



**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**EFEITO DA PEÇONHA DE *Tityus confluens* BORELLI, 1899 (BUTHIDAE) SOBRE A
ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO DE LINFÓCITOS E
PLAQUETAS DE RATOS**

Dissertação de Mestrado

Romário da Silva Portilho

Campo Grande, MS, Brasil

2024

**EFEITO DA PEÇONHA DE *Tityus confluens* BORELLI, 1899 (BUTHIDAE) SOBRE A
ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO DE LINFÓCITOS E
PLAQUETAS DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Fundação Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

Aluno: Romário da Silva Portilho

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto
Otsubo Jaques

Co-orientador: Prof. Dr. Malson Neilson
de Lucena

**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**EFEITO DA PEÇONHA DE *Tityus confluens* BORELLI, 1899 (BUTHIDAE) SOBRE A
ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO DE LINFÓCITOS E
PLAQUETAS DE RATOS**

elaborado por
Romário da Silva Portilho

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jeandre Augusto Otsubo Jaques
(Presidente/Orientador)

Profa. Dra. Manuela Berto Pucca (UNESP)

Profa. Dra. Rosélia Maria Spanevello (UFPel)

**Campo Grande, MS
2024**

Dedico este trabalho primeiramente a minha querida mãe Maria (em memória) que sempre me incentivou a buscar conhecimento, a mim por não ter desistido apesar de todas as intempéries da vida e aos meus bons amigos de outrora, aos que fiz durante essa caminhada e principalmente aos que ficaram.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jeandre Augusto Otsubo Jaques, que me conduziu em todo o meu processo de aprendizado nesse período do mestrado, obrigado pela paciência e por me mostrar o quanto evolui e que posso ser cada vez melhor.

Ao Coorientador Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena, que desde meu projeto de iniciação científica (IC) esteve presente na minha trajetória acadêmica e que contribuiu para que esse trabalho pudesse ser concebido e executado. Obrigado professor, por todos esses anos de orientações e ensinamentos.

Aos meus ‘purinofriends’ Andreza Negreli, Eduarda Freitas, Igor Leal e Matheus Stanley, por toda ajuda desprendida por cada um para que essa pesquisa pudesse acontecer, obrigado por de alguma forma contribuírem com o nosso trabalho e pelos momentos de descontração. Em especial ao Igor, que assim como o professor Malson, me orienta desde a IC, obrigado por toda ajuda, incentivo, orientações e pela amizade construída.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que foi minha casa por 7 anos e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de investir na produção do conhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e que não foram citadas nominalmente.

RESUMO

EFEITO DA PEÇONHA DE *Tityus confluens* BORELLI, 1899 (BUTHIDAE) SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO DE LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE RATOS

AUTOR: Romário da Silva Portilho

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jeandre Augusto Otsubo Jaques

Componentes da sinalização purinérgica estão envolvidos na mediação de respostas hemostáticas e inflamatórias, ambas afetadas no envenenamento escorpiônico. Peçonhas de escorpião são misturas complexas que contêm várias toxinas tais como peptídeos, enzimas e nucleotídeos. Estudos prévios indicam que toxinas presentes na peçonha de escorpião afetam componentes do sistema purinérgico, incluindo receptores purinérgicos. Além disso, já foi relatada a presença putativa de ectonucleotidases na peçonha de escorpião. Este estudo investigou a capacidade da peçonha de *Tityus confluens* (10, 50 e 100 µg/ mL) de metabolizar nucleotídeos de adenina e o seu efeito na atividade de enzimas purinérgicas em linfócitos e plaquetas de ratos. Foram analisados os efeitos da peçonha de *T. confluens* sobre a atividade da E-NTPDase (hidrólise de ATP e ADP), E-5'-NT (hidrólise de AMP), e E-ADA (hidrólise de ADO). Os resultados revelaram que a peçonha bruta de *T. confluens* exibiu atividade de hidrólise de ATP em todas as concentrações testadas. Em linfócitos, a hidrólise de ADP foi inibida com 100 µg/mL de peçonha, enquanto a hidrólise de ADO aumentou em todas as concentrações testadas. Em plaquetas, a hidrólise de ATP foi inibida com 100 µg/ mL de peçonha, enquanto a hidrólise de AMP e ADP foi inibida em todas as concentrações testadas. Considerando os dados coletivamente, eles sugerem que a peçonha promove o aumento dos níveis extracelulares de ATP e a redução dos níveis extracelulares de ADO, o que é compatível com as manifestações clínicas do envenenamento escorpiônico, que é caracterizado por gerar um meio pró-inflamatório. Este estudo destaca a atividade intrínseca de hidrólise de ATP pela peçonha de *T. confluens* e a sua habilidade de modular a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-NT e E-ADA em células sanguíneas de ratos.

Palavras-chave: Escorpionismo; Ectonucleotidases; Linfócitos; Plaquetas; Sistema purinérgico.

ABSTRACT

EFFECT OF THE VINSON OF *Tityus confluens* BORELLI, 1899 (BUTHIDAE) ON THE ACTIVITY OF ENZYMES OF THE PURINERGIC SYSTEM OF LYMPHOCYTES AND PLATELETS OF RATS

AUTHOR: Romário da Silva Portilho

SUPERVISOR: Prof. Dr. Jeandre Augusto Otsubo Jaques

Purinergic signaling pathways play crucial roles in regulating hemostatic and inflammatory responses, both of which are impacted by scorpion envenomation. Scorpion venoms are complex mixtures containing various toxins such as peptides, enzymes, and nucleotides. Previous studies have highlighted the influence of scorpion venom toxins on purinergic signaling, including purinergic receptors, and have identified putative ectonucleotidases within venom compositions. This study aimed to investigate the capacity of *Tityus confluens* scorpion venom (10, 50 and 100 µg/mL) to metabolize adenine nucleotides and its potential effects on purinergic enzyme activity in rat blood cells, specifically platelets and lymphocytes. The effects of *T. confluens* venom on the activity of E-NTPDase (ATP and ADP hydrolysis), E-5'-NT (AMP hydrolysis), and E-ADA (ADO hydrolysis) were analyzed. Results revealed that crude venom from *T. confluens* exhibited ATP nucleotide hydrolysis activity across all tested concentrations. In lymphocytes, ADP hydrolysis was inhibited at 100 µg/mL, while ADO hydrolysis was increased across all concentrations of venom. In platelets, ATP hydrolysis was inhibited at 100 µg/mL of venom, whereas AMP and ADO hydrolysis were inhibited across all concentrations. When considering these findings collectively, the data suggests an elevation in extracellular ATP levels and a reduction in extracellular ADO, aligning with clinical manifestations of envenomation characterized by a proinflammatory milieu. This study underscores the intrinsic ATPase activity of *T. confluens* venom and its ability to modulate the activity of E-NTPDase, E-5'-NT, and E-ADA in rat blood cells.

Keywords: Scorpionism; Ectonucleotidases; Lymphocytes; Platelets; Purinergic system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Diagrama esquemático representativo da filogenia dos artrópodes.....	17
Figura 2 – Morfologia de um escorpião, com vista dorsal e ventral.....	19
Figura 3 – Distribuição global dos escorpiões.....	20
Figura 4 – Escorpião da espécie <i>Tityus confluens</i>	22
Figura 5 – Representação da estrutura molecular de canais para sódio dependentes de Voltagem.....	29
Figura 6 – Representação dos componentes da via purinérgica.....	33
Figura 7 – Receptores purinérgicos.....	35
Figura 8 – Receptores P1 de adenosina.....	36

CAPÍTULO II

MANUSCRITO

Figure 1 – Effect of <i>T. confluens</i> crude venom on E-NTPDase activity in lymphocytes...	78
Figure 2 – Effect of <i>T. confluens</i> crude venom on E-ADA activity in lymphocytes	79
Figure 3 – Effect of <i>T. confluens</i> crude venom on the E-NTPDase activity of rat platelets.....	80
Figure 4 – Effect of <i>T. confluens</i> crude venom on E-5'-NT activity of rat platelets	81
Figure 5 – Effect of <i>T. confluens</i> crude venom on E-ADA activity in platelets	82

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Nível de gravidade dos sintomas apresentados após o envenenamento escorpiônico, manifestações clínicas e tratamento.....	24
Tabela 2 – Neurotoxinas caracterizadas da peçonha do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	31

CAPITULO II

MANUSCRITO

Tabela 1 – Hydrolysis of adenine nucleotides and adenosine by the crude venom of <i>T. confluens</i>	83
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
A1	Receptor purinérgico para adenosina
AC	Adenilil-ciclase
ADA	Adenosina desaminase
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CD73	Cluster de diferenciação 73
CD39	Cluster de diferenciação 39
Cl ⁻	Íon cloreto
COOH	Carboxil terminal
Cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
DAG	Diacilglicerol
E-5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA	Ecto-adenosina desaminase
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato/difosfohidrolase
E-NPP	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
K ⁺	Íon potássio
Mg ²⁺	Íon magnésio
Na ⁺	Íon sódio
Zn ²⁺	Íon zinco
IP ₃	Inositol trifosfato
PLC	Fosfolipase C
P1R	Receptor purinérgico de adenosina
P2R	Receptor purinérgico

P2X	Receptores purinérgicos ionotrópicos
P2Y	Receptores purinérgicos metabotrópico
Ts1	Fração 1 da toxina de <i>Tityus serrulatus</i>
UTP	Uridina trifosfato
UDP	Uridina 5'-difosfato
UDP-glicose	Glicose uracil-difosfato
PANX1	Canal transportador de ATP do tipo panexina 1
TM	Domínios transmembranares
NH ₂	Amino terminal
NK	Célula natural <i>killer</i>
MS	Ministério da Saúde
SAE	Soro antiescorpiônico
SAA	Soro antiaracnídeo
DBPs	Do Inglês, “ <i>Disulfide-bridged peptides</i> ”
NDBPs	Do Inglês, “ <i>Non-disulfide-bridged peptides</i> ”
PBMC	Do Inglês, “ <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> ”
G-CSF	Do Inglês, “ <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> ”
TsTx	Toxina de <i>Tityus serrulatus</i>
NTx	Neurotoxina
SNC	Sistema nervoso central
K _m	Constante de Michaelis-Menten
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IFN- γ	Interferon-gama
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
PLC β	Fosfolipase C β
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
INBIO	Instituto de Biociências

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Escorpiões.....	17
1.1.1 Morfologia escorpiônica.....	18
1.1.2 Escorpionismo: envenenamento humano por picada de escorpião.....	19
1.1.3 Diversidade escorpiônica: espécie <i>Tityus confluens</i>	22
1.1.4 Escorpionismo: epidemiologia do Brasil.....	22
1.1.5 Escorpionismo: manifestações clínicas.....	23
1.1.6 Escorpionismo: conduta terapêutica.....	25
1.1.7 Peçonha escorpiônica.....	25
1.1.7.1 Peçonha escorpiônica: componentes e interações com o organismo humano.....	26
1.1.7.2 Peçonha escorpiônica: peptídeos com ação neurotóxica.....	27
1.1.7.3 Ação das toxinas em canais iônicos.....	28
1.1.7.4 Ação das toxinas no organismo humano.....	31
1.2 Sistema purinérgico.....	32
1.2.1 O ATP como mensageiro celular.....	32
1.2.2 Receptores purinérgicos ou purinoreceptores.....	34
1.2.2.1 Receptores P1 de adenosina.....	35
1.2.2.2 Receptores P2Y.....	37
1.2.2.3 Receptores P2X.....	38
1.2.3 Ectonucleotidasas	39
1.2.3.1 NTPDase.....	39
1.2.3.2 E-5'-NT.....	40
1.2.4 ADA.....	41
1.2.5 A relação do sistema purinérgico com o sistema imunológico.....	41
1.2.6 Sistema purinérgico e eventos de tromborregulação.....	43
2 OBJETIVOS	46
REFERÊNCIAS.....	47

CAPÍTULO II

MANUSCRITO

1 INTRODUCCION.....	58
2 MATERIAL AND METHODS.....	60
3 RESULTS	64
4 DISCUSSION.....	65
5 CONCLUSIONS.....	68
REFERENCES.....	69
FIGURE CAPTIONS.....	77
ANEXOS.....	84

APRESENTAÇÃO

Os resultados encontrados nesta dissertação estão apresentados em capítulos. O capítulo I diz respeito a revisão bibliográfica acerca do tema da pesquisa, os objetivos e as referências do capítulo.

O capítulo II contém o artigo original, no idioma Inglês com os itens: introduction, material and methods, results, discussion, conclusion and references.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os acidentes com escorpiões representam um grave problema de saúde pública, sendo a espécie *Tityus serrulatus*, da família Buthidae, a maior causadora de acidentes escorpiônicos devido a sua ampla distribuição no território nacional, capacidade adaptativa ao ambiente urbano e a toxicidade dos componentes da sua peçonha (Gomes *et al.*, 2022). No estado de Mato Grosso do Sul, além do *T. serrulatus*, destaca-se também a presença do escorpião *Tityus confluens*, espécie muito comum do Chaco, que possui coloração amarelada e até 53 mm de comprimento (Bertani *et al.*, 2005; Lourenço; Cabral; Ramos, 2004).

A peçonha escorpiônica possui uma variedade de componentes biologicamente ativos e já foi associada com atividades antimicrobiana, anticâncer e pró-inflamatória (Santussi *et al.*, 2017; Bernardes-Oliveira *et al.*, 2019). O peptídeo Ts1, por exemplo, identificado na peçonha de *T. serrulatus*, apresentou atividade antifúngica (Gomes *et al.*, 2022).

As toxinas presentes na peçonha escorpiônica interagem com canais iônicos da membrana celular provocando a sua despolarização, causando a liberação de neurotransmissores e a ativação de diversas vias de transdução de sinal (Menegasso, 2013). Os canais iônicos para sódio afetados pelos componentes da peçonha são canais dependentes de voltagem e desempenham papel fundamental na geração e propagação do potencial de ação e consequentemente do impulso nervoso (Santussi *et al.*, 2017).

As células excitáveis, como as células do sistema nervoso, respondem a alterações no potencial de membrana, aumentando a permeabilidade aos íons. Assim, outros canais dependentes de voltagem são ativados, como os canais de cálcio, causando o influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático. Essa liberação de cálcio está diretamente relacionada a fenômenos contráteis e secretórios, bem como a liberação de neurotransmissores dos terminais sinápticos, sendo um dos eventos celulares desencadeados por íons Ca^{2+} , ocasionando mobilização das vesículas sinápticas e liberação de várias moléculas por exocitose (Brazil, Porto, 2010; Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

Assim, por meio da ativação de canais dependentes de voltagem, a neurotoxina Ts1 provoca a despolarização das membranas celulares, causando a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Portanto, observa-se efeitos adrenérgicos e colinérgicos através das manifestações clínicas após o envenenamento escorpiônico (Parrela *et al.*, 2022). A ACh causa aumento de secreção nasal, lacrimal, salivar e sudorípara, além de espasmos musculares. Já as catecolaminas provocam efeitos adrenérgicos,

que envolvem aumento da pressão arterial sistêmica, constrição dos vasos periféricos, edema pulmonar agudo em casos graves, insuficiência e arritmias cardíacas que podem evoluir para o choque (Gomes *et al.*, 2022).

A inoculação da peçonha dá início à uma série de eventos que envolvem várias cascatas de sinalização celular e um dos sistemas envolvidos na mediação de processos que são desencadeados durante o envenenamento escorpiónico é o sistema purinérgico, que é responsável pela hidrólise de nucleotídeos como o ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina. Essas moléculas medeiam processos biológicos importantes em vários tecidos e órgãos no organismo humano como agregação plaquetária, recrutamento de células do sistema imune, ativação do processo inflamatório, entre outros (Macedo, 2020; Parrela *et al.*, 2022). No entanto ainda não há registros de trabalhos que demonstrem o papel das enzimas do sistema purinérgico no envenenamento escorpiónico.

O sistema purinérgico é uma via de comunicação extracelular que contém moléculas sinalizadoras, receptores que são ativados por essas moléculas e enzimas que cessam a transdução de sinal proporcionada pela ligação dos nucleotídeos ou do nucleosídeo de adenina ao seu receptor. As principais moléculas de sinalização extracelular dessa via são o trifosfato de adenosina (ATP) e a adenosina (ADO), que é produto da hidrólise do ATP (Burnstock, 2017).

Os receptores purinérgicos são divididos em duas famílias, P1 e P2, e cada família apresenta um agonista preferencial, podendo ser o ATP, o UTP, o ADP, o AMP, a ADO dentre outros. Ao se ligarem aos receptores específicos de membrana plasmática, promovem a ativação do receptor e a transdução de sinal (Cardoso; Manfredi; Maciel, 2021).

Os níveis extracelulares dessas moléculas sinalizadoras são controlados por ectoenzimas de membrana que possuem o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. As enzimas que possuem nucleotídeos como substrato são denominadas ectonucleotidases e compreendem quatro famílias: as ectonucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDases); as ectonucleosídeo-pirofosfatases/fosfodiesterases (E-NPPs); as fosfatase alcalinas; e as ecto-5'-nucleotidases (E-5'-NT). A enzima ecto-adenosina desaminase (E-ADA) hidrolisa o nucleosídeo adenosina em inosina (Cardoso; Manfredi; Maciel, 2021).

