., 2020). Recentemente, foi descrita a serrulina, um peptídeo de 3564 Da e 37 resíduos de aminoácidos (rico em glicina), encontrada nos hemócitos do escorpião amarelo *Tityus serrulatus*, apresentando atividade contra cepas bacterianas (DE JESUS OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA JUNIOR, 2019). Alguns estudos apontam a hemolinfa como uma promissora fonte para bioprospecção de moléculas de interesse farmacológico e/ou biotecnológico (HMED; SERRIA; MOUNIR, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Caracterizar bioquímica e biologicamente a peçonha e a hemolinfa de escorpiões da espécie *Tityus paraguayensis*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Obter perfil eletroforético da peçonha e hemolinfa de *T. paraguayensis*.
- Detectar a presença de atividades proteolíticas, fosfolipásicas A<sub>2</sub> e lipolítica na peçonha e hemolinfa de *T. paraguayensis*.
- Identificar atividade antitriptica da peçonha e hemolinfa de *T. paraguayensis*.
- Analisar atividade antitripanossômica da peçonha de *T. paraguayensis*.
- Avaliar a citotoxicidade da peçonha de *T. paraguayensis* sobre culturas celulares normais.
- Verificar o efeito da peçonha e hemolinfa de *T. paraguayensis* sobre a enzima de membrana (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) – ATPase.
- Obter o perfil cromatográfico dos componentes presentes na peçonha de *T. paraguayensis*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

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

### 4.2. Extração

As extrações de peçonha foram realizadas semanalmente por meio de um estímulo elétrico (12 V) aplicado diretamente sobre o telson de cada indivíduo, junto ao acoplamento de um capilar de vidro ao agulhão do animal para sucção da peçonha expelida, que posteriormente foi depositada em microtubos de 500 µL. A peçonha extraída foi diluída em 500 µL de água destilada e centrifugada a  $10.500 \times g$  por 10 minutos a 4 °C para retirada de materiais insolúveis. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, liofilizado e armazenado a -20°C até o momento dos ensaios.

A hemolinfa foi coletada por meio de punção na região do mesossoma com agulha hipodérmica (diâmetro: 0,30 mm) e em seguida depositada em microtubos de 1 mL, contendo tampão fosfato (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM). Posteriormente, foi feita a separação do plasma (soro de hemolinfa) e hemócitos. Para este fim, a hemolinfa foi centrifugada a  $800 \times g$  por 15 minutos a 4°C, em seguida as frações foram transferidas para novos microtubos com o auxílio de uma micropipeta (pellet: hemócitos; sobrenadante: plasma) e armazenado a -20°C até o momento dos ensaios.

### 4.3. Dosagem de proteínas

As amostras foram ressuspensas (peçonha) ou diluídas (plasma e hemócitos) em água destilada e quantificadas pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina bovina como padrão, em uma leitora de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devices®) a 595 nm. A concentração das amostras foi ajustada a 1 mg/mL de proteínas para utilização nos ensaios.

### 4.4. Eletroforese (SDS-PAGE)

Para conhecer o perfil proteico da peçonha e hemolinfa de *Tityus paraguayensis*, foi utilizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS), sendo o gel de empilhamento 5% e de corrida 15%. Foram utilizados para preparação dos géis as seguintes soluções: acrilamida 30% (bis-acrilamida/acrilamida), Tris-HCl (gel 15%: 3 M pH 8,9; gel 5%: 1,5 M pH 6,8), SDS 1%, tetrametiletilenodiamina (TEMED), persulfato de amônia 10% e água destilada, como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). O tampão de corrida com pH 8,3, continha Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%. As amostras foram preparadas em condições redutoras, com 20 µL de peçonha ou hemolinfa (1 mg/mL), 20 µL de SDS 10%, 4 µL de azul de bromofenol e 2 µL de β-mercaptoetanol. A corrida eletroforética foi realizada por 2 horas e 30 minutos a 100 V para a peçonha e por 3 horas e 30 minutos a 100 V para hemolinfa. Posteriormente, o gel foi corado por 30 minutos em uma solução de azul brilhante de Coomassie R-250 (Coomassie 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%) e descorado em uma solução descorante (ácido acético 10%; etanol 30%) para revelação das bandas. As massas moleculares das proteínas foram estimadas de acordo com as bandas obtidas com um marcador de massa molecular (Precision Plus Protein Standards – BioRad®).

Adicionalmente, também foi realizado uma eletroforese para proteínas de baixa massa molecular, que objetiva de visualizar os componentes de menor massa molecular. Foi utilizado um gel de empilhamento 5% e de corrida 16,5%, feitos com as seguintes soluções: acrilamida 49,5% (bis-acrilamida/acrilamida), Tris 2 M pH 8,45 (SDS 0,3%), glicerol, tetrametiletilenodiamina (TEMED), persulfato de amônia 20% e água destilada, como descrito por (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). Foi utilizado um tampão ânodo pH 8,9 (Tris 0,2 M) e um tampão cátodo pH 8,25 (Tris 0,1 M; Tricina 0,1 M; SDS 0,1%). A corrida

eletroforética foi realizada por 5 horas a 85 V. As amostras, coloração e descoloração foram realizadas nas mesmas condições da eletroforese anteriormente descrita.

#### **4.5. Atividade proteolítica**

A atividade proteolítica (gelatinolítica) foi determinada por meio de um zimograma. Uma corrida eletroforética foi realizada com amostras em condições não redutoras, logo sem adição de  $\beta$ -mercaptoetanol. Um SDS-PAGE com gel de empilhamento 5% e de corrida 12% foi preparado nas mesmas condições mencionadas no tópico 4.4 para o protocolo Laemmli (LAEMMLI, 1970), contudo, com a adição de 0,25 mg/ml de gelatina ao gel de corrida. Após a eletroforese, o gel foi lavado por uma hora em solução de Triton X-100 1% e posteriormente incubado a 37°C por 24 horas em um tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Por fim, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 (Coomassie 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%) e descorado em uma solução descorante (ácido acético 10%; etanol 30%), para observação das bandas de degradação (DÍAZ et al., 2019).

#### **4.6. Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>**

Para determinação da atividade fosfolipásica foi utilizado o protocolo de Magalhães (MAGALHÃES, 2017). Uma solução de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) contendo gema de ovo a uma concentração de 2 mg/mL de proteínas foi utilizado como sistema e substrato, respectivamente, para a detecção da atividade enzimática. Para diferenciação de fosfolipases cálcio dependentes, a mesma solução também foi preparada com  $\text{CaCl}_2$  25 mM. Nos ensaios, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução tampão, em poços de microplacas de 96 poços, e 20  $\mu\text{L}$  de amostra (1 mg/mL) ou água destilada (branco), sendo todos feitos em triplicadas. As microplacas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e em seguida a absorvância foi analisada a 925 nm em uma leitora de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devices®). A presença de fosfolipases foi detectada para amostras que causassem um decréscimo de 0,01 unidades de absorvância, sendo que esse decréscimo foi definido como uma unidade enzimática.

#### 4.7. Atividade lipolítica

A presença de atividade lipolítica foi determinada através do monitoramento da formação de *p*-nitrofenol, derivado da hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil palmitato. Para os experimentos duas soluções foram misturadas 10 minutos antes do início dos ensaios para produção do meio reacional, na proporção 9:1, sendo essas - Solução I: Goma arábica (0,05 g); tampão fosfato-citrato pH 6,0 (90 mL); Triton X-100 (250 µL); e Solução II: *p*-nitrofenil palmitato (0,03 g); isopropanol (10 mL). Uma mistura de 450 µL do meio reacional e 50 µL de amostra (1 mg/mL) ou água destilada (branco) foram incubados em microtubos por 5 minutos a 37°C e em seguida colocados em banho a 100°C para interromper a reação. Posteriormente, foi adicionado aos microtubos 500 µL de uma solução de tetraborato de sódio saturada (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> – pH 8,0), sendo por fim analisada a absorbância em uma leitora de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devices®) a 410 nm. A unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol de *p*-nitrofenol por minuto (µmol/min), sendo os resultados expressos em unidades por miligramas de proteína (U/mg). Este ensaio foi realizado com a supervisão do Me. Jonh Dayvan Maidana Serpa do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos – INBIO (UFMS).

#### 4.8. Atividade antitriptica

Com o objetivo de analisar a presença de peptídeos inibidores de protease na peçonha e hemolinfa de *T. paraguayensis*, foi realizado um ensaio de atividade antitriptica conforme proposto por Erlanger (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961). No experimento 8 µL (0,25 mg/mL) de cada amostra foram incubados em microplaca de 96 poços com 4 µL de tripsina bovina (0,25 mg/mL solubilizado em HCl 1 mM) e 58 µL tampão fosfato 0,1 M (pH 7,6). Em seguida a microplaca foi pré-incubada durante 10 minutos a 37°C, posteriormente foi adicionado 200 µL do substrato BAPNA (N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) a 1 mM, preparado em 1% DMSO e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,6). Por fim, a microplaca foi incubada novamente por 30 minutos a 37°C e teve sua absorbância analisada em 410 nm em uma leitora de microplacas (Varioskan LUX - Thermo Scientific). Os experimentos foram realizados em duplicatas, havendo também um controle (sem adição de amostra) e branco (sem adição de amostra e tripsina). Este ensaio foi realizado com a supervisão do Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) – FACFAN (UFMS).

#### 4.9. Atividade antitripanossômica

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram mantidas em cultura a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques periódicos. Nos experimentos foram utilizadas parasitas em fase exponencial de crescimento. O efeito da peçonha sobre a viabilidade de formas epimastigotas do parasita foi determinado pelo ensaio do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) (HENRIQUES et al., 2011). Parasitas em fase exponencial de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para a concentração de  $1 \times 10^6$  parasitas/mL e transferidas para placas de 96 poços. Os parasitos foram incubados por 72 horas na presença de diferentes concentrações (60/30/15/7,5/3,75 µg/mL) da peçonha diluída em DMSO, em triplicata, e mantidas a 28°C. Após a incubação, foi adicionada uma solução de MTS (5 mg/mL) a cada poço e as placas foram incubadas por 4 horas a 37°C. Posteriormente, a absorbância foi avaliada, em 570 nm em uma leitora de microplacas (µQuant – BioTek®). Este ensaio foi realizado com a supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira no Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios – INBIO (UFMS).