A enzima E-5'-NT, responsável pela hidrólise de AMP em ADO, já foi identificada na peçonha escorpiónica de *Centruroides limpidus* por meio de análises de proteômica e transcriptômica. No entanto, ainda não está clara a função desta enzima para o animal (Cid-Uribe *et al.*, 2019).

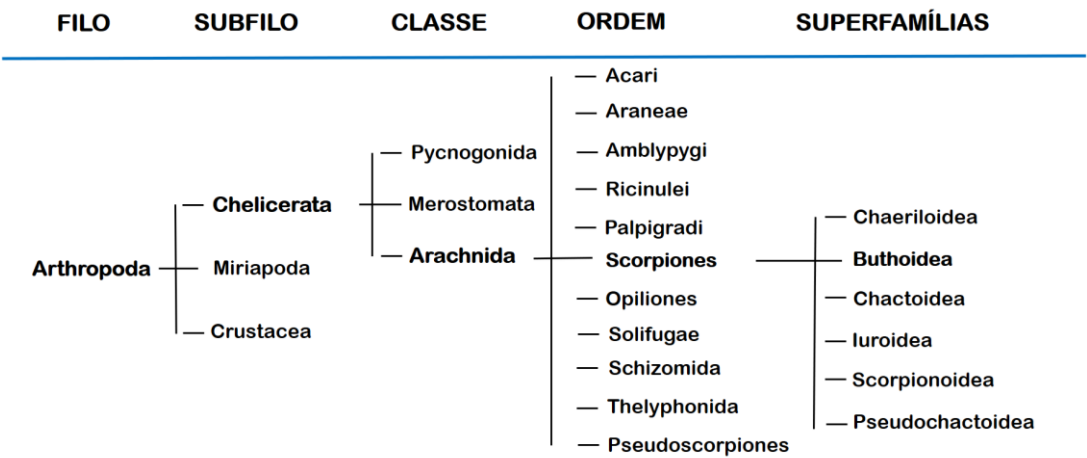
A estimulação celular desencadeada pela peçonha induz a expressão e o recrutamento de células do sistema imune, tais como linfócitos T, B e células *natural killer* (NK). Um estudo realizado em modelo animal (camundongo) com o TsV (veneno de *Tityus serrulatus*) sozinho, nas concentrações 50 e 100 µg/mL foi capaz de desencadear a produção massiva da interleucina IL-6, uma citocina que regula a resposta inflamatória (Casella-Martins *et al.*, 2015).

Nesta pesquisa pretende-se investigar se existem componentes na peçonha do escorpião da espécie *T. confluens* que possam hidrolisar os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina (ATP, ADP, AMP e ADO). Adicionalmente, pretende-se investigar se enzimas do sistema purinérgico, tais como a E-NTPDase, E-5'-NT e E-ADA, expressas em linfócitos e plaquetas, são sensíveis aos componentes da peçonha do escorpião da espécie *T. confluens*.

1.1 Escorpiões

Os escorpiões são classificados como animais invertebrados, artrópodes de ambiente terrestre, quelicerados, que pertencem a classe arachnida (assim como as aranhas) e ordem scorpiones (Figura 1). Esta ordem é dividida em 14 famílias e atualmente já foram identificadas mais de 2.700 espécies, distribuídas por todos os continentes, com exceção dos polos, com a sua ocorrência na maioria das vezes em regiões tropicais e subtropicais (Rein, 2023; Schoch *et al.*, 2020). Estudos sobre o período Siluriano revelam que os escorpiões surgiram há 450 milhões de anos no ambiente marinho, sendo considerados os artrópodes mais antigos ainda existentes e os primeiros a conquistarem o ambiente terrestre (Brazil; Porto, 2010).

Figura 1 – Diagrama esquemático representativo da classificação dos artrópodes



Fonte: (Adaptado de Marcussi; Arantes; Soares, 2011.)

A ampla distribuição deste grupo é explicada pela capacidade de adaptação a diferentes ambientes, como o ambiente urbano. Por exemplo, comumente os escorpiões vivem em uma temperatura entre 20 °C e 37 °C, mas podem sobreviver a temperaturas extremas (abaixo de 0 °C e acima de 50 °C). Isso ocorre, pois, seu exoesqueleto dificulta a perda de água em ambientes áridos (Brazil, Porto, 2010; Gomes, 2022).

Os escorpiões possuem hábito noturno. Além disso, eles são carnívoros, com práticas de canibalismo sendo comuns; predam insetos tais como baratas e aracnídeos como aranhas, além de preda animais maiores e até mesmo vertebrados (Marcussi; Arantes; Soares, 2011; Santos, 2022).

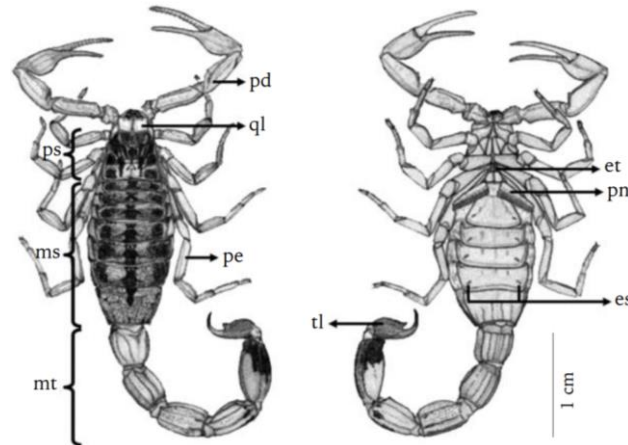
Os escorpiões podem ser encontrados em lugares escuros, entre frestas, em terrenos baldios, embaixo de pedras, madeiras, entulhos, telhas e tijolos empilhados em construção, troncos e folhas secas. Nesses locais onde passam grande parte do dia, a umidade e a oferta de presas são condições importantes para o seu estabelecimento. Seus principais predadores naturais são macacos, quatis, aves (seriemas, galinhas e corujas), anuros e lagartos (Brasil, 2009; Brazil; Porto, 2010).

A reprodução dos escorpiões pode ocorrer de forma sexuada, necessitando de um macho e uma fêmea para que haja fecundação do óvulo e a geração de uma nova prole; e de forma assexuada pelo processo denominado de partenogênese. A partenogênese é um processo reprodutivo cujo óvulo se desenvolve sem a fertilização do macho, considerado um fenômeno raro entre os quelicerados (Lourenço, 2008; Lourenço; Cuellar, 1995).

1.1.1 Morfologia escorpiônica

A estrutura morfológica dos escorpiões apresenta muita semelhança com a de seus ancestrais. O seu corpo é revestido por uma estrutura rígida e quitinosa que protege os órgãos internos e é a base de sustentação para vários receptores sensitivos. O corpo é dividido anatomicamente em prossoma (cefalotórax) e opistossoma (abdome), com o opistossoma dividido em mesossoma (tronco) e metassoma (cauda) (Figura 2). Os sistemas fisiológicos presentes no escorpião são: sistema nervoso, circulatório, respiratório, reprodutivo e digestivo (Brasil, 2009; Brazil, Porto, 2010; Marcussi *et al.*, 2011).

Figura 2 – Morfologia de um escorpião, com vista dorsal e ventral



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: (Candido *et al.*, 2005).

O cefalotórax é curto e revestido por carapaça, apresentando seis extremidades articuladas com um par de quelíceras utilizados para rasgar e triturar o alimento, um par de pedipalpos que funcionam como pinças utilizadas para dominar sua presa, e quatro pares de pernas; possui olhos primitivos na região dorsal e lateral que produzem imagens distorcidas, mas são importantes para a manutenção e regulação do ciclo claro e escuro do animal (Brasil, 2009; Brazil; Porto, 2010).

O opistossoma é dividido em duas regiões, o mesossoma e o metassoma. No primeiro são encontrados sete tergitos, o opérculo genital na região ventral, o estigma pulmonar, os receptores sensitivos e uma estrutura denominada de pectíneas que se assemelha a um pente, responsável por captar vibrações do ar e solo, movimentos de presas e predadores; já o metassoma é formado por cinco segmentos e no final da estrutura está localizado o télson, o qual apresenta um par de glândulas produtoras das toxinas e outros componentes da peçonha. Essas glândulas desembocam em dois orifícios situados na ponta de um ferrão (aguilhão), pelo qual os escorpiões injetam a peçonha em suas presas (Brasil, 2009).

Os escorpiões trocam de cutícula na medida que vão crescendo, processo conhecido como ecdise, até alcançarem a maturidade sexual quando então param de crescer. Estudos realizados com a espécie *Tityus serrulatus* em cativeiro observaram que essa espécie passa por aproximadamente 5 ecdises, até atingir a maturidade sexual (Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

1.1.2 Escorpionismo: envenenamento humano por picada de escorpião

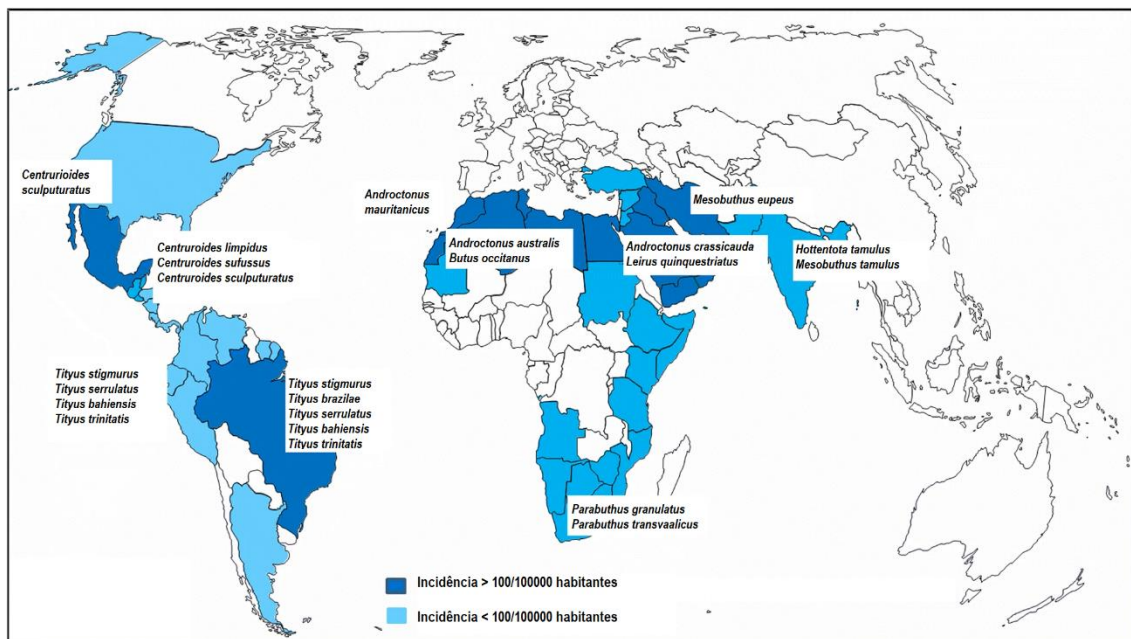
Os acidentes com escorpiões ou escorpiônismo – quadro de envenenamento humano causado pelas toxinas da peçonha escorpiônica – representam um grave problema de saúde

pública, principalmente em países subdesenvolvidos e com o clima tropical ou subtropical, sendo as espécies do gênero *Tityus* as principais causadoras de acidentes escorpiônicos no país dada a sua ampla distribuição no território nacional e em decorrência da toxicidade de sua peçonha (Gomes, 2022; Parrela *et al.*, 2022).

Os escorpiões são responsáveis por causar inúmeros acidentes de envenenamento humano, e dados recentes apontam que aproximadamente 1,2 milhão de notificações são registradas anualmente. A gravidade das manifestações clínicas varia de acordo a composição da peçonha, que é variável e depende de fatores ambientais, alimentares e a espécie do animal (Abroug *et al.*, 2020; Chippaux, 2008; Pucca *et al.*, 2014).

Apesar da variedade de espécies existentes, a maioria dos escorpiões capazes de causar envenenamento humano pertencem a família Buthidae. Na região norte do continente africano são encontradas espécies dos gêneros *Androctonus* e *Buthus*; já na região sul do gênero *Parabuthus*; na Índia do gênero *Mesobuthus*; na América do Sul do gênero *Tityus* (principal causador de escorpionismo no Brasil); e o gênero *Centruroides* na América do Norte e América Central (Figura 3) (Abroug *et al.*, 2020; Bortoluzzi *et al.*, 2007).

Figura 3 – Distribuição global dos escorpiões



Fonte: (Adaptado de Abroug *et al.*, 2020).

A família Buthidae apresenta cerca de 34 espécies consideradas potencialmente perigosas para o homem devido aos peptídeos neurotóxicos encontrados em sua peçonha. Em todo o país, as espécies que provocam a maior parte dos acidentes são *T. serrulatus* (escorpião-

amarelo), *Tityus bahiensis* (escorpião-marrom) e *Tityus stigmurus* (escorpião-do-nordeste) e *Tityus obscurus* (escorpião-negro) (Araújo *et al.*, 2017; Bortoluzzi *et al.*, 2007; Brazil; Porto, 2010; Gomes, 2022).

A espécie *T. serrulatus*, popularmente conhecida como escorpião-amarelo, é o causador da maioria dos casos graves de envenenamento por escorpiões no Brasil; normalmente os animais desta espécie na fase adulta medem aproximadamente 5 a 7 centímetro (cm) de comprimento, apresentam uma serrilha no quarto seguimento da cauda, o que confere o nome da espécie. Com ampla distribuição em regiões como Sudeste, Nordeste e Sul, sua ocorrência foi registrada em pelo menos 19 dos 27 estados do Brasil, com ocorrência em países como Equador e Argentina (Bortoluzzi *et al.*, 2007; Cologna *et al.*, 2009; Guerra-Duarte *et al.*, 2023; Lourenço, 2022).

O escorpião *T. stigmurus* está distribuído predominantemente na região nordeste, com relatos nos estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Bahia, Pernambuco e na ilha de Fernando de Noronha, e já existem relatos dessa espécie na região sudeste, no município de São Paulo; apresenta cor marrom-dourada ou marrom-amarelada medindo entre 4,5 a 6 cm de comprimento. Assim como o escorpião *T. serrulatus*, o *T. stigmurus* também é predominantemente partenogenético (Furtado *et al.*, 2020; Guerra-Duarte *et al.*, 2023; Lourenço, 2008; Lourenço, 2022).

O nome do escorpião *T. bahiensis* pode sugerir que a sua distribuição geográfica original inclui o estado da Bahia, entretanto essa espécie está distribuída nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, assim como Argentina e Paraguai; mede aproximadamente 6 a 7 cm de comprimento, possui uma coloração marrom-avermelhada, bem como as pontas dos pedipalpos e o aguilhão são marrons ou pretos, o que é uma forma de identificação da espécie. Em contraste com as duas espécies anteriormente referidas, o *T. bahiensis* se reproduz de forma sexuada (Lourenço, 2015; Miyamoto *et al.*, 2018).

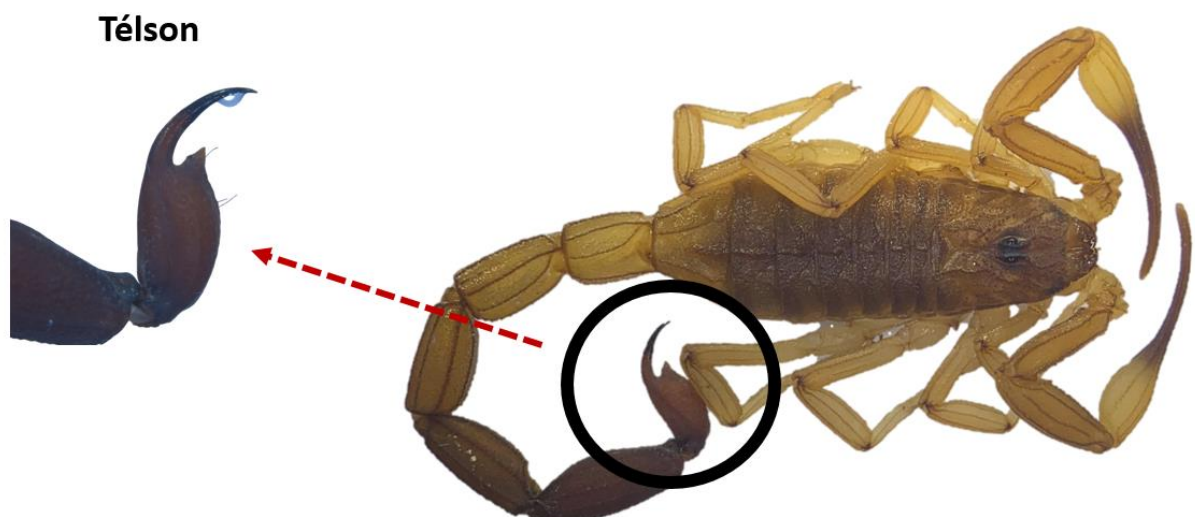
Por fim, o *T. obscurus*, comumente conhecido como escorpião negro da Amazônia, é o causador de escorpionismo na região norte do Brasil, estando distribuído nos estados do Amazonas, Amapá, Pará e Mato Grosso. É considerado uma das maiores espécies do gênero *Tityus* medindo aproximadamente 6,5 a 10 cm, com coloração preta, corpo achatado e os dedos dos pedipalpos finos. Com reprodução sexuada, essa espécie é considerada menos tóxica que o *T. serrulatus*, entretanto após o envenenamento humano causado pelo *T. obscurus*, apresenta sintoma descrito como ‘choque elétrico’ em 89% dos pacientes picados pela espécie referida (Brazil; Porto, 2010; Guerra-Duarte *et al.*, 2023; Nishikawa *et al.*, 1994; Pardal *et al.*, 2014).

1.1.3 Diversidade escorpiônica: espécie *Tityus confluens*

Devido as suas semelhanças morfológicas, várias espécies são notificadas de forma equivocada ou subnotificadas, que é o caso de espécies como *Tityus trivitattus*, *T. confluens* e *T. serrulatus*. Animais das espécies *T. serrulatus* e *T. confluens* são facilmente confundidos, devido a sua coloração amarela e tamanho semelhante (Lourenço; Cabral; Ramos, 2004).

Em 1899, Borelli descreveu *T. confluens* como uma subespécie do escorpião *T. trivitattus*. Somente em 1974, que *T. confluens* passou a ser considerada uma espécie distinta, corroborada por Lourenço em 1980 através de características morfológicas que distinguem *T. confluens* das demais espécies. *T. confluens* (Figura 4) é um escorpião que mede entre 50-60 mm de comprimento, considerado mediano em relação às outras espécies da família, com coloração em tons de amarelo e marrom (Lourenço; Cabral; Ramos, 2004).

Figura 4 – Escorpião: *Tityus confluens*



Fonte: Foto de acervo pessoal. A seta em vermelho destaca o aparato inoculador da peçonha escorpiônica, o télson.

1.1.4 Escorpionismo: epidemiologia do Brasil

Os países Latino-Americanos como o Brasil, o Equador, a Colômbia e o Peru possuem a maior diversidade de escorpiões do planeta. No Brasil, os aracnídeos possuem aproximadamente 6.500 espécies diferentes, sendo as aranhas, os ácaros, opiliões e os escorpiões como responsáveis por essa diversidade (Brasil; Porto, 2010).

Segundo o Ministério da saúde (MS), no período de 2018 a 2022 cerca de 810.231 mil casos de acidentes causados por escorpiões ocorreram no Brasil, sendo outubro o mês com maior número de notificações de acidentes (80.651 mil casos). Tais acidentes ocorrem em

diferentes regiões do país com proporções diferentes: no biênio 2021 e 2022; a região Nordeste apresentou 69.787 casos; a região Sudeste 77.033 casos; e a região Sul e Centro-Oeste um total de 12.160 casos (Brasil, 2019). O Estado de Mato Grosso do Sul registrou durante o período de 2019 a 2022 cerca de 11.554 notificações de casos de envenenamento escorpionico e o país todo nesse mesmo período registrou 786.821 casos de acidentes (Sinan, 2022).

1.1.5 Escorpionismo: manifestações clínicas

O escorpionismo pode ser fatal em alguns casos dependendo da gravidade clínica, que está relacionada a fatores como faixa etária e condições imunológicas do acidentado. Após a inoculação da peçonha, as toxinas presentes em sua composição podem causar alterações tanto locais quanto sistêmicas tais como efeitos gastrointestinais, neurológicos, inflamatórios, cardíacos e pulmonares, podendo levar à morte (Carmo *et al.*, 2019; Chippaux, 2012; Chippaux; Goyffon, 2008).

Entre os componentes da peçonha, as neurotoxinas são as mais ativas biologicamente, pois induzem a liberação maciça de mediadores tais como neurotransmissores e catecolaminas, o que ocorre em decorrência da estimulação do sistema nervoso autônomo. Essa liberação de mediadores causa a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, e promove o recrutamento de células do sistema imune causando uma resposta sistêmica do organismo (Pucca *et al.*, 2015).

Os efeitos das catecolaminas sobre o sistema simpático incluem hipertensão, taquicardia, hiperglicemia, midríase, hipertermia, agitação, inquietação e graves efeitos cardíacos, enquanto os efeitos parassimpáticos causados pela ACh podem induzir lacrimejamento, miose, hipersalivação, sudorese profusa, vômitos, diarreia, bradicardia, hipotensão, priapismo e aumento das secreções respiratórias. No envenenamento grave, que geralmente ocorre em crianças e idosos, a hipertensão é seguida de hipotensão, assim como a taquicardia seguida de bradicardia, conforme predominem os efeitos simpáticos ou parassimpáticos (Gomes, 2022; Pucca *et al.*, 2015).

Magalhães e colaboradores (1999) realizaram estudos e demonstraram que o envenenamento escorpionico em humanos causa liberação e aumento da concentração de citocinas tais como a interleucina 6 (IL-6), interferon gama (IFN- γ) e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), o que está intimamente relacionado com o nível de gravidade do envenenamento. Ainda, estudos com camundongos demonstraram que a peçonha do gênero *Tityus* induz alterações sistêmicas caracterizadas por alterações no número de células em órgãos linfoides e aumento de citocinas pró e anti-inflamatórias tais como a IL-10, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Adi-Bessalem; Hammoudi-Triki; Laraba-Djebari, 2015). A

liberação de citocinas e óxido nítrico (NO) por macrófagos foi analisada em estudos de Zoccal *et al.* (2011) onde identificaram que as toxinas TsV, Ts1 e Ts6 de *T. serrulatus*, estimulam a liberação de IL-6, TNF- α e NO em células da linhagem celular J774a.1 (Zoccal *et al.*, 2011).

Em conjunto, estes diferentes mediadores que participam do processo inflamatório causam a quimiotaxia promovendo o recrutamento de neutrófilos e outras células do sistema imune e representam os principais mecanismos inflamatórios que são desencadeados durante o envenenamento escorpiónico (Pucca *et al.*, 2015; Rita *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas são classificadas de acordo com a gravidade dos sintomas apresentados, variando em nível leve, moderado e grave (Tabela 1). A sintomatologia do nível leve se restringe ao local da picada com sensação de dor e inchaço; o nível moderado ocorre quando existem sintomas locais e sistêmicos de baixa intensidade e o nível grave apresenta sintomas sistêmicos de alta intensidade (Abroug *et al.*, 2020; Cupo, 2015).

Tabela 1 – Nível de gravidade dos sintomas apresentados após o envenenamento escorpiónico, manifestações clínicas e tratamento.

GRAVIDADE	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	TRATAMENTO
Leve	Dor local de intensidade variável, eritema, parestesia, sudorese, náusea e agitação	Observação por 6 a 12 horas. Administração de analgésicos e compressa local quente ou bloqueio anestésico local
Moderada	Vômitos, hipertensão, taquicardia ou bradicardia, e sialorréia	Administração de SAA ou SAE* 2 a 3 ampolas
Grave	Vômitos profusos, aumento das secreções, priapismo, arritmias cardíacas, hipertensão ou hipotensão, taquicardia ou bradicardia insuficiência cardíaca, edema pulmonar, coma e morte	Administração de SAA ou SAE 4 a 6 ampolas

SAE: soro antiescorpiónico; SAA: soro antiaracnídico (antiveneno indicado para o tratamento de acidentes moderados e graves causados por aranhas do gênero *Loxosceles*, *Phoneutria*, *Tityus*).

Fontes: (Adaptado de Brasil, 2001; Chippaux, 2012).

As manifestações clínicas locais podem ser dor intensa, irradiada ou não, inchaço, vermelhidão leve no local, bem como calafrios, espasmo, formigamento e queimação. A principal abordagem terapêutica baseia-se no alívio da dor pela administração de analgésicos. Já as manifestações sistêmicas são caracterizadas por hipertensão ou hipotensão, sudorese excessiva, aumento das secreções lacrimal, nasal, salivar, cefaleia, alterações visuais, vômitos, arritmias cardíacas, edema pulmonar, falência de órgãos e morte (Chippaux, 2008; Cupo, 2015).

1.1.6 Escorpionismo: conduta terapêutica

Em um acidente com escorpião, o tratamento é realizado de acordo com a gravidade das manifestações clínicas, com tratamento específico (soro antiescorpiônico, SAE) e sintomático, para mitigação dos sintomas com o uso de analgésicos e anestésicos locais, acompanhado de observação de 6 horas do paciente a fim de avaliar a progressão dos sintomas (terapia de suporte) (Chippaux, 2012; Chippaux; Goyffon, 2008; Cupo, 2015).

A soroterapia é realizada quando a gravidade é considerada moderada e grave, tendo objetivo de neutralizar as toxinas na circulação sanguínea. Cada frasco/ampola do soro contém 5,0 mg/mL, sendo que cada mL neutraliza 1,0 mg de veneno. O soro antiescorpiônico é uma solução purificada de anticorpos desenvolvida para uso no envenenamento por escorpião do gênero *Tityus*. A eficácia da terapia com o soro depende do tempo entre a ocorrência do acidente até a administração do soro (Brasil, 2001; Chippaux, 2012; Cupo, 2015; Volitzki; Gaggini, 2021). O soro heterólogo utilizado para neutralizar a ação das toxinas pode causar reações alérgicas, bem como pode não ser eficaz para todas as espécies, em razão da ampla diversidade da fauna escorpiônica em todas as regiões do Brasil.

1.1.7 Peçonha escorpiônica

As toxinas presentes na peçonha possuem a função de defesa contra predadores e predação para a sua alimentação (Brasil, 2009; Marcussi; Arantes; Soares, 2011). A peçonha pode ser obtida através da maceração da glândula ou estimulação elétrica do télson do animal. Com aspecto leitoso e solúvel em água, é uma substância mucosa, opalescente. A parte solúvel é uma mistura complexa composta de muitas proteínas básicas de baixa massa molecular. Por centrifugação pode-se obter uma fração insolúvel, que pode conter toxinas (Chippaux; Goyffon, 2008; Pucca *et al.*, 2015).

O termo veneno – *poison* em inglês – é utilizado para caracterizar animais venenosos. Entretanto, o termo veneno refere-se a qualquer mistura que contenha substâncias tóxicas, produzidas por glândulas ou tecido, mas que podem também ser adquiridas ou ingeridas do ambiente ou de outros animais, plantas ou microrganismos, e que não podem ser inoculadas devido a falta do aparato inoculador. São exemplos de animais venenosos os sapos, as rãs e os lagartos (Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

Já o termo peçonha – *venom* em inglês – caracteriza qualquer mistura que contenha substâncias tóxicas, produzida por uma glândula ou célula especializada, que esteja conectada ao aparato inocular, e são exemplos de animais peçonhentos os escorpiões, as cobras e as aranhas (Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

1.1.7.1 Peçonha escorpiônica: componentes e interações com o organismo humano

De maneira geral os componentes presentes na peçonha podem ser divididos em moléculas proteicas e moléculas não proteicas, sendo os peptídeos e enzimas as classes mais amplamente estudadas (Furtado *et al.*, 2020). Além disso, na composição da peçonha podem ser encontrados, por exemplo, mucopolissacarídeos, sais inorgânicos, lipídeos, aminas, nucleotídeos, enzimas, moléculas de baixa massa molecular, inibidores de proteases, peptídeos natriuréticos, peptídeos neurotóxicos e peptídeos com ligações dissulfeto (*disulfide-bridged peptides*, DBPs) e sem ligações dissulfeto (*nondisulfide-bridged peptides*, NDBPs). Essa variedade de moléculas depende de vários fatores, principalmente do gênero, da espécie, do habitat e da alimentação do animal (Jiménez-Vargas; Possani; Luna-Ramírez, 2017; Pucca *et al.*, 2015).

Dentre as enzimas presentes na peçonha escorpiônica estão as hialuronidasas, fosfolipases, serinoproteases, metaloproteases e enzimas conversoras de angiotensina (Pereira; Pereira, 2017). Um estudo realizado por So *et al.*, (2021) avaliou a composição da peçonha de três escorpiões de espécies diferentes (*Mesobuthus martensii*, *Scorpio maurus palmatus* e *Liocheles australasiae*) e identificou que os componentes mais comuns encontrados na peçonha escorpiônica são as toxinas de origem proteica tais como as proteases.

Pessini *et al.* (2001) identificou hialuronidasas na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, *T. stigmurus* e *T. bahiensis*. Estas enzimas atuam como um fator de espalhamento das toxinas por degradação da matriz extracelular dos vasos sanguíneos (Furtado *et al.*, 2020). Da mesma forma atuam as metaloproteínas, como as Zn-metaloproteases identificadas em diversos escorpiões da família Buthidae, responsável por causar inflamação de alguns órgãos, como o pâncreas (Ortiz *et al.*, 2014).

Um estudo de transcriptoma e proteoma da peçonha de *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879), um escorpião encontrado no México, identificou uma diversidade de transcritos para a ecto-5'-nucleotidase, importante enzima de uma via de comunicação celular mediada por nucleotídeos extracelulares, responsável pela hidrólise de AMP em ADO, realizando assim o controle das concentrações de ADO do meio extracelular. Esta enzima foi identificada inicialmente em peçonha de serpentes onde se conjectura serem onipresentes, e nesses animais peçonhentos a E-5'-NT é conhecida por induzir a liberação de purinas na presa/vítima potencializando hipotensão e paralisia através da ativação dos receptores purinérgicos (Cid-Uribe *et al.*, 2019; Dhananjaya; D'Souza, 2010). Assim, mais estudos devem ser realizados para compreender melhor a função dessa enzima para o envenenamento escorpiônico.

As toxinas que interagem com os canais iônicos são classificadas de acordo com características tais como o tamanho da cadeia polipeptídica, o mecanismo de ação, a especificidade, e pela presença ou não de ligações dissulfeto. As ligações dissulfeto dos peptídeos neurotóxicos possuem a capacidade de alterar a permeabilidade dos canais iônicos em células excitáveis e não excitáveis. No escorpião *Hadogenes troglodytes*, por exemplo, foram estimados por meio de análise transcriptômica aproximadamente 3000 peptídeos DBPs e 200 NDBPs e ainda se estima que existam centenas de peptídeos presentes em sua peçonha que ainda não foram caracterizados (Zhong *et al.*, 2017).

1.1.7.2 Peçonha escorpiônica: peptídeos com ação neurotóxica

Os peptídeos são as moléculas responsáveis pelos efeitos neurotóxicos no escorpionismo e têm como alvo os canais iônicos presentes na membrana plasmática, tais como canais dependentes de voltagem permeáveis aos íons sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e cloro (Cl^-) (Possani *et al.*, 1999a; Quintero-Hernández *et al.*, 2013). Atualmente são conhecidas 400 neurotoxinas escorpiônicas, sendo 200 neurotoxinas que atuam em canais de sódio, 150 em canais de potássio, 19 em canais de cloro e apenas 10 toxinas descritas afetam canais de cálcio (Carvalho, 2013).

Os peptídeos encontrados na peçonha podem ser classificados em peptídeos com ligações dissulfeto (DBPs) que têm como alvo principal os canais iônicos ligados à membrana e peptídeos sem ligações dissulfeto (NDBPs) que exibem atividades multifuncionais (Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

A maioria dos DBPs contém de três a quatro ligações dissulfeto com 28-120 resíduos de aminoácidos, são divididos em quatro famílias diferentes de acordo com o tipo de canais de membrana que interagem e podem ser os canais Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- . Esses canais são responsáveis por regular a homeostase celular, e alterações no seu funcionamento pode resultar nos sintomas desenvolvidos em mamíferos durante o escorpionismo (Almaaytah; Albalas, 2014; Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

Essas toxinas interagem com sítios específicos dos canais iônicos, afetando a abertura ou fechamento do canal, podendo também alterar a conformação e a afinidade de ligação à toxina de outros sítios receptores. A ligação de toxinas ao sítio receptor 1 (presente em canais para sódio dependentes de voltagem) causa o bloqueio físico do poro do canal, impedindo assim a condutância ao sódio. Assim como, a ligação de toxinas ao sítio 5, causa potenciais de ação espontâneos e bloqueiam a inativação do canal (Catterall *et al.*, 2007; Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

Estudos cinéticos foram realizados com toxinas isoladas do escorpião *Leiurus quinquestriatus* e mostraram que os peptídeos eram capazes de alterar a cinética de fechamento dos canais de sódio, prolongando assim o potencial de ação, modificando o mecanismo de inativação dos canais iônicos. Esses canais possuem a função de manter a homeostase celular, e uma alteração em sua atividade pode desencadear efeitos sistêmicos no organismo (Possani *et al.*, 1999).