#### 4.10. Atividade citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células Vero (CCL-81 - ATCC®) com 70% de confluência do tapete celular em concentração igual a  $2 \times 10^5$  células/mL em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10% de SBF e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações de peçonha (150/75/37,5/18,75/9,37/4,7 µg/mL), diluídas em DMSO 100% e, posteriormente, em meio DMEM para obtenção das concentrações a serem testadas frente as células animais. O controle foi feito com as células em meio DMEM e DMSO na proporção correspondente a cada ponto da curva de concentração. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). Após 24 horas, as células foram lavadas e então foram adicionados 50 µL de MTT (2 mg/mL) diluído em meio DMEM. Após 4h de incubação, 50 µL de DMSO 100% foram adicionados para solubilização dos cristais formados e a absorbância foi verificada a 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Este

ensaio foi realizado com a supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira no Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios – INBIO (UFMS).

#### **4.11. Efeito da peçonha e hemolinfa sobre a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) – ATPase**

A fim de verificar o efeito da peçonha e hemolinfa sobre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, foi observado a atividade pNPPase da enzima (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase sobre o substrato sintético *p*-nitrofenil fosfato. Homogenatos de rim de ratos, doados pelo Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques (INBIO/UFMS), foram preparados a partir da maceração dos tecidos com tampão de membrana pH 7,4 (imidazol 12,9 mM; EDTA 0,625 mM; sacarose 250 mM). Os homogenatos em seguida foram centrifugados a 10.000 × *g* por 35 minutos a 4°C e o sobrenadante foi determinado como frações de membrana. Para os ensaios as frações de membranas foram quantificadas e ajustadas a 1,25 mg/mL de proteínas pelo método de Bradford.

O meio reacional continha EDTA 1 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, *p*-nitrofenil fosfato 10 mM e Tris-HCl 30 mM (pH 7,4). Também foi preparado outro meio reacional contendo adicionalmente ouabaína 2 mM, inibidor específico da enzima (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Foi adicionado aos microtubos do ensaio: 1 mL do meio reacional (com ou sem ouabaína), 1 ou 10 µL de peçonha e hemolinfa a 1 mg/mL e 40 µL de homogenatos de rins contendo a enzima, sendo esses imediatamente incubados por 50 minutos a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas, havendo também controles sem adição de peçonha ou hemolinfa. Ao final da incubação, o conteúdo foi analisado em uma leitora de microplacas (Spectramex Plus 384 – Molecular Devices<sup>®</sup>) em 410 nm. A atividade pNPPase específica da enzima (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi obtida pela subtração da atividade do meio reacional sem ouabaína pela atividade do meio reacional com ouabaína. Os resultados foram expressos como nanomol de *p*-nitrofenol liberado por minuto e miligrama de proteína (nmol/mim/mg).

#### **4.12. Perfil cromatográfico da peçonha**

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

0,1% e a solução B uma mistura de 90% acetonitrila e 10% solução A. Um total de 3 mg de peçonha liofilizada foi solubilizada em 100  $\mu$ L de solução A, depositada em um tubo apropriado e colocado na bandeja de injeção. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 1 mL por minuto, iniciando com 5% de solução B por 5 minutos, seguido de um gradiente de 5% a 95% de solução B em 50 minutos, posteriormente permaneceu em 95% de solução B por mais 5 minutos e por fim mais 5 minutos de 5% de solução B, totalizando ao total 65 minutos de corrida cromatográfica. Este ensaio foi realizado com a supervisão do Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) – FACFAN (UFMS).

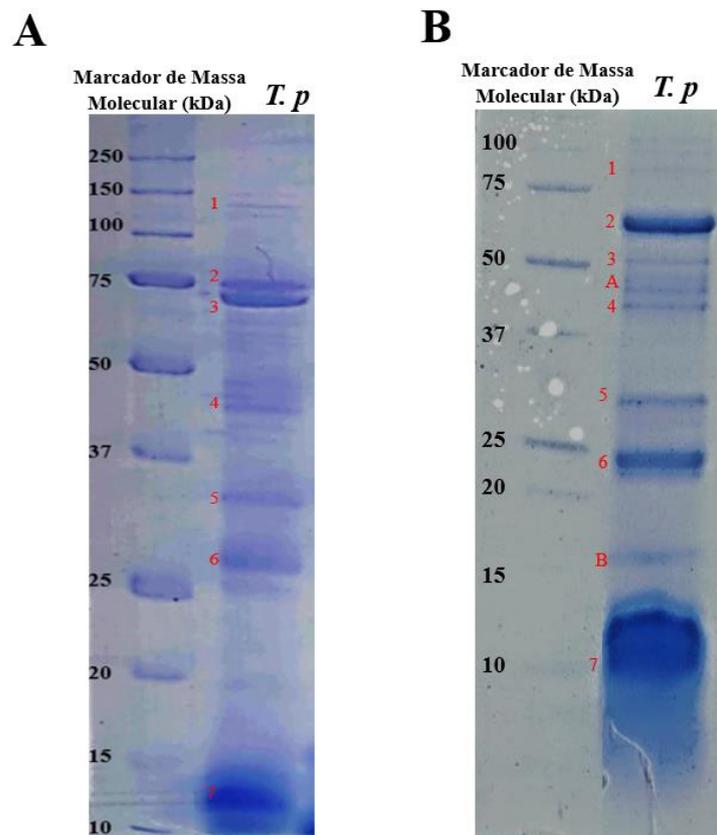
#### **4.13. Análises estatísticas**

Todos os valores experimentais serão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Foi aplicado One-way análise de variância (ANOVA) para comparações de múltiplos grupos, seguido do pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.00, GraphPad, San Diego, CA, EUA, 2007). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Perfil eletroforético da peçonha e hemolinfa de *Tityus paraguayensis*

O perfil eletroforético obtido a partir do gel com concentração de 15%, revelou a presença de proteínas de diversas massas, variando de 150 a menores que 10 kDa. Ao todo foram identificadas 7 bandas bem evidentes na peçonha de *T. paraguayensis* (Figura 4-A), sendo essas de aproximadamente: 140 kDa (1), 75 kDa (2), 70 kDa (3), 44 kDa (4), 33 kDa (5), 28 kDa (6) e 10 kDa (7). As bandas 2, 3 e 7 apresentaram maior intensidade, indicando uma maior abundância destes componentes na peçonha. O perfil obtido adicionalmente com o protocolo adaptado para proteínas de baixa massa molecular (Figura 4-B) demonstrou um padrão de bandas semelhante, sendo encontrado bandas equivalentes ao gel anteriormente descrito, contudo, o novo perfil evidenciou a presença de duas novas bandas. A banda denominada A está localizada entre as bandas 3 e 4, já a banda denominada B que está entre as bandas 6 e 7.



**Figura 4:** Perfil eletroforético de 20 µg da peçonha de *Tityus paraguayensis* (*T.p*) realizado através de SDS-PAGE 15% (A) e SDS-PAGE 16,5% (B). Os números e letras em vermelho fazem referência as bandas abordadas no texto.

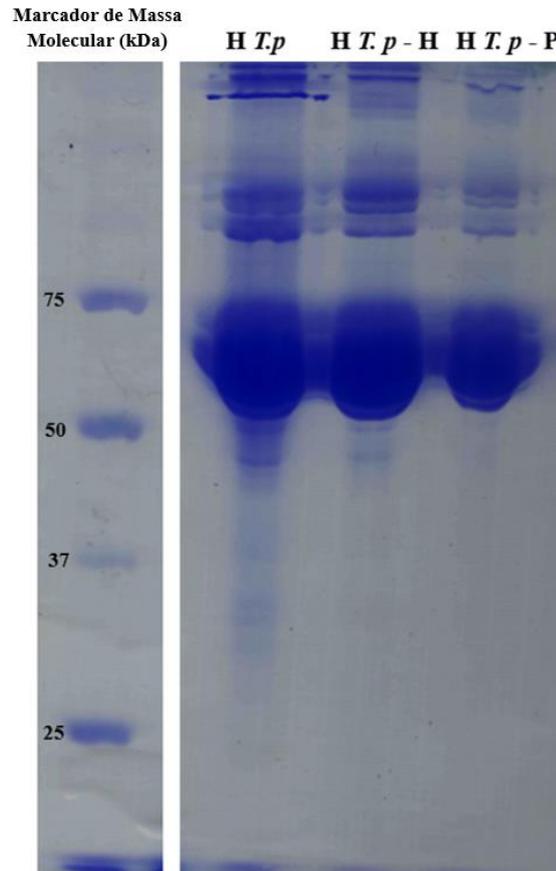
A intensidade da banda 7 corrobora com trabalhos anteriores, que já relataram a presença de proteínas de baixa massa molecular em peçonhas escorpiônicas, sendo essas descritas em sua maioria como peptídeos responsáveis pela toxicidade das peçonhas (YAQOOB et al., 2017). Estudo realizado com o escorpião turco da espécie *Leiurus abduallahbayrami* apresentou grandes semelhanças com o perfil eletroforético obtido no presente estudo, os autores identificaram diversas proteínas com massas entre 10 e 150 kDa, sendo as mais evidentes de aproximadamente 10 kDa (correspondente a banda 7 de *T. paraguayensis*) e 70 kDa (correspondente a banda 2 de *T. paraguayensis*). Contudo, os autores realizaram adicionalmente ao SDS-PAGE uma eletroforese capilar microfluídica (MCE), com isso observaram a presença de bandas com 6 kDa e 7 kDa, além de diversas bandas entre 70 kDa e 85 kDa (ERDEŞ et al., 2014).

Outros estudos também já identificaram altas concentrações de proteínas com massa próxima a 10 kDa, como no escorpião da espécie *Hottentotta rugiscutis*, sendo que quando essa banda foi analisada por espectrometria de massa foram identificados diversos peptídeos com massa entre 912,35 e 7113,80 Da (SANTHOSH et al., 2022). Tal situação já foi descrita também em *Protoiurus kraepelini* (SOMAY DOĞAN et al., 2018) e *Mesobuthus tamulus*, sendo nesta espécie a banda com massa próxima a 10 kDa identificada em sua maioria como peptídeos moduladores de canais iônicos (DAS; PATRA; MUKHERJEE, 2020). Com esses resultados é possível propor que a banda 7 encontrada em *T. paraguayensis* apresente mais de um peptídeo com baixa massa molecular, representando uma maior diversidade de proteínas descritas para a espécie.

Por outro lado, as bandas 2 e 3 correspondem provavelmente a hemocianinas, que são complexos proteicos abundantes na hemolinfa de artrópodes e estão envolvidas nas trocas gasosas, sendo que estas também podem ser encontradas na peçonha de escorpiões (OUKKACHE et al., 2013). Proteínas com massa de aproximadamente 70 kDa já foram identificadas também na peçonha de *Androctonus australis*, *Androctonus amoreuxi*, *Androctonus crassicauda* (SALAMA; SHARSHAR, 2013), *Iurus dufourei* (KESKIN; KOÇ, 2006), entre outros.