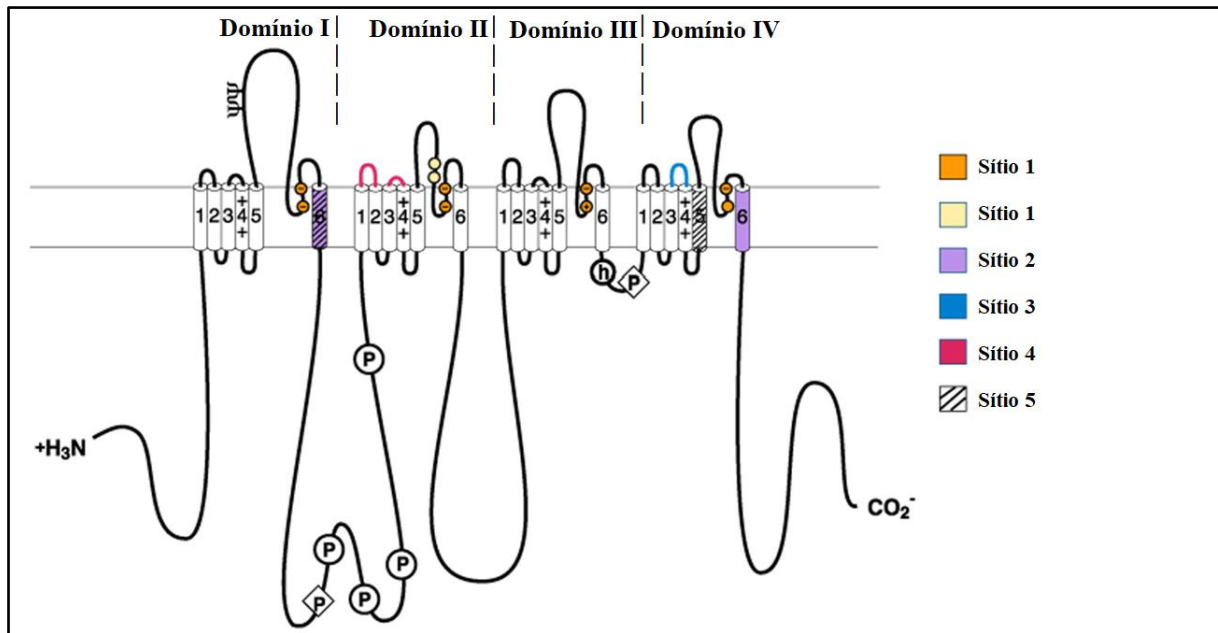
Em contraste, os NDBPs são constituídos de 13 a 56 resíduos de aminoácidos e exibem atividade contra vários alvos biológicos, com multifuncionalidade, e até então, várias funções biológicas foram relatadas aos NDBPs, incluindo atividade antimalárica, antiviral, hemolítica, inseticidas, imunomoduladoras e anticancerígenas. Hadrurin, o primeiro NDBP de escorpião a demonstrar atividades antimicrobianas é um peptídeo de 41 aminoácidos e foi isolado do veneno do escorpião *Hadrurus aztecus*. Esse peptídeo foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em concentrações micromolares (10–50 μM). Sua diversidade biológica e estrutural são fatores importantes se estudar e caracterizar os NDBPs (Almaaytah; Albalas, 2014; Marcussi; Arantes; Soares, 2011; Torres-Larios *et al.*, 2000).

1.1.7.3 Ação das toxinas em canais iônicos

Os canais iônicos são proteínas transmembranares formadoras de poros, responsáveis pelo controle da permeabilidade e seletividade da membrana aos íons, atuam na manutenção de diversos processos fisiológicos tais como o controle da excitabilidade das células neuronais, a contração muscular e cardíaca, a proliferação celular, etc (Marcussi; Arantes; Soares, 2011). Eles apresentam uma grande diversidade estrutural e funcional e de acordo com o mecanismo de controle da abertura e fechamento destes canais, são classificados em: i) canais voltagem dependentes: realizam a abertura e fechamento a depender do potencial de membrana; ii) canais dependentes de ligante: realizam a abertura e fechamento na presença de um ligante específico; iii) canais mecanicamente sensíveis: realizam a abertura e fechamento em decorrência do estiramento da membrana na qual estão inseridos (Pereira; Pereira, 2017).

As toxinas que modificam a função dos canais iônicos atuam inibindo o fluxo de íons através do canal por meio de um bloqueio mecânico do poro, ou podem agir em sítios extracelulares, como em *loops* específicos modificando a movimentação do sensor de voltagem, alterando a relação entre variações de voltagem e ativação/inativação dos canais (Catterall, 1980; Kalia *et al.*, 2015). Diversos sítios receptores para neurotoxinas já foram identificados como o sítio de ligação 1 onde se liga a tetrodotoxina, uma neurotoxina que bloqueia o poro do canal, inibindo o transporte de sódio (Figura 5) (Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

Figura 5 – Representação da estrutura de canais para sódio dependentes de voltagem



Fonte: Figura adaptada de Catterall *et al.*, (2007).

A maioria das toxinas que agem em canais para sódio são compostas de 61-70 resíduos de aminoácidos, sua estrutura é estabilizada por 3 a 4 ligações dissulfeto e são separadas em dois tipos principais, as α -neurotoxinas e as β -neurotoxinas, com base em seus efeitos farmacológicos nos canais de sódio, verificados por meio de análises eletrofisiológicas e por suas características de ligação. As α toxinas bloqueiam o sítio três dos canais de sódio, e as β -toxinas bloqueiam o sítio quatro dos canais independentemente do potencial de membrana, afetando assim a sua ativação (Possani *et al.*, 1999b; Vega; Possani, 2005).

Este canal compreende uma subunidade α e uma ou mais subunidades β auxiliares. A subunidade α consiste em quatro domínios homólogos designados I-IV. Cada domínio é composto por seis segmentos helicoidais transmembranais (S1-S6), que estão representados por cilindros. O poro central é formado pelos segmentos transmembranais S5 e S6, e o seguimento S4 de todos os domínios é o sensor de voltagem. As toxinas interagem com sítios específicos que estão localizados entre os domínios de 1-4 e os segmentos 1-6. O sítio 1 está localizado entre os S5-S6 e é local de ligação da neurotoxina tetrodotoxina. O sítio 2 está presente nos domínios 1-3 em S6 e é local de ligação da neurotoxina veratridina. O sítio 3 está presente no domínio 4 entre S3-S4 e é local de ligação das α -neurotoxinas escorpiônicas. Já o sítio 4 está presente no domínio 2 entre S3-S4 e é local de ligação das β -neurotoxinas escorpiônicas (Figura 5) (Catterall *et al.*, 2007; Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

Os canais para potássio são divididos em quatro grandes famílias, com várias toxinas caracterizadas que atuam nesses canais controlando a permeabilidade da membrana ao íon K^+ . O seu bloqueio ocorre pela ligação de uma toxina a um sítio localizado na face externa do canal, ocasionando o bloqueio físico do poro condutor de potássio (Tytgat *et al.*, 1999). Esses canais são importantes para a regulação do potencial de membrana em processos biológicos tais como o metabolismo celular, a liberação de neurotransmissores, a secreção de hormônios e a ativação de linfócitos (Pereira; Pereira, 2017).

As toxinas que agem em canais para potássio são peptídeos que contêm entre 20-70 resíduos de aminoácidos. Entretanto, a maioria possui menos que 40, e a composição de sua estrutura primária é altamente diversificada. São compactadas por três ou quatro ligações dissulfeto, e a primeira toxina deste tipo foi identificada na peçonha do escorpião *Centruroides noxius*, denominada de noxiustoxina NTx (Nieto *et al.*, 1996). Na Tabela 2 pode-se observar algumas neurotoxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* que atuam sobre os canais de sódio e potássio.

Tabela 2 – Neurotoxinas caracterizadas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Canal iônico	Toxina	Efeitos provocados
Canais para sódio	Ts3 α -NaTx	Provoca liberação de neurotransmissores (especialmente catecolaminas e ACh), além da liberação de NO (óxido nítrico) para induzir o relaxamento muscular em corpos cavernosos
	Ts1 β -NaTx	Despolarização da membrana de nervos periféricos em <i>Xenopus laevis</i> , induzindo atividade espontânea que cessa em poucos minutos
	Ts2 α -NaTx	Injeções em hipocampo provocam neurodegeneração; pode causar aumento da liberação de glutamato
	Ts5 α -NaTx	Promove a prolongação do potencial de ação em fibras mielinizadas de nervo vago de coelhos; induz liberação de NO; aumenta indiretamente a permeabilidade ao potássio; induz a liberação de catecolaminas
Canais para potássio	Ts6 α -KTx	Bloqueia a alta condutância de cálcio ativada por canais de potássio em células de Leydig. Sua estrutura permite que se insira na região dos poros de potássio de diversos canais de potássio
	Ts7 α -KTx	Em culturas de neurônios de mamíferos, é um potente e seletivo bloqueador de canal de potássio
	Ts8 β -KTx	Bloqueia canais de potássio voltagem dependentes em sinaptossomas de encéfalo de rato
	Ts9 α -KTx	Compete com a apamina em encéfalo de rato

Fonte: (Adaptado de Cologna *et al.*, 2009 e Bordon, 2014).

1.1.7.4 Ação das toxinas no organismo humano

Essas toxinas atuam sobre estruturas nervosas, como no sistema nervoso central (SNC) e periférico, canais iônicos pré-sinápticos e pós-sinápticos das terminações nervosas, causando massiva liberação de neurotransmissores que são as moléculas responsáveis pela excitação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. A desregulação do potencial elétrico das células desencadeia cascatas de sinalização que resultam nos sinais e sintomas apresentados após o envenenamento escorpiônico (Pucca *et al.*, 2015; Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

Os principais efeitos causados pela ação das catecolaminas no sistema nervoso autônomo simpático são hipertensão, taquicardia, hiperglicemia, agitação, e efeitos no sistema

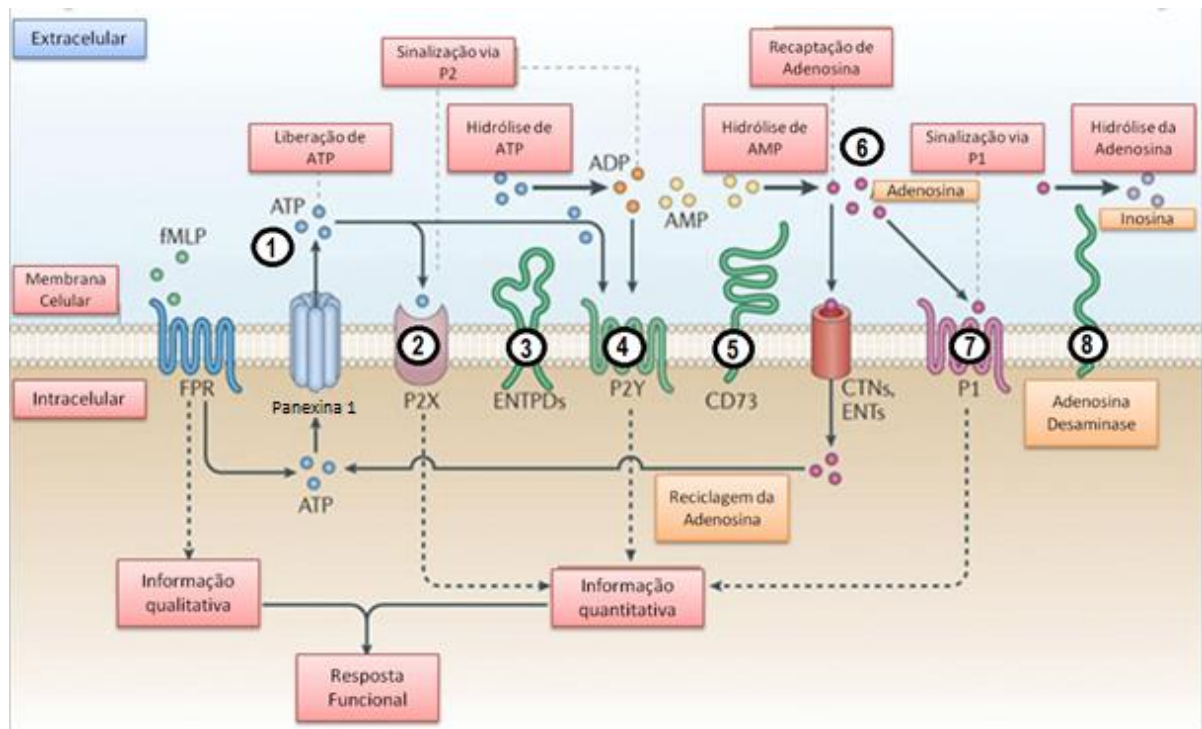
cardíaco onde tem efeito ionotrópicos e cronotrópicos pela ação da ACh e noraepinefrina. Já os efeitos da ACh no sistema parassimpático são aumento das secreções nasal, lagrimal, sudorípara, salivar, vômito, diarreia, bradicardia e hipotensão. Deve-se ressaltar que os sintomas variam de acordo com a idade, sistema imunológico da vítima e quantidade de peçonha inoculada, causando variações conforme predominam os efeitos colinérgicos ou adrenérgicos (Carmo *et al.*, 2019; Cupo, 2015; Pucca *et al.*, 2015).

1.2 Sistema purinérgico

1.2.1 O ATP como mensageiro celular

O sistema purinérgico é uma via de comunicação celular que envolve a sinalização mediada por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (Figura 6), como o ATP e a ADO. Essas moléculas atuam como sinais bioquímicos que desempenham papéis essenciais na regulação de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. Esse sistema é composto por moléculas sinalizadoras, receptores que são ativados por tais moléculas desencadeando uma variedade de sinalização celular, e enzimas que as hidrolisam, e consequentemente cessam assim a transdução de sinal (Burnstock, 1976; Burnstock, 2017; Zimmermann, 2021).

Figura 6 – Representação dos componentes da via purinérgica



1) liberação de ATP do meio intracelular através dos canais de panexina 1; 2) receptores ionotrópicos da família P2X, responsivos ao ATP; 3) ectoenzima da família E-NTPDase/CD39; 4) receptores metabotrópicos da família P2Y; 5) ectoenzima da família E-5'-NT/CD73; 6) desfosforilação do AMP pela CD73, resultando na inativação da sinalização mediada pelo ATP via receptores P2, e recaptção de ADO por canais transportadores; 7) receptor P1 de ADO; 8) adenosina desaminase (ADA), responsável pela desaminação da ADO em inosina. Adaptado de Junger (2011).

As moléculas sinalizadoras são inúmeras, tais como o ATP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), uridina-5'-trifosfato (UTP), uridina 5'-difosfato (UDP), glicose uracil-difosfato (UDP-glicose), entre outras, sendo o ATP a molécula mais conhecida, principalmente devido a sua importância no meio intracelular onde exerce função energética. A sinalização do ATP está presente em vários tipos celulares como neurônios, astrócitos, micróglias, células endoteliais, células do sistema imune, dentre outras (Burnstock, 2017). Já está bem estabelecido na literatura científica o papel do ATP como um neurotransmissor e cotransmissor, visto que o mesmo pode ser liberado juntamente com outros neurotransmissores, tais como a ACh, a dopamina, o glutamato, a noradrenalina e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Cardoso *et al.*, 2021).

O ATP está presente no meio intra e extracelular, e é proveniente do metabolismo celular, pode ser encontrado armazenado em vesículas sinápticas e/ou secretórias, em concentrações distintas; e, após despolarização da membrana de células neuronais, é liberado

para o meio extracelular. Todas as células do organismo podem liberar nucleotídeos de forma controlada por diferentes mecanismos fisiológicos, através de transportadores específicos, exocitose vesicular regulada e canais iônicos. Já a liberação dessas moléculas por mecanismos patológicos pode ocorrer por necrose e apoptose em decorrência do extravasamento após lise celular (Yegutkin, 2014).

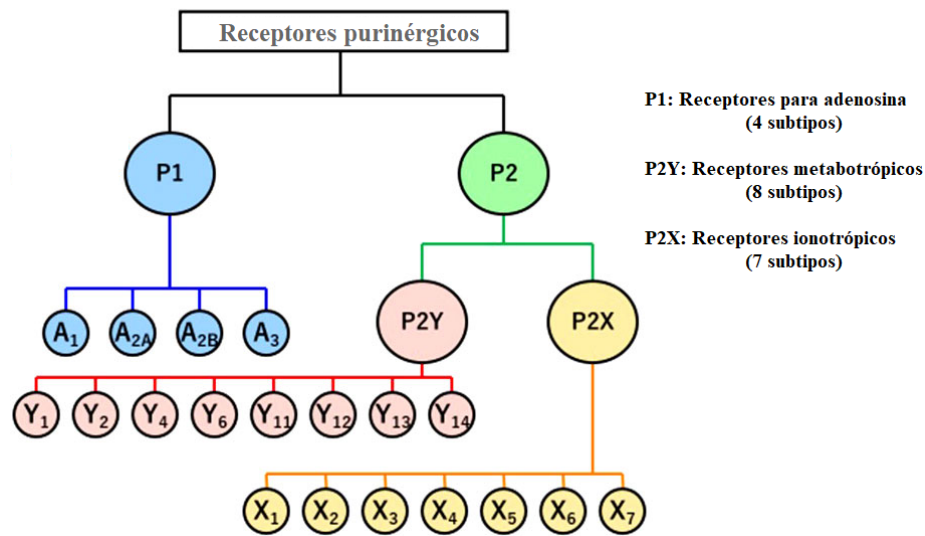
Alguns eventos patológicos podem estimular a liberação de ATP, como estresse mecânico ou metabólico, inflamação, hipóxia, acidose, injúria celular, necrose ou apoptose. O resultado da liberação dessa molécula é um ambiente rico em ATP, que promove a ativação de diversos receptores na própria célula, em células próximas ou distantes. Ainda, o ATP pode ser liberado por meio de canais permeáveis ao ATP, que permitem o seu efluxo passivo de acordo com seu gradiente eletroquímico. Os canais de panexina 1 (PANX1) e os hemicanais de conexina desempenham esse papel (Dossi; Rouach, 2021; Leybaert *et al.*, 2003).