Na hemolinfa e em ambas as frações analisadas (plasma e hemócitos), a banda predominante foi em torno de 75 kDa (Figura 5), sendo essa atribuída a proteína hemocianina visto sua massa molecular e a abundância esperada desta molécula na hemolinfa de artrópodes (ALI; ZAIDI; ABBASI, 1995). Além dessa também é possível observar outras bandas de maior massa molecular localizadas na porção superior do gel. Proteínas de baixa massa

molecular não foram detectadas devido, provavelmente, as altas concentrações de hemocianina e outras proteínas de alta massa molecular detectadas.

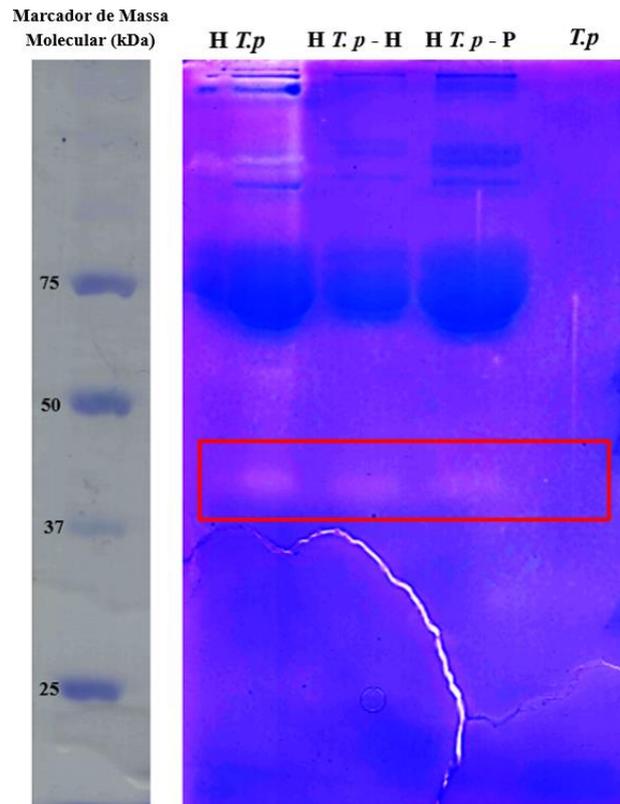


**Figura 5:** Perfil eletroforético de 20 µg da hemolinfa (H *T.p*), fração plasma (H *T.p-P*) e hemócitos (H *T.p-H*) de *Tityus paraguayensis*, realizado através de um SDS-PAGE 15%.

Mesmo que a grande concentração de proteínas de alta massa molecular tenha impedido a visualização de outras bandas de menor massa molecular, é provável que haja tais moléculas na hemolinfa de *T. paraguayensis*. Estudos realizados com o mesmo gênero, como a espécie *T. serrulatus* (DE JESUS OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA JUNIOR, 2019), e com outros gêneros, como a espécie *Hadrurus arizonensis* (MERCHANT et al., 2021), já identificaram a presença de peptídeos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Acreditasse que as moléculas constituintes das peçonha escorpiônicas tenham tido uma origem evolutiva de componentes presentes na hemolinfa deste animais, tal hipótese ganha força através de estudos que demonstram a presença de atividade moduladora de canais iônicos (muito comum em peçonha) também nas hemolinfas (MENG et al., 2020).

## 5.2. Atividade proteolítica

No ensaio zimograma foi identificada uma banda de degradação entre 50 e 37 kDa na hemolinfa e em suas frações (Figura 6), portanto, indicando a presença de uma enzima com atividade proteolítica (gelatinolítica) nestas amostras. Ausência de bandas identificáveis nessa região por SDS-PAGE (Figura 5), indica uma baixa concentração enzimática.



**Figura 6:** Zimograma feito com 20  $\mu$ g da peçonha (*T.p*), hemolinfa (H *T.p*), plasma (H *T.p*-P) e hemócitos (H *T.p*-H) de *Tityus paraguayensis* através de uma eletroforese (SDS-PAGE 15%) com gelatina a 0,25 mg/mL.

Tal atividade já foi descrita na hemolinfa de outros invertebrados, tendo grande importância na formação de cascatas metabólicas envolvidas na imunidade inata destes animais, sendo já bem descrito a presença de 3 serino proteases com 123, 110 e 64 kDa na hemolinfa de algumas espécies de límulos (IWANAGA; LEE, 2005). Geralmente, essas enzimas se encontram na forma de zimogênios, ativando-se através de mecanismos específicos na presença de danos teciduais e infecções microbianas, tendo a intensidade e duração da resposta controladas por inibidores de proteases (HE et al., 2017). Contudo, os estudos focados em enzimas proteolíticas na hemolinfa de escorpiões são muito escassos, não havendo até então nenhuma enzima descrita na literatura.

Na peçonha não foi observado bandas de degradação (Figura 6), tal resultado pode ser atribuído a alguns fatores, como ausência de enzimas proteolíticas na peçonha, insensibilidade da enzima ao substrato ou baixa concentração enzimática, portanto, não havendo unidades enzimáticas o suficiente para produzir bandas de degradação. Estudos realizados com escorpiões da espécie *Hemiscorpius lepturus* identificaram atividade proteolítica em zimograma utilizando como substrato gelatina e caseína (SEYEDIAN et al., 2010). Também no gênero *Tityus* foi identificado a presença de enzimas proteolíticas da família das serino proteases e metaloproteases (AMORIM et al., 2019).

As enzimas com atividade proteolítica desempenham importante papel nos acidentes com escorpiões, pois estas podem clivar proteínas e peptídeos chave do metabolismo do organismo e ocasionar diversos distúrbios. Trabalhos já demonstraram que peptidases semelhante à enzima conversora de angiotensina I, na peçonha de *T. serrulatus*, estão envolvidas nos quadros de hipertensão descrito nos envenenamentos com esta espécie, sendo que a sintomatologia teve seus efeitos revertidos pela administração de captopril associada a peptidase (CAJADO-CARVALHO et al., 2016). A participação de metalopeptidases também foi relacionada a hidrolise de neuropeptídeos envolvidos em diversas atividades essenciais do tecido nervoso, liberando fatores que podem interagir com canais iônicos e promover neurotoxicidade indireta (CARVALHO et al., 2014). Outra importante enzima é a anterase, uma metaloprotease muito comumente descrita em peçonhas de escorpiões que teve sua atividade relacionada a alterações no transporte de vesículas celulares no pâncreas, ocasionando os casos de pancreatite observado em acidentes com escorpiões da espécie *T. serrulatus* (FLETCHER et al., 2010; ORTIZ et al., 2014).

### **5.3. Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>**

A peçonha demonstrou atividade fosfolipásica na presença e ausência de cálcio (Tabela 3). Tais resultados indicam que as fosfolipases presentes na peçonha são independentes de cálcio, uma vez que mesmo na ausência de tal cofator foi detectado atividade, contudo, é mais provável que houvesse cálcio na própria amostra, assim não sofrendo interferência da ausência deste íon na solução tampão, está afirmação é corroborada por estudos que detectaram altas concentrações de potássio e cálcio na peçonha de escorpiões (ERDEŞ et al., 2014). Em contraponto as frações obtidas da hemolinfa (plasma e hemócitos) não

apresentaram atividade fosfolipásica em nenhum dos sistemas testados (com ou sem cálcio), indicando assim uma ausência desta classe de enzimas nestas amostras (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade fosfolipásica da peçonha, plasma e hemócitos de *T. paraguayensis*, expressa em U/mg e seguida de seu respectivo desvio padrão amostral. O sinal negativo (-) indica a não detecção de atividade na amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

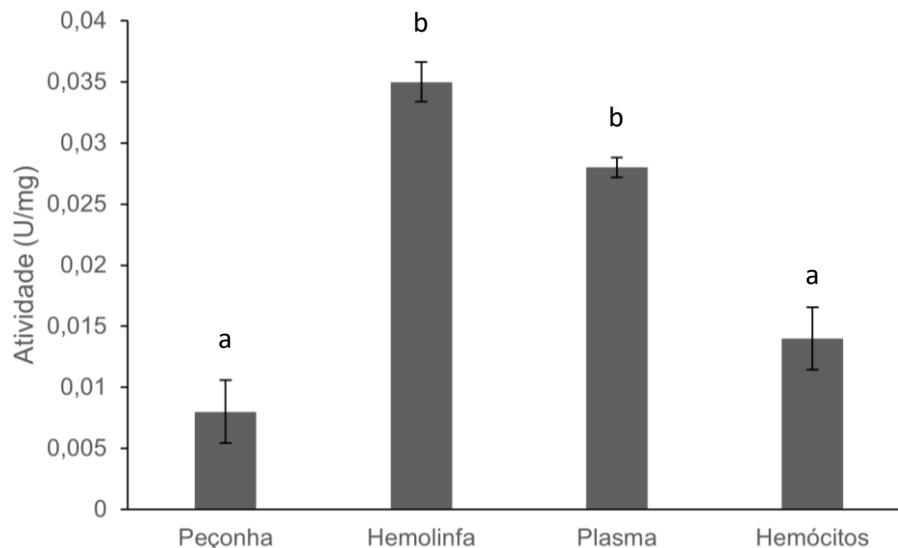
	Com cálcio			Sem cálcio		
	Peçonha	Plasma	Hemócitos	Peçonha	Plasma	Hemócitos
<b>Atividade</b>	124,16 ± 46,43	-	-	170,66 ± 82,02	-	-

As fosfolipases mais comumente encontradas em peçonhas e venenos animais são as sPLA<sub>2</sub> (fosfolipases da família A<sub>2</sub> secretadas). Estas enzimas tem entre 14 a 19 kDa e são altamente ligadas por pontes dissulfeto, até o momento, 9 enzimas desta classe foram identificadas em peçonhas de escorpiões (KRAYEM; GARGOURI, 2020). Como exemplos temos a hemilipina identificada em *Hemiscorpius lepturus* (JRIDI et al., 2015), HmTx identificada em *Heterometrus laoticus* (INCAMNOI et al., 2013) e SmPLVG identificada em *Scorpio maurus* (LOUATI et al., 2013). Outras famílias de fosfolipases também já foram descritas para escorpiões, em estudos transcriptômicos foi identificado a presença de enzimas da família C e A<sub>1</sub> em *Liocheles australasiae*, *Mesobuthus martensii*, e *Scorpio maurus palmatus* (LOK et al., 2021). Enzimas da família D também foram identificadas em escorpiões da espécie *Hemiscorpius lepturus* (MOEZ et al., 2020).