A degradação das moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico é catalisada por ectoenzimas de forma sequencial dos nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos. Desse modo, após o nucleotídeo ATP ao se ligar no sítio ativo de receptores purinérgicos ele é sequencialmente hidrolisado em ADP, AMP, ADO, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico no meio extracelular (Zimmermann, 2021).

1.2.2 Receptores purinérgicos ou purinoreceptores

As moléculas que sinalizam o sistema purinérgico ativam receptores presentes na membrana plasmática, e estes são denominados purinoreceptores. Existem dois tipos de receptores envolvidos na sinalização purinérgica: os receptores P1 e P2, sendo o receptor P2 dividido em P2X e P2Y (Figura 7) (Burnstock, 2007; Fredholm, 2001).

Figura 7 – Receptores purinérgicos.

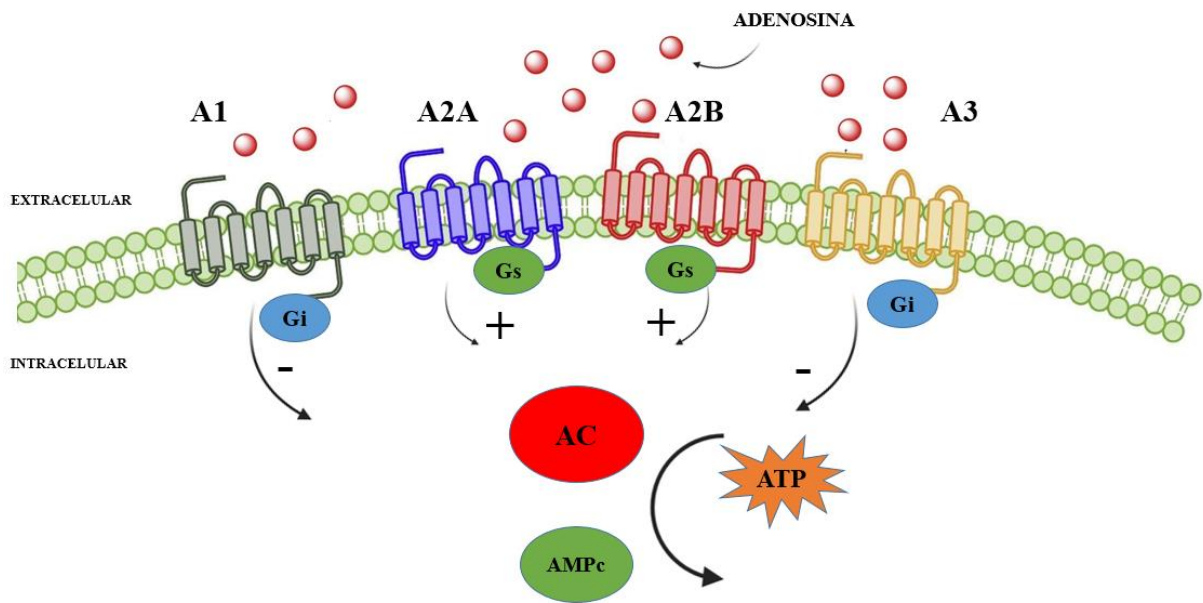


Fonte: Figura adaptada de Schulman, Nishi, Pelleg (2023).

1.2.2.1 Receptores P1 de adenosina

O tipo P1 é um receptor acoplado à proteína G (Figura 8); esta proteína de membrana regula a atividade de várias outras proteínas, como fosfolipase C (PLC), adenilil ciclase (AC), e canais iônicos, e é um tipo de receptor metabotrópico que inicia diversas etapas metabólicas para modular a atividade celular. Os receptores P1 contêm 4 subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ exibindo sete domínios transmembranares (TMI-TMVII), com o terminal amino (N-terminal/NH₂) voltado para o meio extracelular e o terminal carboxil (C-terminal/COOH) intracelular, formados por aminoácidos hidrofóbicos; o seu ligante natural é a ADO, entretanto, a inosina, um metabólito da desaminação da ADO, também pode ativar o subtipo A₃ (Burnstock, 2007; Fredholm, 2001; Ralevic; Burnstock, 1998).

Figura 8 – Receptores P1 de adenosina.



Fonte: Figura adaptada de Stagg, Smith (2010).

Cada subtipo está associado a um tipo de proteínas G, o que reflete na função fisiológica do receptor, com a ativação desses receptores modulando principalmente as concentrações de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Os receptores do tipo A1 e A3 podem ser acoplados às proteínas G_i/G_o, promovendo a inibição da adenilato ciclase o que leva a um declínio nos níveis intracelulares AMPc. Os receptores A2A e A2B estão acoplados à proteína G_s promovendo a ativação da enzima adenilato ciclase (Burnstock, 2007; Fredholm, 2001; Lamah *et al.*, 1990; Fredholm *et al.*, 2011). A ADO é o agonista dos receptores do tipo P1 e possui funções anti-inflamatória, neuromoduladora, de vasodilatação e antagonista da agregação plaquetária (Cardoso *et al.*, 2021).

Em condições fisiológicas, a ADO é formada tanto intracelularmente como extracelularmente, uma vez que a sua produção é mediada pela enzima ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), que desfosforila o AMP em ADO, tornando-se a última etapa da cadeia enzimática que catalisa a hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Quando os níveis de ADO estão aumentados no espaço extracelular, esse nucleosídeo é transportado para o interior da célula por transportadores, assim é fosforilada pela ADO quinase em AMP ou degradado em inosina pela adenosina desaminase (ADA). Já a ADO gerada no meio intracelular é transportada para o espaço extracelular através de transportadores bidirecionais específicos, equilibrando assim os níveis intra e extracelulares dessa molécula (Burnstock, 2007).

A superfamília dos receptores P1 está distribuída de forma geral em praticamente todos os tecidos tais como o tecido vascular, o nervoso e o cardíaco, sendo abundante no SNC em

regiões do cerebelo, do hipocampo, do tálamo, do tronco encefálico, do córtex cerebral, dentre outras regiões. Na região periférica, o receptor A1 é encontrado em fibras aferentes sensoriais primárias, principais fibras a detectar estímulos nociceptivos, bem como o receptor A2A é abundantemente expresso na membrana das células do músculo liso vascular, do endotélio e das plaquetas (Dixon *et al.*, 1996; Ralevic; Burnstock, 1998).

1.2.2.2 Receptores P2Y

A família dos receptores P2Y, assim como dos receptores P1, são caracterizados como um subtipo de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, e já foram descritos oito membros: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14. Eles apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, tais como no endotélio vascular, no sistema nervoso e no tecido cardíaco. Os subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 interagem com a proteína Gq/Gs, Go/G₁₁, e são responsáveis pela ativação da fosfolipase C-beta (PLC β) para produzir inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) com liberação de cálcio (Ca²⁺) do retículo sarcoplasmático, enquanto os receptores P2Y12, P2Y13 e P2Y14 geralmente estão associados à proteína Gi/Go, responsáveis pela inativação da AC, reduzindo os níveis de AMPc (Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock; Knight, 2004; Muller, 2002).

Ainda, os receptores P2Y podem ser divididos farmacologicamente aos nucleotídeos preferenciais em: receptores responsivos a nucleotídeos de adenina; receptores responsivos a nucleotídeos de uracila, UTP e UDP; receptores com seletividade mista e receptores que respondem apenas a compostos que contenham uracila difosfato com açúcares. Assim P2Y1, P2Y11 e P2Y13 respondem ao ATP e ao ADP; P2Y4 e P2Y6 respondem ao UTP e ao UDP; P2Y2 e P2Y4 respondem ao ATP e ao UTP; e, por fim, o receptor P2Y14 responde ao UDP-glicose e ao UDP-galactose (Abbracchio *et al.*, 2006).

O receptor P2Y2 é altamente expresso no tecido da musculatura vascular, em células do sistema imune e a sua expressão em células musculares lisas é regulada por agentes inflamatórios, como interleucina-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Assim como, nas células epiteliais, a ativação deste receptor aumenta a secreção de cloro (Cl⁻) e inibe a absorção de sódio (Burnstock, 2018; Hou *et al.*, 2000; Kellerman *et al.*, 2002). O receptor P2Y12 é expresso em regiões encefálicas, em células endoteliais, na musculares lisa e também é altamente expresso nas plaquetas, onde é o alvo molecular de medicamentos antiplaquetários, tais como o clopidogrel e o ticagrelor. Já o receptor P2Y13 é expresso na membrana das células do baço, da placenta, do fígado, do coração, da medula óssea,

de monócitos, de células T, do pulmão e de diversas regiões do encéfalo (Burnstock, 2018; Burnstock; Knight, 2004).

1.2.2.3 Receptores P2X

Os receptores P2X são canais iônicos controlados por ligantes, acoplados a membrana plasmática, caracterizados como canais ionotrópicos permeáveis aos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} e possuem 7 subtipos: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7; todos responsivos ao ATP. A ativação do receptor leva à despolarização da membrana e ao aumento da concentração intracelular do íon Ca^{2+} . O influxo de cálcio ativa vários processos intracelulares dependentes deste íon, como a contração muscular e a fusão de vesículas pré-sinápticas, resultando na liberação de neurotransmissores (Burnstock, 2018; Li *et al.*, 2009).

Estes receptores possuem dois domínios transmembranares, com os terminais amino e carboxil voltados para o meio intracelular unidos por uma extensa alça extracelular onde está localizado o sítio de ligação para o ATP; um receptor funcional é formado por 3 subunidades (α , β e γ), o que possibilita a formação de receptores homotriméricos ou heterotriméricos. Os homômeros formados pelos subtipos P2X1 e P2X3 da família P2X apresentam dessensibilização rápida, enquanto P2X2, P2X4, P2X7 produzem uma dessensibilização mais lenta, com relação a afinidade pelo seu ligante. A afinidade dos receptores P2X pelo seu ligante varia entre 1 e 10 μM , sendo que o receptor P2X7 é o único subtipo desta família que apresenta afinidade pelo ligante na faixa de 100 a 1000 μM (Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock, 2007; Burnstock, 2018).

Os receptores P2X são expressos em uma variedade de órgãos e tecidos, incluindo células musculares, células da glia, tecido epitelial, tecido ósseo e tecidos hematopoiéticos, sendo expresso mais de um subtipo em uma mesma célula ou tecido. O subtipo P2X1 é altamente expresso no músculo liso, no sistema cardíaco, nos vasos sanguíneos e nas plaquetas. Já os receptores P2X2 e P2X4 são encontrados em todo o sistema nervoso central e periférico, onde facilitam a neurotransmissão por ações pré-sinápticas e pós-sinápticas. O receptor P2X3 é encontrado predominantemente nos neurônios aferentes sensoriais do sistema nervoso periférico, onde medeia processos nociceptivos, tais como a transmissão de dor persistente, crônica, dor neuropática e inflamatória. No músculo esquelético é encontrado o receptor P2X5. O receptor P2X7 é expresso em células do sistema imune como mastócitos, macrófagos e linfócitos, onde participam da resposta imunológica (Burnstock; Kennedy, 2011; Khakh; North, 2006; Li *et al.*, 2009).

1.2.3 Ectonucleotidases

As concentrações das moléculas que realizam a sinalização pela via purinérgica são reguladas pela ação das ectoenzimas presentes na membrana plasmática celular, que possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas ectoenzimas fazem parte da família das ectonucleotidases, e são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos extracelulares e pela terminação de sinal extracelular (Cardoso *et al.*, 2021; Zimmermann, 2021a). A atividade catalítica máxima dessas enzimas depende da presença de cátions bivalentes tais como Ca^{2+} , magnésio (Mg^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) e os seus valores de K_m estão na faixa micromolar (Zimmermann, 2000).

Essas enzimas modulam as respostas celulares devido ao metabolismo extracelular dos nucleotídeos, através de reações sucessivas, constituindo uma cascata enzimática eficiente, por controlarem a concentração e o tempo que tais moléculas permanecem no meio. As ectonucleotidases incluem as E-NTPDases, as E-NPPs, as E-5'-NT (CD73), e as fosfatases alcalinas (Burnstock, 2017; Cardoso *et al.*, 2021; Zimmermann, 2021b). As ectonucleotidases podem apresentar-se ancorados a membrana plasmática, assim são denominadas ectoenzimas (E-), ainda, estarem acoplados a membrana plasmática das organelas ou na forma solúvel (Cardoso *et al.*, 2021)

Os nucleotídeos trifosfatados e difosfatados podem ser desfosforilados por membros da família E-NTPDase, E-NPP e fosfatases alcalinas, bem como os nucleotídeos monofosfatados são desfosforilados pela E-5'-NT, resultando na inativação da sinalização mediada pelo ATP via receptores P2, contribuindo assim com a sinalização mediada pela ADO, via receptores P1 (Cardoso *et al.*, 2021; Zimmermann, 2000).

1.2.3.1 NTPDase

As NTPDases compreendem um grupo de ectoenzimas que hidrolisam nucleosídeos tri e difosfatos extracelulares. A cadeia ou cascata da ectonucleotidase, iniciada pelas NTPDases, é terminada pela E-5'-NT. Atualmente, essa família de ectoenzimas é constituída de oito membros (NTPDase 1-8) e todas possuem a característica comum de desfosforilar nucleosídeos tri e difosfatos, mas não monofosfato. Essas enzimas possuem regiões altamente conservadas denominadas de “regiões conservadas da apirase (*apyrase conserved regions*, ACR)” que pode estar relacionada com a formação do seu sítio catalítico e a integridade estrutural da enzima (Grinthal; Guidotti, 2002).

Os subtipos de NTPDases diferem na localização celular e propriedades funcionais. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na superfície da membrana celular com seu sítio

catalítico voltados para o meio extracelular. Ainda, a isoforma NTPDase 1 é a mais estudada e também é conhecida como CD39; e as NTPDases 5 e 6 estão localizadas intracelularmente. Já as NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com seu sítio de ligação para o ligante voltado para o lúmen de organelas. Os domínios transmembranares das NTPDases 1, 2, 3 e 4 possuem o terminal NH₂ e COOH voltados para o meio intracelular (Robson *et al.*, 2006; Zimmermann, 2021).

Todos os subtipos dessa família de ectoenzimas estão amplamente distribuídos na maioria dos tecidos do organismo humano, entretanto, por vezes, cada subtipo apresenta características antagônicas aos membros da sua família. A NTPDase 1 está expressa em células endoteliais e em plaquetas e possui papel importante na regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese, pois seu sinergismo com a enzima 5'-NT, também presente na membrana de plaquetas, limita a progressão da agregação plaquetária intravascular. A NTPDase 2 é expressa nas células adventícias vasculares, e tem papel pró-agregante (Dwyer *et al.*, 2007; Grinthal; Guidotti, 2002).

Cada subtipo apresenta uma afinidade específica pelo substrato, variando na sua proporção de hidrólise de ATP e ADP ou GDP e UDP, entre outros nucleotídeos de purina e pirimidina. Em suma, a NTPDase 3 tem a sua expressão nos neurônios, onde conjectura-se que ela pode agir regulando os níveis de ATP na fenda pré-sináptica. A NTPDase 5 está localizada no retículo sarcoplasmático; a NTPDase 6 localiza-se na membrana do complexo de Golgi, no SNC, no tecido hepático, no tecido renal, no tecido pulmonar, no músculo cardíaco, entre outros tecidos (Grinthal; Guidotti, 2002; Robson *et al.*, 2006; Zimmermann, 2021).

1.2.3.2 E-5'-NT

A E-5'-NT é uma proteína homodimérica ancorada ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), dependente de zinco (Zn²⁺), e possui sete diferentes isoformas, que podem ser encontradas ancoradas à membrana como também na forma solúvel. A atividade catalítica varia de acordo com o tecido onde é expressa, com o K_m para AMP variando de 1 a 50 µM. A E-5'-NT é também conhecida como proteína de superfície de linfócitos CD73 e representa um marcador de maturação para linfócitos T e B, que está ausente em células imunes imaturas, sendo a principal enzima responsável pela formação de ADO extracelular a partir da hidrólise do AMP (Husucker *et al.*, 2005; Mihaylova-Todorova *et al.*, 2002; Zimmermann; Zebisch; Sträter, 2012).

Esta enzima exerce uma ampla variedade de funções, a depender do tecido e célula em que é expressa, tendo sua presença descrita na literatura em porções do sistema gastrointestinal, no pulmão, nos rins, no cérebro e no coração, sendo que no endotélio vascular é expressa nos

grandes vasos como a artéria coronária, a carótida e a aorta. No SNC, a formação de ADO a partir da hidrólise do AMP e subsequente ativação dos receptores P1, resulta em inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios e no sistema vascular causa vasodilatação e agregação plaquetária (Dwyer *et al.*, 2007; Zimmermann, 2000).

1.2.4 ADA

A ADA é uma metalo-enzima que para realizar a sua atividade catalítica, necessita de um cátion de zinco ou cobalto, sendo responsável por catalisar a conversão irreversível do nucleosídeo ADO e da desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente. Após a desaminação da ADO, a inosina e a 2'-desoxinosina presentes no meio extracelular, são convertidas a hipoxantina, xantina e então a ácido úrico. Assim, conseqüentemente, espera-se que o aumento da atividade de ADA resulte em aumento da produção de ácido úrico, como produto final da via adenosinérgica (Cristalli *et al.*, 2001).

Ela é uma enzima que está localizada sobretudo no citoplasma celular (citossol), mas também na membrana plasmática celular (ectoenzima), e sua atividade regula as concentrações de ADO, no meio intra e extracelular. Em humanos, duas isoformas foram identificadas, a ADA1 e a ADA2. Ela se encontra amplamente distribuída nos tecidos animais como em células epiteliais e endoteliais; e possui expressão significativa em órgãos linfoides, como nos linfonodos, baço e timo, sendo que a sua expressão na membrana das células do sistema imune tem a função estimulatória, participando na diferenciação, proliferação e recrutamento de tais células (Cardoso *et al.*, 2021; Silvia *et al.*, 2016; Weinberg *et al.*, 1993).

Os efeitos biológicos da ADO são mediados pela sua interação com os receptores P1, uma vez que esses receptores têm a ADO como ligante natural, e a sinalização desencadeada por essas proteínas contribui para proteção de tecidos e órgãos contra danos por meio de uma variedade de mecanismos (Gessi *et al.*, 2011).

1.2.5 A relação do sistema purinérgico com o sistema imunológico

Como explorado previamente, o sistema purinérgico está presente de forma ubíqua no organismo humano, sejam as moléculas sinalizadoras, os seus receptores ou as enzimas, participando de praticamente todos os processos fisiológicos e fisiopatológicos. Essa via de comunicação célula-célula tem participação importante em processos inflamatórios e nas células do sistema imune, sendo responsável pela diferenciação, proliferação e recrutamento de macrófagos, de neutrófilos, de células linfoides e pela secreção de moléculas sinalizadoras como nucleotídeos, citocinas e interleucinas (Burnstock; Kennedy, 2011; Huang *et al.*, 2021).

A resposta imune pode ser definida como a reação a microrganismos, macromoléculas ou substâncias químicas que são reconhecidas como estranhas pelo organismo independentemente da consequência fisiológica ou patológica de tal reação, sendo a resposta composta pelo tecido linfóide, componentes celulares e mediadores solúveis. Fazem parte desta resposta, os órgãos linfóides primários tais como a medula óssea e o timo; os órgãos linfóides secundários, tais como o baço, os linfonodos e as tonsilas; os macrófagos, os neutrófilos, os linfócitos B e T; e mediadores tais como as citocinas, o óxido nítrico e as proteínas do sistema complemento (Abbas *et al.*, 2013).

Após dano tecidual, o envolvimento da via purinérgica é dividido em fases e na primeira etapa que pode durar minutos a horas, chamada de fase aguda, o ATP é liberado para o espaço extracelular com consequente elevação na sua concentração, desempenhando função excitatória e quimiotática nas células imunes. Na segunda etapa, ou fase subaguda, que pode durar de horas a dias, a sinalização exercida pelo ATP é reduzida e o aumento da concentração de ADO ativa os receptores P1 como uma estratégia biológica de limitar a extensão e a duração da inflamação. Já na terceira e última etapa, a fase crônica da sinalização purinérgica que pode durar semanas, ocorre uma diminuição na razão de ATP/ADO e início do processo de cicatrização (Cekic; Linden, 2016).

As três fases temporais de sinalização purinérgica após lesão tecidual requerem todos os componentes purinérgicos, como ativação dos receptores P1 e P2 por ADO e ATP, respectivamente, evocando a transdução de sinal, que ao serem ativados em fagócitos, causam quimiotaxia (processo complexo que envolve detecção de gradiente, polarização celular e migração direcionada) e aumento na produção de citocinas, recrutando assim mais células para o local da lesão (Burnstock; Kennedy, 2011; Cekic; Linden, 2016).

Na presença de dano tecidual, seja por fatores ambientais ou endógenos, ocorre a liberação do ATP com consequente ativação dos receptores P2X e a ativação de múltiplos receptores P2Y adjacentes. Esse nucleotídeo pode ser liberado através dos canais de panexina 1 que são ativados pela clivagem mediada por caspases; também pode ser liberado através de outros canais da membrana, incluindo outras panexinas, conexinas e pelo próprio receptor P2X7. O ATP pode ser hidrolisado em ADP ou utilizado pelo sistema imune para recrutamento de diversas células, em resposta a lesão local. Vários estudos demonstraram que linfócitos B e T também desempenham papel crucial na regulação autócrina e parácrina por meio de receptores P1 de ADO (Cekic; Linden, 2016; Junger, 2011).

Os neutrófilos, por exemplo, detectam moléculas quimioatraentes que os ajudam a localizar e migrar para os locais de infecção e inflamação. As células T são capazes de

reconhecer moléculas de antígeno com grande seletividade e sensibilidade, amplificando o sinal, recrutando ainda mais células. Estudos recentes mostraram que a estimulação de neutrófilos e células T leva à rápida liberação de ATP ativando a via de sinalização purinérgica (Cardoso *et al.*, 2021; Junger, 2011).

Evidencia-se o papel da ADO na ativação desses receptores, frente a inflamação aguda, que ao desencadear a transdução de sinal gerada pelos receptores A2A, promove a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que auxilia no processo de cicatrização tecidual (Cekic; Linden, 2016; Pasquini *et al.*, 2021). Assim, fica claro o sinergismo das isoformas dos receptores P1 e P2 no desenvolvimento, enfrentamento e resolução do processo inflamatório (Pasquini *et al.*, 2021).

Como já mencionado, na membrana plasmática das plaquetas também estão presentes as ectoenzimas, responsáveis por regular as concentrações de ATP e ADP no microambiente celular. No sistema cardiovascular e sanguíneo, essas enzimas possuem variadas funções, tais como regulação da tromboinflamação, aterosclerose e trombose, ficando evidente a sua participação no controle de processos inflamatórios, anti-trombóticos, dentre outras funções (Cardoso *et al.*, 2021; Zimmermann, 2021a).

1.2.6 Sistema purinérgico e eventos de tromborregulação

A desregulação dos parâmetros hemostáticos está firmemente associada a processos trombóticos e exacerbação da agregação plaquetária. As plaquetas ativadas contribuem para a geração de trombina através da exposição à fatores coagulantes, formando uma superfície pró-coagulante, e através de interações plaquetas-leucócitos-micropartículas que resultam na exposição do fator tecidual (iniciador da agregação) ao sangue, promovendo assim a formação de coágulos (Morello *et al.*, 2021).

A intersecção entre inflamação e trombose inclui células como macrófagos, monócitos e plaquetas, trabalhando em conjunto com as células endoteliais, que ao serem ativadas em processos inflamatórios criam um ambiente pró-trombótico. A tromborregulação diz respeito aos processos biológicos enzimáticos que envolvem a regulação da coagulação sanguínea e formação de trombos no sistema circulatório. Esse processo se dá pela tríade de Virchow, que se refere aos eventos de lesão endotelial, alterações do fluxo sanguíneo e hipercoagulabilidade sanguínea. A formação do trombo sanguíneo com fibrina no sítio da lesão endotelial integra o processo crucial para a manutenção da integridade vascular. Os processos desencadeados são dependentes de moléculas e proteínas que visam a recuperação da lesão, com consequente hemostasia, e devem ser regulados de modo a prevenir a perda excessiva de sangue evitando

assim a formação de trombos na circulação, decorrentes da formação excessiva de fibrina (Guyton; Hall, 2011).

Após a injúria tecidual, o tecido vascular é ativado, perdendo suas propriedades antitrombóticas, em contraste, os mediadores inflamatórios criam um ambiente pró-trombótico, sendo as plaquetas as primeiras células a serem ativadas nesse complexo processo. As plaquetas participam da hemostasia fisiológica, eventos inflamatórios e trombóticos que ocorrem em um tecido lesionado, e ao serem ativadas promovem um ambiente rico em agonistas plaquetários tais como a trombina e o fator ativador plaquetário. As plaquetas ativadas liberam o conteúdo de seus grânulos, incluindo ATP e ADP, entre outros componentes que contribuem para a ativação plaquetária e formação de trombos (Morello *et al.*, 2021).

As plaquetas circulam no sangue na forma inativa, pois apresentam propriedades antitrombóticas que incluem liberação de prostaciclina, óxido nítrico e a disposição organizada dos fosfolipídios na face intracelular de sua membrana. Num cenário em que o tecido endotelial sofre dano e é ativado, perde suas propriedades antiagregantes e anticoagulantes, promovendo a ativação plaquetária. Isto pode ser ocasionado por inflamação, hipóxia ou alteração do fluxo sanguíneo (Lordan; Tsoupras; Zabetakis, 2021; Morello *et al.*, 2021).

Sabe-se que a ativação plaquetária e a ligação da integrina em resposta a múltiplos agonistas dependem da liberação de nucleotídeos extracelulares. Uma vez que esse mecanismo é controlado, em parte, pela via purinérgica e seus respectivos componentes, a manutenção das concentrações de nucleotídeos extracelulares é de extrema importância para a hemostasia. A NTPDase1 endotelial (CD39), ao converter o ATP em ADP promove um ambiente pró-agregante, entretanto se o ADP for hidrolisado em AMP e depois em ADO pela 5'-NT, cria-se um ambiente anti-agregante, resultando na limitação da extensão da agregação plaquetária intravascular (Maione *et al.*, 2014; Mascanfroni *et al.*, 2013; Morello *et al.*, 2021).

A atividade enzimática da CD39 controla as concentrações de ADP, que é responsável por ativar os receptores P2Y1 e P2Y12 desencadeando a agregação das plaquetas, de modo que a atividade da NTPDase 1 e 5'-NT trabalham em conjunto para restaurar a homeostase tecidual (Yegutkin, 2014). Assim, alterações na função da CD39 no endotélio sustenta a agregação plaquetária e a trombogênese, resultando em maior ativação plaquetária por meio dos receptores P2Y1 e P2Y12 (Atkinson *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram que a liberação da interleucina IL-17 exacerba a trombose arterial induzida por cloreto férrico em modelo animal, através da regulação negativa da expressão de CD39 na artéria carótida de camundongos, postulando assim que essa interleucina desempenha um papel no aumento do risco cardiovascular associado a doenças inflamatórias

crônicas, como artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais, com seu efeito associado a uma diminuição na atividade e expressão da CD39 (Maione *et al.*, 2014; Mascanfroni *et al.*, 2013).

Este estudo busca pela primeira vez investigar se a peçonha bruta do escorpião *Tityus confluens* possui algum efeito sobre os componentes do sistema purinérgico, como as enzimas que realizam a hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeo extracelulares: E-NTPDase (responsável pela desfosforilação do ATP em ADP e ADP em AMP), E-5'-NT (responsável pela hidrólise de AMP gerando ADO) e da enzima ADA que faz a desaminação da ADO em inosina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar se a peçonha do escorpião *Tityus confluens* possui atividade intrínseca de hidrólise de purinas e o seu efeito sobre a atividade de enzimas do sistema purinérgico expressas em linfócitos e plaquetas de ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar se há na peçonha atividade de hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e do nucleosídeo de adenina (adenosina);
- Investigar o efeito da peçonha sobre a atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA de linfócitos; e das enzimas E-NTPDase, E-5'-NT e E-ADA de plaquetas de ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

- ABROUG, F. et al. Scorpion envenomation: state of the art. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 3, p. 401–410, mar. 2020.
- ABBRACCHIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 281, 2006.
- ADI-BESSALEM, S.; HAMMOUDI-TRIKI, D.; LARABA-DJEBARI, F. Scorpion Venom Interactions with the Immune System. **Scorpion Venoms**, p. 87–107, 2015.
- ADI-BESSALEM, S. et al. Lung immunoreactivity and airway inflammation: their assessment after scorpion envenomation. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 501–508, abr. 2012.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335–393, 2002.
- AIRD, S. D. Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 140, n. 1, p. 109–126, 2005.
- ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, jan. 2014.
- 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, 2017.
- BORDON, K. C. F.; COLOGNA, C. T.; ARANTES, E. C. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*. In: Gopalakrishnakone, P. (eds) *Scorpion Venoms*. Springer, Dordrecht. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle de Escorpiões**. 72 p. 1 ed. Brasília. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: o que fazer e como evitar**, Brasília, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.
- BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os Escorpiões**. Salvador: EDUFBA, 2010.
- BUCARETCHI, F. et al. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 331–336, 1995.

BERNARDES-OLIVEIRA, E. et al. *Tityus serrulatus*. Scorpion Venom Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. Natal - RN, v. 11, p. 1–8, jun. 2019.

BORTOLUZZI, L. R. et al. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**. Uruguaiana v. 7, n. 3, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. **Journal of Theoretical Biology**, v. 62, n. 2, p. 491–503, out. 1976.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, jun. 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Therapeutic developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 661, set. 2017.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, jan. 2018.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. P2X receptors in health and disease. **Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 61, p. 333–372, 2011.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31–304, 2004.

CANDIDO, D. M. et al. Uma nova espécie de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do estado da Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1, p. 193–200, 2005

CARDOSO, et al. **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**. Editora UFFS, 2021.

CARMO, É. A. et al. FACTORS ASSOCIATED WITH THE SEVERITY OF SCORPIO POISONING. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 28, 2019.

CARVALHO, D. C. O. S. **Análise dos componentes proteolíticos e peptídicos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2013. Dissertação (Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo) Mestre em Ciências. Secretaria Estadual de Saúde. São Paulo, SP. 2013.

CASELLA-MARTINS, A. et al. Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 1-8, nov. 2015.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins that Act on Voltage-Sensitive Sodium Channels in Excitable Membranes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 15–43, abr. 1980.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124–141, fev. 2007.

CID-URIBE, J. I.; et al. Dissecting Toxicity: the venom gland transcriptome and the venom proteome of the highly venomous scorpion *Centruroides limpidus* (karsch, 1879). **Toxins**, México, v. 11, n. 5, p. 247-268. abr. 2019.

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

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

COLOGNA, C. et al. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 920–932, ago. 2009.

CONCEIÇÃO, I. M. et al. Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 4, p. 519, fev. 2005.

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

CRISTALLI et al. Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. **Wiley**, Italy. p. 105-128. 2001.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587–600, fev. 2001.

DIXON, A. K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 6, p. 1461, 1996.

DHANANJAYA, B. L.; D'SOUZA, C. J. M. The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 3, p. 171–177, abr. 2010.

DOSSI, E.; ROUACH, N. Pannexin 1 channels and ATP release in epilepsy: two sides of the same coin. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 4, p. 533–548, set. 2021.

DWYER, K. M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1–2, p. 171, mar. 2007.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 527, 2001.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1–34, mar. 2011.

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, p. 36–45, out. 2020.

GESSI et al. Adenosine receptors in health and disease: Pharmacology of purine and pyrimidine receptors. **Advances in Pharmacology**, n.21, 2011.

GOMES, A. C. M. et al. Vista do Escorpiões do gênero *Tityus* no Brasil: biologia, bioquímica da peçonha e fisiopatologia do- escorpionismo. **Scientia Vitae**. v. 13, 2022.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. **Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1947–1956, fev. 2002.

GUIMARÃES, P. **Caracterização molecular e imunológica do veneno de *Tityus fasciolatus* e sua ação sobre camundongos**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de pós-graduação em Ciência animal. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2009.

GUERRA-DUARTE, C. et al. Scorpion envenomation in Brazil: Current scenario and perspectives for containing an increasing health problem. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 2, fev. 2023.

GUYTON & HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora: Guanabara. v. 12. 2011.

HOU, M. et al. Cytokines induce upregulation of vascular P2Y(2) receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 9, p. 2064–2069, 2000.

HUANG, Z. et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2021 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–20, abr. 2021.

HUNSUCKER, S. A.; MITCHELL, B. S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 1, p. 1–30, jul. 2005.

JIMÉNEZ-VARGAS, J. M.; POSSANI, L. D.; LUNA-RAMÍREZ, K. Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 139–160, dez. 2017.

JONES, S.; EVANS, R. J.; MAHAUT-SMITH, M. P. Ca²⁺ influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca²⁺ signaling and ADP-evoked platelet aggregation. **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 243–251, 2014.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–212, mar. 2011.

KALIA, J. et al. From Foe to Friend: Using Animal Toxins to Investigate Ion Channel Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 1, p. 158–175, jan. 2015.