As fosfolipases encontradas em peçonhas de serpentes tem sua atividade já bem relacionado a sintomatologia dos acidentes, contudo, o mesmo não é observado para as fosfolipases escorpiônicas, embora alguns estudos já indiquem possíveis atividade biológicas de tais enzimas. Uma fosfolipase sPLA<sub>2</sub> identificada em escorpiões *Anuroctonus phaiodactylus*, com massa de 19.172 kDa composta por duas subunidades distintas (heterodímero), teve seus efeitos anticoagulante e hemolítico *in vitro* confirmados (VALDEZ-CRUZ; BATISTA; POSSANI, 2004). Estudos realizados com peçonha de serpentes propõem que a atividade anticoagulante observada para as fosfolipases sPLA<sub>2</sub> esteja relacionado com a hidrólise de fosfatidilserinas plasmáticas pró-coagulantes, fosfolipídios importantes na formação de vários complexos de coagulação (SAIKIA; MAJUMDAR; MUKHERJEE, 2013). Além destes, efeitos neurotóxicos, inflamatórios, cardiotoxícos e miotóxicos também foram relacionados as fosfolipases encontradas em escorpiões (KRAYEM; GARGOURI, 2020).

#### 5.4. Atividade lipolítica

Todas as amostras testadas apresentaram atividade lipolítica, sendo maior na hemolinfa (0,035 U/mg), seguida da fração plasma (0,028 U/mg), hemócitos (0,014 U/mg) e peçonha (0,008 U/mg) (Figura 7). As análises estatísticas demonstraram que a diferença observada entre as amostras foi significativa ( $p= 0,000531673$ ), sendo a peçonha significativamente diferente da hemolinfa ( $p= 0,0005677$ ) e plasma ( $p= 0,001966$ ), hemolinfa diferente dos hemócitos ( $p= 0,001695$ ) e plasma diferente de hemócitos ( $p= 0,009131$ ). Com isso pode se concluir que o principal componente responsável pela atividade lipolítica encontrada na hemolinfa é o plasma, uma vez que seus resultados não diferem significativamente. Também se observa que os níveis de atividade encontrada nos hemócitos equivalem-se a peçonha.



**Figura 7:** Atividade lipolítica da peçonha, hemolinfa e suas frações (plasma e hemócitos) de *Tityus paraguayensis*, expressa em U/mg. A barra representa o desvio padrão dos experimentos. As letras diferentes representam as amostras estatisticamente diferentes, análises ANOVA e teste de Tukey foram realizadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

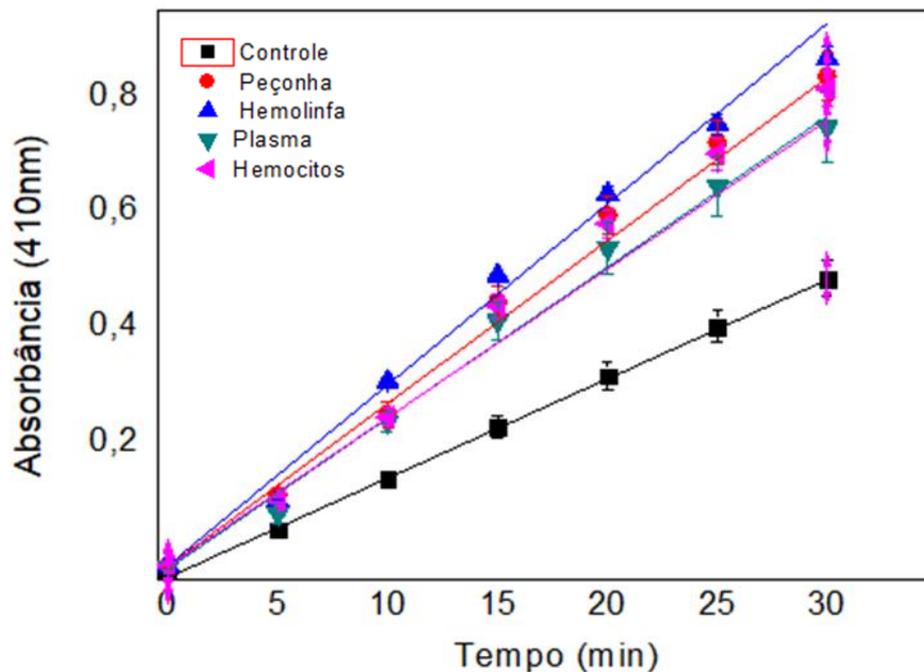
Dado o processo invasivo de extração de hemolinfa utilizado no presente estudo, punção dorsal na região do mesossoma, pode-se sugerir que as lipases encontradas na hemolinfa e suas frações sejam provenientes das glândulas digestivas de *T. paraguayensis*. Poucos trabalhos de identificação de lipases em escorpiões foram realizados, sendo a maioria lipases digestórias. A primeira lipase descrita em escorpiões foi na espécie *Scorpio maurus*, a partir da dissecação das glândulas digestivas, sendo essa uma lipase com massa de aproximadamente 50 kDa, tendo atividade independente de cofatores e resistente a pH alcalino (ZOUARI et al., 2005). Estudos transcriptômicos das glândulas digestivas de *Tityus*

*serrulatus* também identificaram lipases, sendo que essas representaram um total de 20% das enzimas digestivas (FUZITA et al., 2015).

Por outro lado, a presença de lipases na peçonha de escorpiões é um achado mais raro, sendo que até hoje essas enzimas foram descritas apenas por ensaios transcriptômicos nas glândulas de peçonha (CID-URIBE et al., 2020). Visto a escassez de estudos a este respeito, se torna difícil propor mecanismos pelos quais está enzima participe dos efeitos biológicos observados pelas peçonhas escorpiônicas, contudo, deva estar ligado com a hidrólise de lipídios liberando ácidos graxos e glicerol.

### 5.5. Atividade antitrípica

Os resultados indicaram que não houve diminuição da atividade da enzima tripsina quando exposta as amostras testadas (Figura 8), indicando a ausência de peptídeos com atividade antitrípica. Pelo contrário, foi observado um aumento significativo da atividade ( $p=0,002456$ ), tal resultado se dá provavelmente a presença nas amostras de enzimas capazes de hidrolisar também o substrato sintético BAPNA e causar um aumento do seu produto (*p*-nitroanilina) no meio reacional.



**Figura 8:** Atividade antitrípica analisada em 2  $\mu$ g de peçonha, hemolinfa e suas frações (plasma e hemócitos) de *Tityus paraguayensis*, além do controle. No eixo y se encontra absorvância observada em cada amostra e no eixo x o tempo de incubação. A barra representa o desvio padrão dos experimentos, análises ANOVA e teste de Tukey foram realizadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

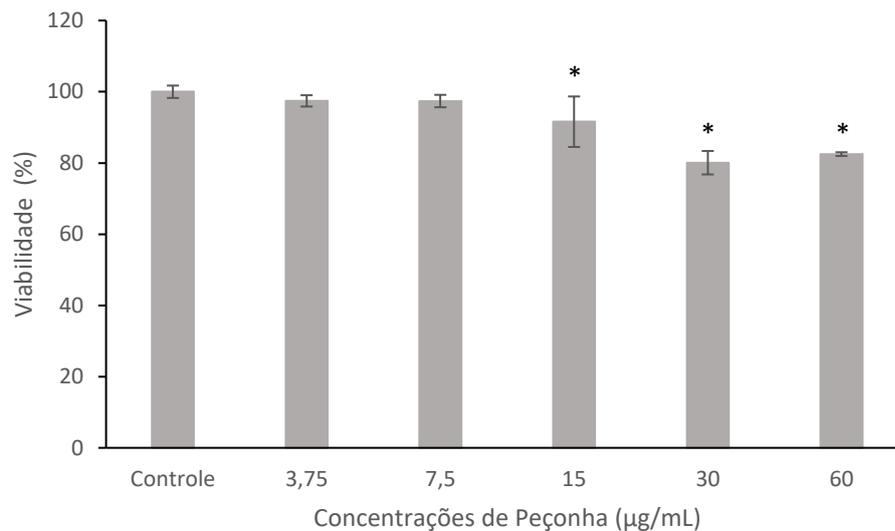
Embora a caracterização funcional de peptídeos inibidores de proteases (PIP) em peçonhas animais seja pouca compreendida, supõe-se que estas moléculas auxiliem na proteção de componentes proteicos da peçonha, evitando sua degradação pela ação de enzimas proteolítica contidas tanto na peçonha quanto na presa, assim preservando a atividade proteolítica (MA et al., 2016). Em estudo realizado com *Tityus discrepans* foi caracterizada a atividade de um PIP sobre a enzima plasmina, que é um importante componente nas cascatas de coagulação. Assim, foi possível correlacionar deposição de fibrina observada em quadro de envenenamento com *T. discrepans* e a presença do peptídeo inibidor de protease na peçonha do animal (BRAZÓN et al., 2009).

Diversos PIP já foram descritos em escorpiões, como o peptídeo MeKTT-1 com massa de 6669,9 Da que foi isolado de escorpiões da espécie *Mesobuthus eupeus*, e apresentou alta atividade inibidora de tripsina *in vitro* (MA et al., 2016), PIP também foram identificados nas peçonhas de *Lychas mucronatus* (ZHAO et al., 2011), *Tityus bahiensis* (DE OLIVEIRA et al., 2015), *Buthus tamulus* (CHHATWAL; HABERMANN, 1981), *Buthus martensi* (DING et al., 2015), entre outros. A ocorrência destes peptídeos também já foi descrita na hemolinfa de escorpiões, sendo que estes provavelmente atuem na regulação da vias metabólicas do próprio animal (BANERJEE et al., 1991).

As análises estatísticas demonstraram um aumento significativo da atividade em todas as amostras quando comparadas ao controle. O aumento da atividade trípica no presente experimento reforçou os resultados obtidos no zimograma para hemolinfa e suas frações, indicando a presença de proteases e sugerindo se tratar de uma serino protease, uma vez que o substrato BAPNA utilizado é específico para essas enzimas. Quanto a peçonha de *T. paraguayensis*, os resultados obtidos demonstram também a presença de serino proteases, indicando assim que o resultado negativo observado no zimograma tenha se dado devido a uma concentração insuficiente da enzima para provocar uma banda de degradação no gel.

## 5.6. Atividade antitripanossômica

No ensaio para verificar o efeito da peçonha sobre a viabilidade das formas epimastigotas do parasita, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa ( $p=0,000000203$ ) da viabilidade dos parasitos quando tratados com as três concentrações mais altas de peçonha (15, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 9).