KANSAS, G. S.; WOOD, G. S.; TEDDER, T. F. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 7, p. 2235–2244, abr. 1991.

KENNEDY, C. et al. ATP as a co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves-function and fate. **Ciba Foundation symposium**, v. 198, n. 198, p. 223–238, 1996.

KELLERMAN, D. et al. Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 11, p. 1463–1474, dez. 2002.

KHAKH, B. S.; ALAN NORTH, R. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 527–532, ago. 2006.

LAMEH, J. et al. Structure and function of G protein coupled receptors. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 12, p. 1213–1221, 1990.

LEYBAERT, L. et al. Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release. **Cell Commun Adhes**, v. 10, n. 4–6, p. 251–257, 2003.

LI, Z.; HARRIS, S.; EGAN, T. M. P2X Receptors. **Encyclopedia of Neuroscience**, p. 349–354, jan. 2009.

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

LOURENÇO, W. R. Back to *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae): new comments about an old species. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 28, 2022.

LOURENÇO, W. R. Parthenogenesis in scorpions: some history - new data. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, 2008.

LOURENÇO, W. R.; CABRAL, B. C.; RAMOS, E. C. B. Confirmation of *tityus confluens* borelli, 1899 (scorpiones, buthidae) in brazil and description of a new subspecies from the state of mato grosso do sul. **Centro Nacional de Avaliação da Biodiversidade e de Pesquisa e Conservação do Cerrado**, 2001.

LOURENÇO, W. R.; CUELLAR, O. SCORPIONS, SCORPIONISM, LIFE HISTORY STRATEGIES AND PARTHENOGENESIS. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 1, n. 2, p. 51–62, 1995.

MACEDO, L. H. **O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos estimulados com peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p 69, 2020.

MAIONE, F. et al. Interleukin-17A Exacerbates Ferric Chloride-Induced Arterial Thrombosis in Rat Carotid Artery. **International Journal of Inflammation**, v. 2014, 2014.

MARCUS, A. J. et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 9–16, abr. 2003.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. **Escorpiões**: Biologia, envenenamento e mecanismo de ação de suas toxinas. São Paulo: FUNPEC-Editora, 2011.

MASCANFRONI, I. D. et al. Interleukin-27 acts on dendritic cells to suppress the T-cell response and autoimmunity by inducing the expression of ENTPD1 (CD39). **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 1054, 2013.

MENEGASSO, A. R. da S. **Uma abordagem peptidômica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências de Rio Claro. 2013.

MIYAMOTO, J. G. et al. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms. **Toxicon**, v. 141, p. 25–33, jan. 2018.

MIHAYLOVA-TODOROVA, S. T.; TODOROV, L. D.; WESTFALL, D. P. Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: Evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 992–1001, set. 2002.

MORELLO, S. et al. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**, v. 10, n. 9, set. 2021.

MULLER, C. P2-pyrimidinergic receptors and their ligands. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 26, p. 2353–2369, mar. 2002.

MUÑOZ, M. F.; GRIFFITH, T. N.; CONTRERAS, J. E. Mechanisms of ATP release in pain: role of pannexin and connexin channels. **Purinergic Signalling** 2021 17:4, v. 17, n. 4, p. 549–561, nov. 2021.

NIETO, A. R. et al. Noxiustoxin 2, a novel K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *centruroides noxius* Hoffmann. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 913–922, ago. 1996.

NISHIKAWA, A. K. et al. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, n. 8, p. 989–998, 1994.

NORTH, R. A. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 554, n. p. 301, jan. 2004.

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

PARDAL, P. P. O. et al. Clinical aspects of envenomation caused by *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) in two distinct regions of Pará state, Brazilian Amazon basin: a prospective case series. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 3, fev. 2014.

PARRELA, A. F. B. et al. Scorpion envenomation in Brazil: an update. **Infectio**, v. 26, n. 2, p. 172–180, 2022.

PEREIRA, N.; PEREIRA, M. Scorpionic neurotoxins acting on ion channels: a literature review. **Scientia Vitae**, v. 5, n. 18, p. 6–20, 2017.

PINSKY, D. J. et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 8, p. 1031–1040, abr. 2002.

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

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, p. 1-16, 2010.

POSSANI, L. D. et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 287–300, set. 1999.

PUCCA, M. B. et al. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, n. 1, p. 326–336, Nov. 2014.

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

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

RALEVIC, V; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**. 1998.

REIN, J. O. The Scorpion Files. Disponível em: <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>. Acesso em: 10 Jul. 2022.

RITA DE, R. DE C. et al. Scorpion venom increases acetylcholine release by prolonging the duration of somatic nerve action potentials. **Neuropharmacology**, v. 153, p. 41–52, jul. 2019.

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

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409, maio 2006.

SANTUSSI, W. M. et al; Antifungal Activity against Filamentous Fungi of Ts1, a Multifunctional Toxin from *Tityus serrulatus* Scorpion Venom. **Frontiers In Microbiology**, Ribeirão Preto, Sp, v. 8, p. 1-15, jun. 2017.

SANTOS, M. DE SOUZA DOS. **Predadores de escorpiões (Arachnida: Scorpiones):** uma revisão. Monografia (Especialização) – Curso de Especialização em Animais de Interesse em Saúde – Biologia Animal. Laboratório de ecologia e evolução. Instituto Butantan, São Paulo, SP. p.1-64, 2022.

SCHOCH, C. L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, 2020.

SCHULMAN, E. S.; NISHI, H.; PELLEG, A. Degranulation of human mast cells: modulation by P2 receptors' agonists. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1216580, 5 out. 2023.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1216580>

SILVA, P. S. et al. Adenosina desaminase: uma enzima extraordinária e onipresente. **Pulmão RJ**, p. 11–16, 2016.

SINAN. **Acidente por animais peçonhentos - notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil:** Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net 2016.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 39, p. 5346–5358, 30 set. 2010.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 361, maio 2006.

SO, W. L. et al. Transcriptomic and proteomic analyses of venom glands from scorpions *Liiocheles australasiae*, *Mesobuthus martensii*, and *Scorpio maurus palmatus*. **Peptides**, v. 146, p. 170643, 1 dez. 2021.

THIELE, A. et al. Regulation of Adenosine Receptor Subtypes during Cultivation of Human Monocytes: Role of Receptors in Preventing Lipopolysaccharide-Triggered Respiratory Burst. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1349, mar. 2004.

TORRES-LARIOS, A. et al. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 5023–5031, ago. 2000.

TYTGAT, J. et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 11, p. 444–447, nov. 1999.

VOLITZKI, E.; GAGGINI, M. C. R. Avaliação Dos Acidentes Escorpiônicos No Estado De São Paulo. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, p. 29–43, jun. 2021.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 473–497, 1 nov. 2014.

WEINBERG, K. et al. T lymphocyte ontogeny in adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency after treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 596–602, 1993.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 1, p. 117–125, mar. 2021.

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114322, mai. 2021.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, set. 2012.

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, jan. 2017.

ZOCCAL, K. F. et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7–8, p. 1101–1108, 1 jun. 2011.

CAPÍTULO II

MANUSCRITO

First Evidence of *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Buthidae) Venom Altering Purine Metabolism in Rat Blood Cells

Romário da Silva Portilho^{1,2}, Igor Leal Brito^{1,2,3}, Andreza Negreli dos Santos^{1,3}, Bruna Pache Moreschi^{1,2}, Malson Neilson de Lucena^{1,3}, Jeandre Augusto Otsubo Jaques^{1,2,3,*}

1 Setor de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

3 Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79.070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil.

* Correspondence: J.A.O.J. jeandre.jaques@ufms.br.

Abstract

Purinergic signaling pathways play crucial roles in regulating hemostatic and inflammatory responses, both of which are impacted by scorpion envenomation. Scorpion venoms are complex mixtures containing various toxins such as peptides, enzymes, and nucleotides. Previous studies have highlighted the influence of scorpion venom toxins on purinergic signaling, including purinergic receptors, and have identified putative ectonucleotidases within venom compositions. This study aimed to investigate the capacity of *Tityus confluens* scorpion venom (10, 50 and 100 µg/mL) to metabolize adenine nucleotides and its potential effects on purinergic enzyme activity in rat blood cells, specifically platelets and lymphocytes. The effects of *T. confluens* venom on the activity of E-NTPDase (ATP and ADP hydrolysis), E-5'-NT (AMP hydrolysis), and E-ADA (ADO hydrolysis) were analyzed. Results revealed that crude venom from *T. confluens* exhibited ATP nucleotide hydrolysis activity across all tested concentrations. In lymphocytes, ADP hydrolysis was inhibited at 100 µg/mL, while ADO hydrolysis was increased across all concentrations of venom. In platelets, ATP hydrolysis was inhibited at 100 µg/mL of venom, whereas AMP and ADO hydrolysis were inhibited across all concentrations. When considering these findings collectively, the data suggests an elevation in extracellular ATP levels and a reduction in extracellular ADO, aligning with clinical manifestations of envenomation characterized by a proinflammatory milieu. This study underscores the intrinsic ATPase activity of *T. confluens* venom and its ability to modulate the activity of E-NTPDase, E-5'-NT, and E-ADA in rat blood cells.

Keywords: Ectonucleotidases. Adenosine deaminase. Adenine nucleotides. Venom. Scorpion.

1 Introduction

Scorpions pose a significant threat to public health in Brazil and numerous regions worldwide due to their venomous nature, contributing to human envenomation and presenting a substantial public health concern. The scorpion *Tityus serrulatus*, Buthidae family, is the major cause of scorpion accidents due to its wide distribution in the national territory, its adaptive capacity to the urban environment, and venom toxicity (Gomes *et al.*, 2022; Parrela *et al.*, 2022).

Tityus genus belongs to the Buthidae family and in Brazil represents 35 species, among which *T. serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus*, *Tityus confluens* are the most important species, as they are endemic in various regions of the country where they cause accidents. Among the 12 species found in the state of Mato Grosso do Sul, 10 belong to the genus *Tityus* C. L. Koch, such as *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *Tityus paraguayensis*, *Tityus mattogrossensis*, *Tityus trivittatus*, *T. confluens* and the subspecies *T. confluens Bodoquena* (Porto *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017). *T. confluens* is the scorpion found in the Chaco scorpiofauna, occurring in Argentina, Brazil, Bolivia, and Paraguay, whereas in Brazil it is only found in the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul (Brazil; Porto, 2010; Carvalho *et al.*, 2017).

Scorpion venom has a variety of biologically active components and has been associated with antimicrobial, anticancer, and pro-inflammatory activities (Santussi *et al.*, 2017; Bernardes-Oliveira *et al.*, 2019). Ts1 peptide, for example, identified in the *T. serrulatus* venom, showed antifungal activity (Martin-Eauclaire; Bougis; Lima, 2018). The toxins present in scorpion venom interact with ion channels in the plasma membrane of most cells in the human body, as well as immune cells, including neutrophils and macrophages, causing their depolarization with the consequent release of neurotransmitters and the activation of several receptors and signal transduction pathways (Fialho *et al.*, 2011; Pereira; Pereira, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2005). Through the activation of voltage-dependent channels, the neurotoxin Ts1 causes the depolarization of cell membranes, causing the release of catecholamines (adrenaline and noradrenaline) and the neurotransmitter acetylcholine (ACh), with resulting adrenergic and cholinergic effects after scorpion envenomation such as local pain, edema, redness (Sawynok *et al.*, 1997; Sawynok; Reid; Liu, 2000), and increased vascular permeability (Abroug *et al.*, 2020; Parrela *et al.*, 2022).

Venom inoculation initiates a series of events that involve several cellular signaling cascades, and one of the systems involved in mediating processes that are triggered during envenomation is the purinergic system, which is responsible for the hydrolysis of extracellular purines including ATP and adenosine (ADO) (Aird, 2002; Sales; Santoro, 2008). Purine and

pyrimidine nucleotides, such as ATP, UTP and ADO nucleoside, act as extracellular messengers signaling the purinergic pathway through specific receptors (Burnstock, 2007), which are ubiquitously present in cells of the human body and play several important roles in cellular homeostasis such as regulation of platelet activation and aggregation (Atkinson *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010), inflammatory processes (Linden; Koch-Nolte; Dahl, 2019), cell differentiation and proliferation (Bono *et al.*, 2015; Saze *et al.*, 2013) and modulation of the immune response (Cekic; Linden, 2016; Di Virgilio; Vuerich, 2015; Di Virgilio *et al.*, 2001, 2018).

The degradation of the nucleotides and nucleosides occurs in such a way that after ATP activates purinergic receptors it is hydrolyzed into ADP, AMP and ADO by enzymes that control the concentration and residence time of the nucleotides in the extracellular environment, thus ceasing the signaling mediated by purines (Cardoso; Manfredi; Maciel, 2021; Yegutkin, 2014). This function is mainly carried out by ectonucleotidases, enzymes grouped in four main families: ecto-nucleoside-triphosphate-diphosphohydrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterases (E-NPPs), ecto-5'-nucleotidases (E-5'-NT), and alkaline phosphatases (PA) (Burnstock; Vaughn; Robson, 2014; Zimmermann, 2021). The termination of ADO signaling is performed by adenosine deaminase (E-ADA), which deaminates ADO into inosine (Sheth *et al.*, 2014).

Purinergic receptors are activated in an autocrine or paracrine manner by nucleotides and structurally related molecules and are responsible for maintaining various cellular functions (Burnstock, 2006; Junger, 2011). These receptors are divided in two types, P1 (ADO receptors) and P2 (nucleotide receptors). P1 receptors are coupled to G proteins (Gs, Gi or Gq) which, when activated, modulate the activity of adenylyl cyclase (AC), whose activation alters intracellular levels of cAMP, or phospholipase C (PLC), causing intracellular calcium transients. The P1 family has four subtypes: A1, A2A, A2B and A3, with ADO as the natural agonist, which, when binded to its receptors, can modulate a plethora of biological functions, such as inflammatory and immunological responses (Huang *et al.*, 2021) and neuromodulatory responses (Khakh; North, 2012). P2-type receptors are further divided in P2X and P2Y. P2X receptors have seven subtypes (P2X1-7), all responsive to ATP. Classified as ionotropic, these receptors are permeable to sodium (Na^+), potassium (K^+) and calcium (Ca^{2+}) ions (Jones; Evans; Mahaut-Smith, 2014). P2Y receptors are metabotropic receptors, and like P1 receptors, they are also couple to G protein (Gs, Gi or Gq), and have eight subtypes (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14) (Burnstock, 2007).

Owing to the lack of information in the scientific literature that addresses the influence of scorpion venom on components of the purinergic system, the present work aimed to investigate whether the venom of the scorpion *T. confluens* was able to metabolize adenine nucleotides and whether the components present in the venom has any effect on the activity of purinergic enzymes expressed in cells such as platelets and lymphocytes.

2 Material and methods

2.1 Reagents

ATP (A6419), ADP (A2754), AMP (01930), ADO (A9251), bovine serum albumin (A2153), and trichloroacetic acid (T4885) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2 Animals

Eighty specimens of *T. confluens* were used to obtain the venom. The capture of scorpions was carried out at night (7 pm - 9 pm) at the campus of *Universidade Federal de Mato Grosso do Sul* (UFMS) located in the municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil (20°30'25.6"S and 54 °37'1.2"W). The scorpions were collected using 395 nm LED-UV flashlights, under which scorpions appear fluorescent (Stachel *et al.*, 1999). The study was only started after obtaining the environmental license in the System of Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO/ICMBio/MMA/Brazil n° 86953-1) and access registration in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen/MMA/Brazil n°A50DE86). The captured organisms were maintained in plastic boxes with water *ad libitum* and food offered every 2-weeks with *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio*.

To obtain peripheral blood cells, 34 adult (8-10 weeks-old) heterogenic Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (200 g), male or female, were used, depending on availability of the Central Animal Facility of INBIO/UFMS. The study was evaluated and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of UFMS (n. 1.262/2022).

2.3 Venom milking

T. confluens venom milking was carried out every two weeks, using electrical stimulation method (12 V) applied directly to the telson of each individual. To obtain better transmission of the electrical current, telson region was rinsed with physiological solution right before stimulation. After each extraction, all animals were kept alive in captivity.

To obtain enough sample, venoms were pooled and yielded 8 microtubes with 1-6 mg each. After being extracted, the venom was used in biochemical assays at final concentrations of 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL of crude venom (Casella-Martins *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2020; Rita *et al.*, 2019).

2.4 Separation of peripheral lymphocytes

Lymphocytes were isolated from blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Hypaque density gradients as described by Boyum (1968) and Leal *et al.* (2005).

2.5 Separation of platelets from peripheral blood

Platelet separation was performed from peripheral blood collected in tubes with sodium citrate, according to the previously described method (Heymann; Reddington; Kreutzberg, 1984; Pilla *et al.*, 1996).

2.6 Protein quantification

The quantification of protein in lymphocytes and platelet samples was carried out according to Bradford (1976), in microplate reader (Spectramex Plus 381- Molecular Devices®), using bovine serum albumin as a standard.