**Figura 9:** Atividade antitripanossômica analisada em diferentes concentrações de peçonha de *Tityus paraguayensis* e controle. No eixo y se encontra a viabilidade de formas epimastigota de *T. cruzi* (%), e no eixo x as concentrações (µg/mL). A barra representa o desvio padrão dos experimentos, sendo o asterisco indicativo do tratamento que apresentou diferença significativa em relação ao controle, obtido através ANOVA e teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

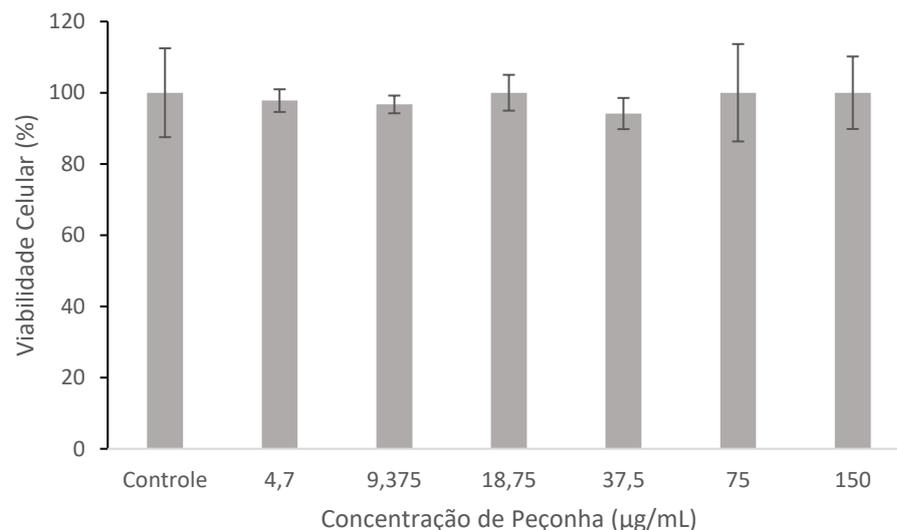
Alguns trabalhos na literatura avaliaram a relação de peçonhas escorpiônicas e *Trypanosoma cruzi*. No estudo mais recente, foi avaliado o efeito de 400 µg/mL de peçonha de *T. serrulatus* sobre macrófagos infectados com formas tripomastigotas do parasito, os resultados apontaram um aumento na produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, assim ocasionando uma diminuição da replicação intracelular do parasito e a liberação de tripomastigotas (PIMENTEL et al., 2021). Trabalhos realizados com o peptídeo estigmurina (*T. stigmurus*) e seus análogos identificaram um alta atividade contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo observado uma inibição de 100% do crescimento do parasita na concentração de 25 µM e 2,5 µM de estigmurina e seus análogos, respectivamente (AMORIM-CARMO et al., 2019; PARENTE et al., 2018). O peptídeo VmCT1 encontrado no escorpião *Vaejovis mexicanus* também foi avaliado contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *Trypanosoma cruzi*, demonstrando atividade contra as três formas (PEDRON et al., 2020).

Os resultados indicam que existe potencial na peçonha para provocar uma diminuição da viabilidade de *T. cruzi* em sua forma epimastigota, contudo, não muito expressiva. Tal quadro pode ser causado por uma concentração pequena de compostos específicos que estejam envolvidos com a diminuição da viabilidade, logo não sendo identificado o IC<sub>50</sub> no presente estudo. Visto o potencial descrito em outras espécies e os resultados obtidos com *T.*

*paraguayensis*, seria interessante realizar novamente o experimento utilizando outras formas do ciclo de vida do parasito e frações isoladas/enriquecidas da peçonha de *T. paraguayensis*.

### 5.7. Atividade citotóxica

Os resultados obtidos neste ensaio não se mostraram estatisticamente significativos quando comparados ao controle, indicando ausência de citotoxicidade nas concentrações de peçonha avaliadas (150/75/37,5/18,75/9,37/4,7  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 10).



**Figura 10:** Atividade citotóxica analisada em diferentes concentrações de peçonha de *Tityus paraguayensis* e controle. No eixo y se encontra a viabilidade celular (%), e no eixo x as concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ). A barra representa o desvio padrão dos experimentos, foram realizadas análises ANOVA e teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Tais resultados corroboram com os obtidos com a peçonha do escorpião *Rhopalurus junceus*, que não apresentou alteração da viabilidade de diversas culturas celulares, entre estas células Vero (DÍAZ-GARCÍA et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados para a peçonha do escorpião *Hemiscorpius lepturus*, cujo  $\text{IC}_{50}$  para células Vero foi de 896  $\mu\text{g/mL}$  (MORADI et al., 2019). Já em estudo realizado com a peçonha de *Hottentotta schach* foi detectado apenas uma discreta diminuição da viabilidade de células Vero na concentração mais alta testada, 200  $\mu\text{g/mL}$  (DEZIANIAN et al., 2020).

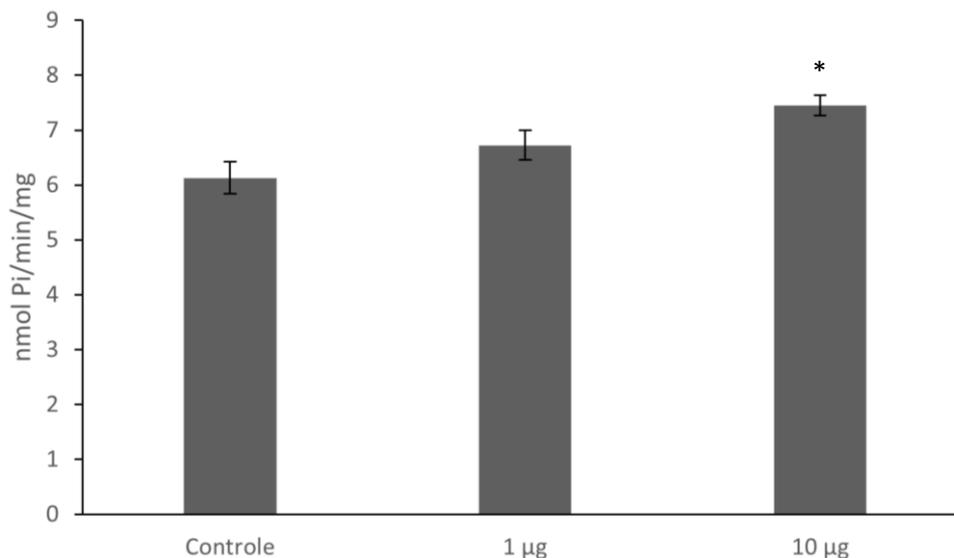
Entretanto, é interessante ressaltar que nos trabalhos mencionados e em outros com *Androctonus crassicauda* (ZARGAN et al., 2011) e *Heterometrus bengalensis* (DAS GUPTA et al., 2007), foi descrito significativa atividade citotóxica de suas peçonhas contra células tumorais. Em estudo realizado com o escorpião *Androctonus bicolor* foi observado que sua peçonha induziu a parada do ciclo celular e apoptose em células provenientes de câncer de mama e colorretal (AL-ASMARI et al., 2016). Na espécie *Tityus serrulatus* foi observado

uma diminuição significativa de linhagens celulares de câncer de útero quando expostas a diferentes concentrações de peçonha (BERNARDES-OLIVEIRA et al., 2019).

Tais dados bibliográficos indicam uma certa seletividade das peçonhas escorpiônicas no geral, para causar diminuição da viabilidade de células tumorais. Deste modo, sendo interessante submeter a peçonha de *T. paraguayensis* a ensaios de citotoxicidade contra células tumorais também. A ausência de citotoxicidade contra células normais também se mostra promissor para outros estudos farmacológicos, pois está é uma característica desejável em fármacos.

### 5.8. Efeito da peçonha e hemolinfa sobre a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+) - \text{ATPase}$

Foi observado um aumento significativo na atividade pNPPase da enzima  $(\text{Na}^+, \text{K}^+) - \text{ATPase}$  (NKA) na presença de 10  $\mu\text{g}$  de peçonha ( $p = 0,001677$ ) de *Tityus paraguayensis* (Figuras 11), sendo este aumento de aproximadamente 19% da atividade quando comparado ao controle.



**Figura 11:** Atividade pNPPase da enzima NKA em duas concentrações (1 e 10  $\mu\text{g}$ ) da peçonha de *Tityus paraguayensis*, expressa em nmol de Pi/min/mg. A barra representa o desvio padrão dos experimentos, sendo o asterisco indicativo do tratamento que apresentou diferença significativa em relação ao controle, análises ANOVA e teste de Tukey foram realizadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Sabe-se que as toxinas animais são capazes de modular a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+) - \text{ATPase}$ , entre as toxinas de origem proteica a mais estudada é a melitina, um peptídeo encontrado na peçonha de abelhas *Apis mellífera* (CHEN; LIN-SHIAU, 1985), contudo, tal molécula causa uma inibição na atividade enzimática, diferente do observado no presente trabalho. Em contra partido, estudo realizado com a peçonha da serpente *Bothrops alternatus*

observou um aumento na atividade de enzimas (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase renais após exposição a peçonha (LINARDI et al., 2011). A peçonha de *Bothrops jararacuçu* também ocasionou um aumento da atividade enzimática quando associada ao antibiótico doxiciclina (SOEIRO et al., 2021).

Outro composto envolvido na regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é a dopamina, a regulação da atividade desta enzima é muito importante, pois o aumento de sua atividade já foi relacionado a processos hipertensivos (APERIA, 2001). É interessante comentar que peptídeos encontrados na peçonha de *Scorpio maurus palmatus* provocaram um aumento da pressão arterial em ratos (ETTINGER et al., 2013). Visto isso, é possível sugerir uma relação entre a estimulação da enzima (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase e os processos hipertensivos ligados as peçonhas escorpiônicas.

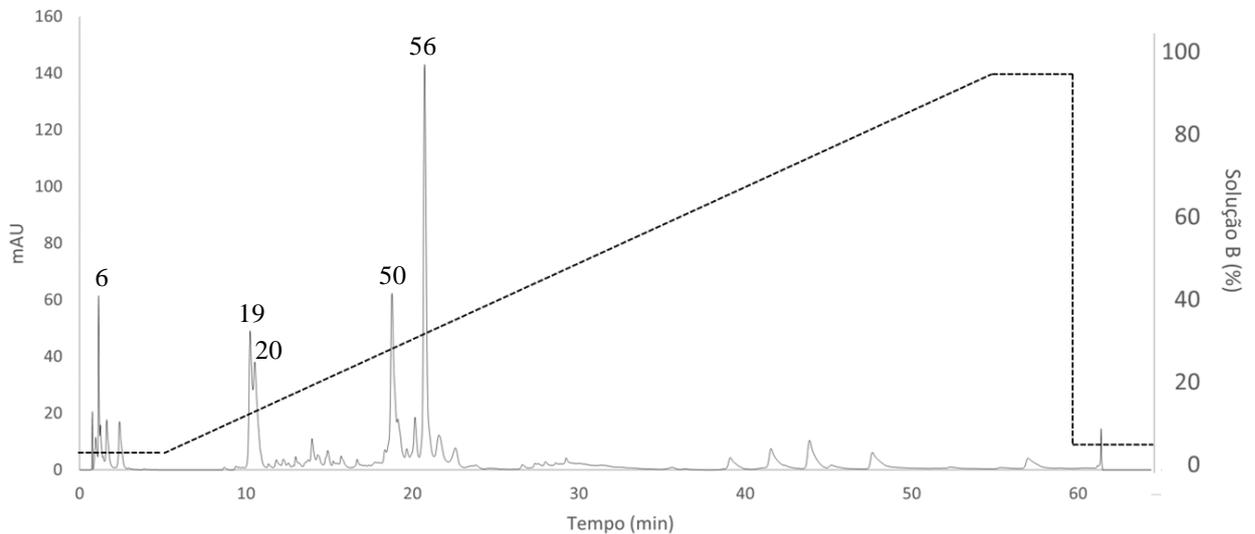
Nas outras amostras (hemolinfa, hemócitos e plasma) avaliadas não houve alteração significativa da atividade enzimática (Tabela 4).

**Tabela 4.** Atividade pNPPase da enzima NKA quando exposta a diferentes concentrações (1 e 10 µg) de hemócitos, plasma e hemolinfa de *T. paraguayensis*, expressa em nmol de Pi/min/mg e seguida de seu respectivo desvio padrão amostral. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Amostra	Atividade (nmol de Pi/min/mg)		
	Controle	1 µg	10 µg
Hemócitos	4,26 ± 2,92	4,34 ± 1,23	4,58 ± 0,96
Plasma	4,00 ± 0,84	4,58 ± 1,50	5,79 ± 2,37
Hemolinfa	4,19 ± 0,41	5,09 ± 1,53	5,88 ± 2,02

### 5.9 Perfil cromatográfico da peçonha

O perfil cromatográfico da peçonha revelou a presença de 83 picos (Figura 12).



**Figura 12:** Perfil cromatográfico obtido através da eluição de 3 mg de peçonha liofilizada de *Tityus paraguayensis* em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com um gradiente de 5% a 95% de solução B. Os números indicam o número do pico.

Os picos variam entre alturas de 0,144 e 142,974 mAU (miliunidades de absorvância), sendo este o pico predominante com uma altura relativa de 19,59% (56) e, portanto, representando a composto de maior abundância na amostra. Além deste, os picos 6 (8,43%), 19 (6,74%), 20 (5,24%) e 50 (8,53%) tiveram grande expressam na amostra avaliada (Tabela 5).

**Tabela 5.** Dados de altura do pico (mAU) e altura relativa (%) de cada um dos picos obtidos através da eluição de 3 mg de peçonha liofilizada de *Tityus paraguayensis* em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com um gradiente de 5% a 95% de solução B.

Pico	Altura do Pico (mAU)	Altura relativa (%)
1	20,664	2,83
2	0,737	0,10
3	7,091	0,97
4	11,623	1,59
5	8,719	1,19
6	61,557	8,43
7	16,004	2,19
8	4,744	0,65
9	17,784	2,44
10	0,144	0,02
11	17,090	2,34

12	0,282	0,04
13	0,631	0,09
14	0,273	0,04
15	1,258	0,17
16	1,426	0,20
17	1,039	0,14
18	1,073	0,15
19	49,192	6,74
20	38,214	5,24
21	5,506	0,75
22	2,224	0,3
23	1,38	0,19
24	3,615	0,5
25	1,944	0,27
26	3,771	0,52
27	2,521	0,35
28	1,566	0,21
29	4,738	0,65
30	2,49	0,34
31	2,789	0,38
32	3,623	0,5
33	11,031	1,51
34	5,335	0,73
35	4,075	0,56
36	6,827	0,94
37	3,133	0,43
38	2,385	0,33
39	2,274	0,31
40	4,918	0,67
41	3,355	0,46
42	3,68	0,5
43	1,708	0,23
44	1,593	0,22
45	1,646	0,23
46	2,598	0,36
47	2,531	0,35
48	7,057	0,97
49	8,549	1,17
50	62,245	8,53
51	0,3	0,04

52	2,292	0,31
53	12,129	1,66
54	7,355	1,01
55	18,437	2,53
56	142,974	19,59
57	13,309	1,82
58	12,119	1,66
59	7,556	1,04
60	1,228	0,17
61	1,532	0,21
62	0,354	0,05
63	1,613	0,22
64	1,98	0,27
65	1,806	0,25
66	2,451	0,34
67	2,001	0,27
68	3,626	0,5
69	1,682	0,23
70	0,886	0,12
71	0,758	0,1
72	0,33	0,05
73	4,328	0,59
74	7,358	1,01
75	0,128	0,02
76	10,129	1,39
77	1,046	0,14
78	6,09	0,83
79	0,391	0,05
80	0,412	0,06
81	7,32	1
82	6,126	0,84
83	19,25	2,64
Total		100

O perfil cromatográfico encontrado em peçonhas escorpiônicas apresenta alta variação devido aos diferentes protocolos aplicados, como alterações no gradiente de eluição ou até mesmo sua ausência, e variações intrínsecas as espécies. Um estudo realizado com 6 espécies de escorpiões (*Androctonus amoreuxi*, *Babycurus jacksoni*, *Hottentotta gentili*, *Grosphus grandidieri*, *Tityus fuhrmanni* e *Pandinus imperator*) utilizando um protocolo padronizado

para todas, evidenciou para cada espécie um perfil distinto. Foi observado que a peçonha de *P. imperator* e *T. fuhermanni* apresentaram distribuição homogênea de compostos hidrofóbicos (maior tempo de retenção) e hidrofílicos (menor tempo de retenção), contudo, *T. fuhrmanni* apresentou maior concentração de compostos eluindo entre 30% e 35%. As outras espécies avaliadas tiveram a maioria dos compostos eluidos entre 20% e 40%, indicando uma natureza hidrofílica moderada (ESTRADA-GÓMEZ et al., 2017).

Os perfis cromatográficos de peçonhas também variam quanto ao número de picos, como observado na espécie *Urodacus yaschenkoi* que apresentou 74 picos (LUNA-RAMÍREZ et al., 2013) e na espécie *Tityus stigmurus* com 65 picos (BATISTA et al., 2007). O número de picos obtidos nestes estudos é relativamente próximo aos 83 picos obtidos com a peçonha de *T. paraguayensis*, sendo a maioria destes picos eluidos com tempos de retenção menores, assim indicando uma peçonha de caráter mais hidrofílica. Tais resultados demonstram há grande variedade de composto encontrados em *T. paraguayensis*, que ainda não foram identificados ou não tiveram suas atividades caracterizadas.

## 5.9. Análise geral dos resultados

Diversos resultados foram obtidos no presente estudo, e para fins de comparação e melhor compreensão estes dados estão resumidos na tabela a seguir (Tabela 6):

**Tabela 6.** Resultados obtidos no presente estudo, de acordo com cada amostra avaliada. (\*atividade possivelmente derivada de lipases do sistema digestório)

Atividade	Amostra			
	Peçonha	Hemolinfa	Plasma	Hemócitos
Perfil eletroforético	Muito diverso	Pouco diverso	Pouco diverso	Pouco diverso
Atividade proteolítica	Ausente	Presente	Presente	Presente
Atividade fosfolipásica	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Atividade lipolítica	Presente	Presente*	Presente*	Presente*
Atividade	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

antitriptica	(+ protease)	(+ protease)	(+ protease)	(+ protease)
Atividade	Presente	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado
antitripanossômica				
Atividade	Ausente	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado
citotóxica				
Atividade sobre a	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
NKA				
Perfil	Muito diverso	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado
cromatográfico				

Esses resultados quando tomados em conjunto, permitem propor algumas hipóteses sobre os escorpiões da espécie *Tityus paraguayensis*. É possível que a peçonha deste animal provoque em casos de acidentes sintomas como hipertensão e neurotoxicidade, ocasionados pela presença de enzimas proteolíticas, também é possível que ocorram distúrbios da coagulação atribuídas as fosfolipases, e alterações renais e neurológicas ligados a enzima NKA. Contudo, esses sintomas mencionados são meramente especulativos com base nas informações obtidas no presente estudo, uma vez que não existem trabalhos clínicos ou dados epidemiológicos ligados a essa espécie. Além disto, a diversidade de compostos evidenciados pelo perfil eletroforético/cromatográfico não identificados no presente estudo, podem estar ligados com uma grande diversidade de outros sintomas ou até mesmo a ausência deles.

Quanto á hemolinfa, essa se mostra promissora para descrição de enzimas proteolíticas que podem ser aplicadas biotecnologicamente, por exemplo na indústria de panificação e cervejeira (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011). Já a atividade lipolítica identificada, provavelmente derivada de enzimas do sistema digestivo, pode ser aplicada entre outras na fabricação de detergente e biorremediação de resíduos (CHOUDHURY; BHUNIA, 2015).

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou que a peçonha de *Tityus paraguaensis* apresenta enzimas com atividade proteolítica, fosfolipásica A<sub>2</sub> e lipolítica, além de um perfil eletroforético e cromatográfico muito diverso, predominando moléculas hidrofílicas. Quanto as atividades biológicas, foi observado que a peçonha desta espécie é capaz de estimular a atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase e causar alterações na viabilidade de formas epimastigotas do protozoário *Tripanosoma cruzi*. A hemolinfa do escorpião estudado demonstrou atividade proteolítica e lipolítica (provavelmente derivada de enzimas do sistema digestivo), além de um perfil eletroforético pouco diverso.

Este é o primeiro estudo que buscou investigar os componentes bioquímicos e as atividades biológicas presentes na peçonha e hemolinfa do escorpião endêmico de Mato Grosso do Sul, *Tityus paraguayensis*. Os resultados revelaram uma diversidade de compostos e atividades que podem ter potencial aplicação farmacológica e/ou biotecnológica, sendo necessário novos estudos para sua confirmação, caracterização e isolamento.

Com base nestes resultados, pretendem-se dar prosseguimento aos estudos com a espécie *Tityus paraguayensis*. As próximas etapas serão a caracterização dos componentes descritos bem como daqueles que possivelmente não foram identificados neste estudo, além disso, também se pretende correlacionar as moléculas em específico encontradas nessa espécie e suas atividades biológicas. Para esse fim, serão empregadas as metodologias “ômicas”, que podem ampliar o número de informações genômicas e proteômicas a respeito desta espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROUG, F. et al. Scorpion envenomation: state of the art. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 3, p. 401–410, 2020.

AKBAR, N. et al. Scorpion's Biodiversity and Proteinaceous Components of Venom Scorpion's Biodiversity and Proteinaceous Components of Venom. **International Journal of Biosciences**, v. 18, n. 2, p. 146–162, 2021.

AL-ASMARI, A. et al. Scorpion (*Androctonus bicolor*) venom exhibits cytotoxicity and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 537–543, 2016.

ALI, S. A. et al. Structure-activity relationship of a highly selective peptidyl inhibitor of kv1.3 voltage-gated K<sup>+</sup>-channel from scorpion (*B. indicus*) venom. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 19–32, 2014.

ALI, S. A. et al. Structure-activity relationship of chlorotoxin-like peptides. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 36–53, 2016.

ALI, S. A.; ZAIDI, Z. H.; ABBASI, A. Oxygen transport proteins: I. Structure and organization of hemocyanin from scorpion (*Buthus indicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 112, n. 1, p. 225–232, 1995.

ALMAAYTAH, A. et al. Mauriporin, a novel cationic  $\alpha$ -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *androctonus mauritanicus*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 281–293, 2013.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.

ALMEIDA, R. B. DE. **Atlas das espécies de Tityus C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil**. [s.l.] Dissertação de Mestrado: Universidade de São Paulo, 2010.

ALOULO, A. et al. Lipases and Phospholipases: An Overview. In: SANDOVAL, G. (Ed.). **Lipases and Phospholipases Methods and Protocols**. Second ed. New York: Humana Presss, 2012. p. 69–108.

AMORIM-CARMO, B. et al. Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide stigmurin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–21, 2019.

AMORIM, F. G. et al. Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, n. 148218, p. 1–11, 2019.

APERIA, A. Regulation of sodium/potassium ATPase activity: Impact on salt balance and vascular contractility. **Current Hypertension Reports**, v. 3, n. 2, p. 165–171, 2001.

ARAÚJO, K. A. M. DE et al. Epidemiological study of scorpion stings in the Rio Grande do Norte State, Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 58, p. 1–9, 2017.

ARBUCKLE, K. Special issue: Evolutionary ecology of venom. **Toxins**, v. 13, n. 5, p. 10–13, 2021.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.

BANERJEE, A. et al. Characterization of a naturally occurring protease inhibitor in the hemolymph of the scorpion, *Heterometrus bengalensis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 15, n. 4, p. 213–218, 1991.

BANERJEE, S. et al. An Alkaloid from Scorpion Venom: Chemical Structure and Synthesis. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 8, p. 1899–1904, 2018.

BARBOSA, M. D. G. R. et al. Aspectos epidemiológicos dos acidentes escorpiônicos em Salvador, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 155–162, 2003.

BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1–2, p. 147–157, 2007.

BERGERON, Z. L.; BINGHAM, J. P. Scorpion toxins specific for potassium (K<sup>+</sup>) channels: A historical overview of peptide bioengineering. **Toxins**, v. 4, n. 11, p. 1082–1119, 2012.

BERNARDES-OLIVEIRA, E. et al. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–8, 2019.

BHAVYA, J. et al. Scorpion Toxin Polypeptides as Therapeutic Agents: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. 9, p. 848–859, 2016.

BOSE, T.; CIEŚLAR-POBUDA, A.; WIECHEC, E. Role of ion channels in regulating Ca<sup>2+</sup> homeostasis during the interplay between immune and cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2015.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 278–254, 1976.

BRASIL. **Manual de Controle de Escorpiões- Secretaria de Vigilância em Saúde e Departamento de Vigilância Epidemiológica Manual**. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2009.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os Escorpiões**. 1<sup>o</sup> ed. Salvador - BA: Editora da Universidade Federal do Bahia - ADUFBA, 2010.

BRAZÓN, J. et al. Discreplasminin, a plasmin inhibitor isolated from *Tityus discrepans* scorpion venom. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 7, p. 669–678, 2009.

BRAZÓN, J. et al. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 168, n. 1, p. 62–69, 2014.

CAJADO-CARVALHO, D. et al. Insights into the hypertensive effects of *tityus serrulatus* scorpion venom: Purification of an angiotensin-converting enzyme-like peptidase. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 1–16, 2016.

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

CAMARGOS, T. S. et al. The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1509–1517, 2011.

CAMARGOS, T. S. et al. The scorpion toxin Tf2 from *Tityus fasciolatus* promotes Nav1.3 opening. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2015.

CARBALLAR-LEJARAZÚ, R. et al. Recombinant scorpine: A multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 3081–3092, 2008.

CARVALHO, D. C. et al. Neuropeptide y family-degrading metallopeptidases in the *Tityus Serrulatus* venom partially blocked by commercial antivenoms. **Toxicological Sciences**, v. 142, n. 2, p. 418–426, 2014.

CARVALHO, L. S. et al. Checklist dos escorpiões (Arachnida, Scorpiones) do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 107, p. 1–7, 2017.

CERNI, F. A. et al. Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K<sup>+</sup> channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 892–913, 2014.

CHEN, C. C.; LIN-SHIAU, S. Y. Mode of inhibitory action of melittin on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity of the rat synaptic membrane. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 13, p. 2335–2341, 1985.

CHHATWAL, G. S.; HABERMANN, E. Neurotoxins, protease inhibitors and histamine releasers in the venom of the Indian red scorpion (*Buthus tamulus*): Isolation and partial characterization. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 807–823, 1981.

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

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Review Article Industrial Application of Lipase : a Review. **Biopharm Journal**, v. 1, n. 2, p. 41–47, 2015.

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

COLE, T. J.; BREWER, M. S. Toxify: A deep learning approach to classify animal venom proteins. **PeerJ**, v. 2019, n. 6, p. 1–8, 2019.

CONDE, R.; ZAMUDIO, F. Z.; RODR, M. H. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. **FEBS Letters**, v. 471, n. 2–3, p. 165–168, 2000.

CORDEIRO, F. A. et al. Arachnids of medical importance in Brazil: Main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2015.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642–649, 2015.

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

DAS GUPTA, S. et al. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. **Leukemia Research**, v. 31, n. 6, p. 817–825, 2007.

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

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

DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 264, n. 2 33-2, 1993.

DEHGHANI-SAMANI, A.; MADRESEH-GHAHFAROKHI, S.; DEHGHANI-SAMANI, A. Mutations of voltage-gated ionic channels and risk of severe cardiac arrhythmias. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 99–110, 2019.

DEZIANIAN, S. et al. In-vitro study of hottentotta schach crude venom anticancer effects on mcf-7 and vero cell lines. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 1, p. 192–202, 2020.

DÍAZ-GARCÍA, A. et al. In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. **Journal of venom research**, v. 4, p. 5–12, 2013.

DÍAZ, C. et al. Venom characterization of the bark scorpion *Centruroides edwardsii* (Gervais 1843): Composition, biochemical activities and in vivo toxicity for potential prey. **Toxicon**, v. 171, n. September, p. 7–19, 2019.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae). **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 72–82, 2013.

DING, L. et al. A new Kunitz-type plasmin inhibitor from scorpion venom. **Toxicon**, v. 106, p. 7–13, 2015.

DUEÑAS-CUELLAR, R. A. et al. Scorpion toxins and ion channels: Potential applications in cancer therapy. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2020.

EHRET-SABATIER, L. et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29537–29544, 1996.

ELGAR, D.; DU PLESSIS, J.; DU PLESSIS, L. Cysteine-free peptides in scorpion venom: Geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 25, p. 2495–2502, 2006.

ERDEŞ, E. et al. Characterization of *Leiurus abduhbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: Peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2014.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961.

ESCALONA, M. P.; POSSANI, L. D. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: Interactions and effects. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, n. 2, p. 572–587, 2013.

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

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

EVANS, E. R. J. et al. Venom costs and optimization in scorpions. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1–7, 2019.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066–1088, 2011.

FENG, L.; GAO, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 250–257, 2008.

FERREIRA, L. A. F.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus Serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 31, n. 8, p. 941–947, 1993.

FLETCHER, P. L. et al. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7405–7416, 2010.

FURTADO, A. A. et al. Biology, venom composition, and scorpionism induced by brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae): A mini-review. **Toxicon**, v. 185, n. 7, p. 36–45, 2020.

FUZITA, F. J. et al. Biochemical , Transcriptomic and Proteomic Analyses of Digestion in the Scorpion *Tityus serrulatus*: Insights into Function and Evolution of Digestion in an Ancient Arthropod. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–31, 2015.

GAO, B. et al. Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 4, p. 1230–1245, 2009.

GAO, B. et al. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 350–359, 2010.

GIANAZZA, E. et al. Hemolymph proteins: An overview across marine arthropods and molluscs. **Journal of Proteomics**, v. 245, p. 104294, 2021.

GIRISH, K. et al. Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 18, p. 2261–2288, 2009.

GORDON, D. et al. The differential preference of scorpion  $\alpha$ -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 452–472, 2007.

GURROLA, G. B. et al. Imperatoxin a, a cell-penetrating peptide from scorpion venom, as a probe of  $Ca^{2+}$ -release channels/ryanodine receptors. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 4, p. 1093–1107, 2010.

HAUKE, T. J.; HERZIG, V. Dangerous arachnids—Fake news or reality? **Toxicon**, v. 138, p. 173–183, 2017.

HE, Y. et al. *Manduca sexta* hemolymph protease-1 , activated by an unconventional non-proteolytic mechanism , mediates immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 84, p. 23–31, 2017.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HENRIQUES, C. et al. Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. **Analytical Methods**, v. 3, n. 9, p. 2148–2155, 2011.

HMED, B.; SERRIA, H. T.; MOUNIR, Z. K. Scorpion peptides: Potential use for new drug development. **Journal of Toxicology**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

HORTA, C. C. R. et al. Molecular, Immunological, and Biological Characterization of Tityus serrulatus Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2014.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

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

HUANG, H. et al. Cardiac voltage-gated ion channels in safety pharmacology: Review of the landscape leading to the CiPA initiative. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 87, p. 11–23, 2017.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. **Protein and Cell**, v. 1, n. 2, p. 143–152, 2010.

INCAMNOI, P. et al. Toxicon Heteromtoxin ( HmTx ), a novel heterodimeric phospholipase A 2 from Heterometrus laoticus scorpion venom. **Toxicon**, v. 61, p. 62–71, 2013.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 128–150, 2005.

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

KESKIN, N. A.; KOÇ, H. A study on venom proteins of Iurus dufourei asiaticus Birula, 1903 (Scorpiones: Iuridae). **Turkish Society for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 59–61, 2006.

KLUSSMANN-FRICKE, B. J.; PRENDINI, L.; WIRKNER, C. S. Evolutionary morphology of the hemolymph vascular system in scorpions: A character analysis. **Arthropod Structure and Development**, v. 41, n. 6, p. 545–560, 2012.

KRAYEM, N.; GARGOURI, Y. Toxicon Scorpion venom phospholipases A 2 : A minireview. **Toxicon**, v. 184, p. 48–54, 2020.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 1979, 1970.

LINARDI, A. et al. Histological and functional renal alterations caused by Bothrops alternatus snake venom: Expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 9, p. 895–906, 2011.

LOK, W. et al. Peptides Transcriptomic and proteomic analyses of venom glands from scorpions *Liocheles australasiae* , *Mesobuthus martensii* , and *Scorpio maurus palmatus*. **Peptides**, v. 146, n. 170643, p. 1–7, 2021.

LOUATI, H. et al. A thermoactive secreted phospholipase A2 purified from the venom glands of *Scorpio maurus*: Relation between the kinetic properties and the hemolytic activity. **Toxicon**, v. 72, p. 133–142, 2013.

LOURENÇO, W. R. Biogéographie des espèces du groupe naturel «*Tityus clathratus*» (Chelicerata, Scorpiones, Buthidae). **Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. Section A, Zoologie, biologie et écologie animales**, v. 14, n. 2, p. 473–481, 1992.

LOURENÇO, W. R. Parthenogenesis in scorpion: some history - New Data. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 19–44, 2008.

LOURENÇO, W. R. Scorpion Diversity and Distribution: Past and Present Patterns. **Toxinology**, p. 1–20, 2013.

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

LOURENÇO, W. R. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 2018.

LUNA-RAMÍREZ, K. et al. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. **Toxicon**, v. 63, n. 1, p. 44–54, 2013.

MA, H. et al. Protease inhibitor in scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom prolongs the biological activities of the crude venom. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 8, p. 607–614, 2016.

MACÊDO, J. K. A. **Análise da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, com ênfase na caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral**. [s.l.] Dissertação de mestrado: Universidade de Brasília, 2011.

MACKRILL, J. J. Ryanodine receptor calcium release channels: An evolutionary perspective. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 740, p. 159–182, 2002.

MAGALHÃES, M. R. **Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri***. [s.l.] Tese de Doutorado: Universidade de Brasília, 2017.

MARTINS, M. R. R. et al. Escorpiões: Biologia e Acidentes. **Revista Científica Eletônica De Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1–7, 2008.

MATTOS, V. F. et al. High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. **Chromosome Research**, v. 21, n. 2, p. 121–136, 2013.

MEKI, A. R. M. A.; NASSAR, A. Y.; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, v. 16, n. 8, p. 1359–1365, 1995.

MENG, L. et al. Ion channel modulation by scorpion hemolymph and its defensin ingredients highlights origin of neurotoxins in telson formed in Paleozoic scorpions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 351–363, 2020.

MERCHANT, M. et al. Characterization of antibacterial activities of hemolymph from the desert hairy scorpion, *Hadrurus arizonensis*. **Journal of Arachnology**, v. 49, n. 2, p. 191–197, 2021.

MOEZ, A. S. et al. Novel mutant phospholipase D from *Hemiscorpius lepturus* acts as A highly immunogen in BALB/c mice against the lethality of scorpion venom. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–20, 2020.

MONTEIRO, W. M. et al. Perspectives and recommendations towards evidence-based health care for scorpion sting envenoming in the Brazilian Amazon: A comprehensive review. **Toxicon**, v. 169, p. 68–80, 2019.

MORADI, M. et al. Remarkable apoptotic pathway of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on CT26 cell line. **Cell Biology and Toxicology**, v. 35, n. 4, p. 373–385, 2019.

MOUHAT, S. et al. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. **Biochemical Journal**, v. 378, n. 3, p. 717–726, 2004.

NAVIDPOUR, S. Psammophilic scorpions in deserts of Iran. **Global Journal of Zoology**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2021.

NENCIONI, A. L. A. et al. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 2018.

NOSRATI, R. et al. The effects of zinc treatment on matrix metalloproteinases: A systematic review. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 56, n. 2, p. 107–115, 2019.

OLIVEIRA-MENDES, B. B. R. DE et al. CPP-Ts: a new intracellular calcium channel modulator and a promising tool for drug delivery in cancer cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

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

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

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

PARENTE, A. M. S. et al. Analogs of the scorpion venom peptide Stigmurin: Structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2018.

PEDRON, C. N. et al. Arg-substituted VmCT1 analogs reveals promising candidate for the development of new antichagasic agent. **Parasitology**, v. 147, n. 14, p. 1810–1818, 2020.

PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Bioorganic & Medicinal Chemistry Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738–2758, 2018.

PIMENTA, R. J. G. et al. Selected to survive and kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian yellow scorpion. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–10, 2019.

PIMENTEL, P. M. DE O. et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom as a potential drug source for Chagas' disease: Trypanocidal and immunomodulatory activity. **Clinical Immunology**, v. 226, n. 3, p. 1–12, 2021.

PUCCA, M. B. et al. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272–284, 2015.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328–342, 2013.

RAMÍREZ-CARRETO, S. et al. Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. **Peptides**, v. 34, n. 2, p. 290–295, 2012.

RANASINGHE, S.; MCMANUS, D. P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 39, n. 3, p. 219–227, 2013.

RECKZIEGEL, G. C.; PINTO JUNIOR, V. L. Análise do escorpionismo no Brasil no período de 2000 a 2010. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 1, p. 67–68, 2014.

REIN, J. O. **The Scorpion Files**. Disponível em: <<https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

RJEIBI, I. et al. Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. **Peptides**, v. 32, n. 4, p. 656–663, 2011.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 171–180, 2007.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; VIDAL, N.; POSSANI, L. D. **Scorpion Peptides**. Second ed. San Diego EUA: Academic Press, 2013.

ROMERO-GUTIERREZ, T. et al. A deeper examination of *thorellius atrox* scorpion venom components with omic technologies. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 1–23, 2017.

SAIKIA, D.; MAJUMDAR, S.; MUKHERJEE, A. K. Mechanism of in vivo anticoagulant and haemolytic activity by a neutral phospholipase A2 purified from *Daboia russelii russelii* venom: Correlation with clinical manifestations in Russell's Viper envenomed patients. **Toxicon**, v. 76, p. 291–300, 2013.

SALAMA, W. M.; SHARSHAR, K. M. Surveillance study on scorpion species in Egypt and comparison of their crude venom protein profiles. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, n. 2, p. 76–86, 2013.

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

SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E. et al. Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. **Toxins**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.

SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; FRANCKE, O. F.; PRENDINI, L. Shining a light into the world's deepest caves: phylogenetic systematics of the troglobiotic scorpion genus *Alacran* Francke, 1982 (Typhlochactidae:Alacraninae). **Invertebrate Systematics**, v. 28, n. 6, p. 643–664, 2014.

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

SANTUSSI, W. M. et al. Antifungal Activity against filamentous fungi of Ts1, a multifunctional toxin from *tityus serrulatus* scorpion venom. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1–15, 2017.

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

SCHENDEL, V. et al. The diversity of venom: The importance of behavior and venom system morphology in understanding its ecology and evolution. **Toxins**, v. 11, n. 666, p. 1–22, 2019.

SCHIAVON, E. et al. Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by  $\beta$ -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 283–293, 2012.

SEYEDIAN, R. et al. Toxicon Enzymatic analysis of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 521–525, 2010.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SITGES, M.; POSSANI, L. D.; BAYON, A. Noxiustoxin, a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K<sup>+</sup> permeability. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 1570–1574, 1986.

SOEIRO, P. A. et al. Doxycycline treatment reestablishes renal function of Wistar rats in experimental envenomation with *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 199, n. 5, p. 20–30, 2021.

SOMAY DOĞAN, T. et al. Peptidomic characterization and bioactivity of *Protophormus kraepelini* (Scorpiones: Iuridae) venom. **Turkish Journal of Biology**, v. 42, n. 6, p. 490–497, 2018.

STOCKMANN, R. Introduction to scorpion biology and ecology. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. (Eds.). **Scorpion Venoms**. New York: Springer Reference, 2015. p. 25–59.

STRICKLAND, M. et al. Relationships between ion channels, mitochondrial functions and inflammation in human aging. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 158, p. 1–22, 2019.

TORREZ, P. P. Q. et al. Scorpionism in Brazil: Exponential growth of accidents and deaths from scorpion stings. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. 20180350, p. 1–3, 2019.

UTKIN, Y. N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 28, 2015.

VALDEZ-CRUZ, N. A.; BATISTA, C. V. F.; POSSANI, L. D. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 8, p. 1453–1464, 2004.

VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

VARIKUTI, S. et al. Host-directed drug therapies for neglected tropical diseases caused by protozoan parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2655, p. 1–18, 2018.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 1–12, 2016.

WADDINGTON, J.; RUDKIN, D. M.; DUNLOP, J. A. A new mid-Silurian aquatic scorpion - One step closer to land? **Biology Letters**, v. 11, n. 1, p. 1–23, 2015.

WALKER, A. A. et al. Deadly Proteomes : A Practical Guide to Proteotranscriptomics of Animal Venoms. **Proteomics and Systems Biology**, v. 1900324, p. 1–21, 2020.

WARD, M. J.; ELLSWORTH, S. A.; NYSTROM, G. S. A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. **Toxicon**, v. 151, n. 7, p. 137–155, 2018.

WENDRUFF, A. J. et al. A Silurian ancestral scorpion with fossilised internal anatomy illustrating a pathway to arachnid terrestrialisation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2020.

XIAO, L. et al. Structure-function relationships of peptides forming the calxin family of ryanodine receptor ligands. **Journal of General Physiology**, v. 147, n. 5, p. 375–394, 2016.

YAMAZAKI, L. et al. *Tityus paraguayensis* (Scorpiones: Buthidae) em copas de *Callisthene fasciculata* (Vochysiaceae) no Pantanal de Mato Grosso (Brasil) *Tityus paraguayensis* (Scorpiones: Buthidae) in the canopies of *Callisthene fasciculata* (Vochoy. **Acta Biol. Par., Curitiba**, v. 44, n. 3–4, p. 153–158, 2015.

YAQOOB, R. et al. Partial characterization of venom from common buthid scorpions (Scorpion: Buthidae) of District Sargodha, Pakistan. **Biologia (Pakistan)**, v. 63, n. 1, p. 13–19, 2017.

ZARGAN, J. et al. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 91, n. 1, p. 447–454, 2011.

ZENG, X. C. et al. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: Gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 44–51, 2012.

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

ZHAO, R. et al. SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2011.

ZHENG, S. P. et al. Self-Assembled Artificial Ion-Channels toward Natural Selection of Functions. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 60, n. 2, p. 566–597, 2021.

ZHONG, J. et al. Transcriptomic analysis of the venom glands from the scorpion *Hadogenes troglodytes* revealed unique and extremely high diversity of the venom peptides. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 40–62, 2017.

ZHU, S. et al. Evolutionary diversification of *Mesobuthus*  $\alpha$ -scorpion toxins affecting sodium channels. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2012.

ZOUARI, N. et al. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: The scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 67–74, 2005.