2.7 Quantification of ATP, ADP, AMP, and ADO hydrolysis by crude venom

Hydrolysis of adenine nucleotides by crude venom was accessed in a reaction medium consisting of 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 4 mM KCl and 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 in a final volume of 200 µL. After pipetting the reaction system into 96-well flat-bottom microplates, 20 µL of venom (10, 50, or 100 µg/mL) was added to the reaction and pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was started with the addition of 2 mM ATP, or 2 mM ADP, or 20 mM AMP. The incubation time was 60 minutes. The reaction was stopped by transferring 20 µL of the reaction to another microplate containing 20 µL of 10% trifluoroacetic acid (TFA). The inorganic phosphate (Pi) content was determined spectrophotometrically at 630 nm using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard (Chan; Delfert; Junger, 1986). Specific activity is expressed as nmol of Pi released/min.

The quantification of ADO hydrolysis by the venom was carried out according to the method described by Giuki and Gakis (1971) with modifications. Briefly, the assay consists of blank tubes (without sample) and test tubes (with sample). The blank tubes received 500 µL of the reaction medium (12 mM adenosine/50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0), and the test

tubes received 500 μL of the reaction medium and 25 μL of the venom. After 120 minutes of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, the reaction was stopped by adding 1500 μL of 106 mM phenol/0.17 mM nitroprusside and then 1500 μL of alkaline hypochlorite. After stopping the reaction, 25 μL of the venom was added to the blank tubes and then all tubes were incubated for 30 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$ to reveal the NH_4^+ content. Enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 620 nm using ammonium sulfate as standard. Specific activity is expressed as nmol of NH_4^+ /min.

2.8 E-NTPDase activity in lymphocytes

E-NTPDase activity in lymphocytes was determined according to the method previously described (Leal *et al.*, 2005). The reaction medium consisted of 0.5 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 in a final volume of 200 μL . After pipetting the reaction medium into 96-well flat-bottom microplates, 20 μL of lymphocytes were added (2 to 4 μg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the absence and in the presence of venom at concentrations of 10, 50, or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The reaction was started with the addition of 2 mM ATP or ADP. The incubation time was 70 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$. The reaction was stopped by transferring 20 μL of the reaction to another microplate containing 20 μL of 10% TFA. Pi content was determined spectrophotometrically at 630 nm using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard (Chan; Delfert; Junger, 1986). Specific activity is expressed as nmol Pi released/min/mg protein.

2.9 E-ADA activity in lymphocytes

To quantify E-ADA activity in lymphocytes, the method described by Giusti and Gakis (1971) and modified by Costa *et al.* (2021) was used. Briefly, the assay consists of blank tubes (without sample) and test tubes (with sample). The blank tubes received 500 μL of the reaction medium (10 mM adenosine/50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0), and the test tubes received 500 μL of the reaction medium and 25 μL of the lymphocytes suspension (12 μg of protein). To identify the effect of the venom, it was incorporated into the reaction medium at concentrations of 10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 120 minutes of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, the reaction was stopped by adding 1500 μL of 106 mM phenol/0.17 mM nitroprusside and then 1500 μL of alkaline hypochlorite. After stopping the reaction, 25 μL of the cell suspension was added to the blank tubes and then all tubes were incubated for 30 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$ to reveal the NH_4^+ content. Enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 620 nm using

ammonium sulfate as standard. Specific activity is expressed as nmol of NH_4^+ / min/ mg of protein.

2.10 E-NTPDase and E-5'-NT activity in platelets

To determine the activity of the E-NTPDase and E-5'-NT enzymes in platelets, a previously described method was used (Heymann; Reddington; Kreutzberg, 1984; Pilla *et al.*, 1996). The reaction medium for the quantification of E-NTPDase activity (ATP or ADP hydrolysis) contained 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris HCl buffer pH 7.4 with a final volume of 200 μL . For the quantification of the activity of the E-5'-NT (AMP hydrolysis), the reaction medium was the same, with the exception that 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 . After pipetting the reaction medium into 96-well flat-bottom microplates, 20 μL of the platelet preparation (8 to 12 μg of protein) was added and incubated for 10 minutes at 37°C in the absence and in the presence of venom at concentrations of 10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The reaction was started with the addition of 1.0 mM ATP or ADP, or 2 mM AMP. The incubation time was 60 minutes at 37°C. The reaction was stopped by transferring 20 μL of the reaction to another microplate containing 20 μL of 10% TFA. Pi content was determined spectrophotometrically at 630 nm using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard (Chan; Delfert; Junger, 1986). Specific activity is expressed as nmol Pi released/min/mg protein.

2.11 E-ADA activity in platelets

To quantify E-ADA activity in platelets, it was used the method previously described by Giusti and Gakis (1971) with modifications. Briefly, the assay consists of blank tubes (without sample) and test tubes (with sample). The blank tubes received 500 μL of the reaction medium (1 mM adenosine/50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0), and the test tubes received 500 μL of the reaction medium and 25 μL of platelets (7.5 to 20 μg of protein). To identify the effect of the venom, it was incorporated into the reaction medium at concentrations of 10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 105 minutes of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1500 μL of 106 mM phenol/0.17 mM nitroprusside and then 1500 μL of alkaline hypochlorite. After stopping the reaction, 25 μL of the cell suspension was added to the blank tubes and then all tubes were incubated for 30 minutes at 37°C to reveal the NH_4^+ content. Enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 620 nm using ammonium sulfate as standard. Specific activity is expressed as nmol of NH_4^+ / min/ mg of protein.

2.12 Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile range. Data analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. p values < 0.05 were considered significant.

3 Results

3.1 Hydrolysis of adenine nucleotides and adenosine by the crude venom of *T. confluens*

The crude venom of *T. confluens* showed, at all tested concentrations (10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, and 100 $\mu\text{g/mL}$), ATP nucleotide hydrolysis activity. However, ADP, AMP and ADO hydrolysis activities were not detected (Table 1).

3.2 Effect of *T. confluens* crude venom on E-NTPDase and E-ADA activity of lymphocytes

Fig.1 shows the ATP and ADP hydrolysis activity by E-NTPDase from rat lymphocytes in the presence of *T. confluens* crude venom. It did not show any effect on ATP hydrolysis (Fig.1a; $p > 0.05$). It was observed that 100 $\mu\text{g/mL}$ of crude venom was able to inhibit ADP hydrolysis activity of lymphocytes compared to the control group (Fig.1b; $p < 0.05$).

Fig.2 shows the ADO hydrolysis by E-ADA from rats lymphocytes in the presence of *T. confluens* crude venom. It was observed that all concentrations tested were increased in relation to the control group (10 and 100 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$; 50 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$).

3.3 Effect of *T. confluens* crude venom on the activity of E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA of platelets

Fig. 3 shows the ATP and ADP hydrolysis activity by E-NTPDase from rat platelets in the presence of *T. confluence* crude venom. It was observed that 100 $\mu\text{g/mL}$ of crude venom was able to inhibit ATP hydrolysis activity of platelets compared to the control group (Fig.3a; $p < 0.01$). It did not show any effect on ADP hydrolysis (Fig.3b; $p > 0.05$).

Fig.4 shows the hydrolysis of AMP by E-5'-NT expressed in rat platelets in the presence of *T. confluens* crude venom. The venom inhibited the hydrolysis of adenine nucleotides at all concentrations tested (10 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$; 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$).

Fig.5 shows the ADO hydrolysis by E-ADA from rats platelets in the presence of *T. confluens* crude venom. It was observed that all concentrations tested inhibited ADO hydrolysis in relation to the control group (10 and 50 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$; 100 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$).

4 Discussion

The present work sought in an unprecedented way to evaluate the hydrolysis of nucleotides and adenine nucleosides by the venom of the scorpion *T. confluens* and its effect on components of the purinergic system such as E-NTPDase and E-ADA expressed in lymphocytes of rats; and E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA expressed in rat peripheral blood platelets.

Despite sharing common characteristics, scorpion venoms are diverse and composed by different toxins, which are the components related to the effects manifested in the prey or victims of envenomation. These might range from low-molecular-weight components such as neurotoxins, amines, and adenine nucleotides to proteins with catalytic function (Alvarenga *et al.*, 2012; Pucca *et al.*, 2015). Enzymes such as metalloproteases can cleave and inactivate voltage-gated calcium channels (Amorim *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2024). Hyaluronidases facilitate the spread of toxins within the tissues. Phospholipases disrupts cell membranes and release arachidonic acid, triggering an inflammatory process (Amorim *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2024; Pessini *et al.*, 2001). E-5'-NT, a purinergic enzyme responsible for the hydrolysis of AMP into adenosine, has already been identified as a putative element in the venom of *Centruroides limpidus* by proteomic and transcriptomic analyzes (Cid-Urbe *et al.*, 2019).

Thus, faced with the possibility of identifying some enzyme capable of metabolizing the extracellular adenine nucleotides and nucleoside, the first aspect investigated in this study was the capacity of crude venom to hydrolyze the nucleotides ATP, ADP, AMP, and ADO. By the method we employed, we only detected ATPase activity in the crude venom of *T. confluens* across all concentrations tested (10, 50 and 100 µg/mL). In other members of the Arachnida class there are sparse references indicating 5'-nucleotide phosphohydrolase and alkaline phosphatase activity in *Lexosceles reclusae* (Geren *et al.*, 1976) and transcripts for phosphodiesterase in the pseudoscorpion *Synsphyronus apimelus* (Santibáñez-López *et al.*, 2018). However, in the Scorpiones order we did not find any consistent report of ATPase, alkaline phosphatase or phosphodiesterase activity in venom, except for the recent study of Amorim *et al.*, (2019), that described by proteomic analysis of *T. serrulatus*, a scorpion phylogenetically close to *T. confluens*, that among the classes of venom components phosphodiesterases would represent 2% of them. Regarding AMPase activity, we only became aware of the study that reported the existence of transcripts putatively coding for E-5'-nucleotidase in the venom of *C. limpidus* (Cid-Urbe *et al.*, 2020), which also have not been previously reported in the literature for scorpion venom.

It can be hypothesized that the increased ATP levels in the extracellular milieu, resulting from cell death, when hydrolyzed by the catalytic activity identified in this study and the purinergic apparatus of prey or victim enzymes, would contribute to the generation of ADO. It was proposed by Arrigoni *et al.*, (2006) that ADO is involved in the activation of neuronal A1 receptors (Aird, 2010; Dhananjaya *et al.*, 2010) with suppression of the release of acetylcholine and other neurotransmitters from local excitatory motor neurons. ADO also acts by activating A2 receptors present in the vascular endothelium, causing vasodilation with consequent hypotension (Dunwiddie; Masino, 2001). In studies of snake envenomation, the formation of ADO was associated with the immobilization of prey via paralysis (Aird, 2002; Aird 2005; Dhananjaya *et al.*, 2010). Thus, the ATPase activity detected in this study might be considered another toxin component present in the crude venom of *T. confluens*.

It was also investigated in this study the capacity of *T. confluens* crude venom to alter the purine metabolism in blood cells of rats. There is previous evidence of the intersection between a component of scorpion venom and purinergic signalling, as shown in the mechanism of action of the toxin TsTX-1 (Ts1), isolated from *T. serrulatus*. Ts1 induces, in a P2X receptor-dependent way, a 42-fold increase in the release of purines, which increased the release of neurotransmitters and contractility of the vas deferens of rats (Conceição *et al.*, 2005).

In response to *T. confluens* venom, it was observed a decrease in the activity of ectonucleotidases, which may be interpreted to have two main effects: to polarize the concentration of extracellular ATP (eATP) and to avoid the generation of extracellular ADO (eADO). If these characteristics are established, it could be speculated that the increased lymphocytes E-ADA activity would also contribute to decrease eADO as the decreased platelets E-ADA activity would be a response to maintain the eADO levels.

In the context of scorpion envenomation, after inoculation of venom into the human body, a local inflammatory process is triggered generating a vascular endothelial and cellular response (Petricevich, 2010). In this context, due to the high intracellular concentration of ATP, after cell lysis its extracellular levels increases exponentially and may have different biological effects (Aird, 2002). The prolonged exposure to high concentration of ATP may have a role in the mediation of intense pain, a usual clinical sign after a scorpion sting, through the activation of P2X3 and P2X7 receptors (Abbracchio; Burnstock, 1994; North, 2002; Brites-Neto, 2019; Burnstock, 2018; Oehler *et al.*, 2021). Studies on nociception have found that the toxin BmK I, from the scorpion *Buthus martensi* Karsch (BmK) induced the upregulation of P2X7 receptor and the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , predominantly in spinal microglia, which caused spontaneous pain behaviors, ipsilateral thermal hypersensitivity and bilateral mechanical

hypersensitivity, suggesting that P2X7 receptor mediate BmK I-induced microglial activation and therefore contribute to the development of inflammatory pain (Zhou *et al.*, 2019a, 2019b). In addition to mediating nociception, the ATP present in the injured microenvironment can also mediate proinflammatory effects, activating macrophages and mast cells P2 receptors, which represent the first line of defense against an aggressor agent, triggering the release of histamine, with consequent vasodilation and edema, common clinical signs in scorpion envenomation (Brites-Neto, 2019; Cologna *et al.*, 2009; Martin-Eauclaire *et al.*, 2018).

It is known that activated macrophages release a broad spectrum of cytokines, such as IL-1 and TNF- α , which induce the production of other inflammatory cytokines, such as IL-8 from local fibroblasts and endothelial cells at the site of the bite (Barberá -Cremades *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2005; Petricevich, 2002). It was also demonstrated that the venom of *Tityus fasciolatus* increased lymphocyte counts in the blood of inoculated mice (Guimarães, 2009) and that *T. serrulatus* venom has pro-inflammatory effects on T lymphocytes, inducing the production and release of IL-6 (Casella-Martins *et al.*, 2015). The reduced hydrolysis of ADP by lymphocytes, observed in this study, would reinforce the proinflammatory effects of ATP, since it also polarizes the increase of extracellular ADP (eADP). In T cells, ADP activates metabotropic P2Y receptors, causing differentiation of T lymphocytes and chemotaxis (Casella-Martins *et al.*, 2015; Jones; Evans; Mahaut-Smith, 2014).

The increased E-ADA activity in lymphocytes may contribute to further decrease eADO levels and might contribute to set a proinflammatory environment since ADO exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting the proliferation of T lymphoid cells and the secretion of proinflammatory cytokines (Gessi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2023). ADO, by activating its P1 receptors, blocks the release of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-6, IL-12, nitric oxide and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , while the activation of A2A and A2B endorses the release of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, at the same time that stimulation of the A3 receptor promotes chemotaxis of macrophages towards apoptotic cells (Joós *et al.*, 2017; Pasquini *et al.*, 2021).

The increased levels of extracellular nucleotides and the decreased levels of their metabolite, ADO, are expected because of the inhibition observed in the activity of ectonucleotidases in platelets in the presence of *T. confluens* venom. Of particular importance is the inhibition of E-5'-NT, which directly generates ADO from ADP hydrolysis. Thus, it may result in a decrease in the levels of eADO. The activity of E-ADA was also decreased and when analyzed with the whole dataset, it may indicate an attempt to maintain the eADO levels. While ADP is the main promoter of platelet aggregation, ADO is a potent inhibitor (Borea *et al.*,

2018). Altogether, these characteristics are also compatible with platelet activation, since beyond the proinflammatory effects, both ATP and ADP are agonists for platelet aggregation, through the activation of P2X1, P2Y1 and P2Y12 receptors (Jones, Evans, Mahaut-Smith, 2014; Koupenova, Ravid, 2018; Oury, Wéra, 2021); while ADO, by the activation of A2A and A2B receptors, is a potent inhibitor of platelet aggregation (Yang *et al.*, 2010; Borea *et al.*, 2018).

It is important to call the attention to the fact that there are other cells in the circulation involved in the metabolism of these purines and that, although important to understand the effects of the scorpion venom, the results shown here do not represent the whole scenario of scorpion envenomation (Harrington; Mitchell, 2005; Zimmermann, 2000, 2021; Zukowska *et al.*, 2015).

5 Conclusions

This is the first study to investigate both the capacity of *T. confluens* venom to metabolize adenine nucleotides and nucleoside, and its effects on the activity of purinergic ectoenzymes from cells such as lymphocytes and platelets. It was found that the venom has ATPase activity and affects the extracellular metabolism of purines in both lymphocytes and platelets from rats. We highlight that there are very few studies investigating the role of purinergic signaling in scorpion envenomation and, along with them, we identified purinergic components involved in the envenomation, which points to a horizon that still needs to be unveiled.

Acknowledgements

Financing

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES, Financial Code 001). This study was supported by the Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC- Brazil, the Multicenter Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology (PMBqBM - SBBq) and the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences (PPGFARM).

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK, G (1994) Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacology & Therapeutics**. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)00048-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00048-4)
- ABROUG F et al (2020) Scorpion envenomation: state of the art. **Intensive Care Medicine**. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05924-8>
- AIRD SD (2002) Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00232-x](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00232-x)
- AIRD SD (2005) Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Part B Biochem Mol Biol**.
- ALVARENGA E et al (2012) Transcriptome analysis of the Tityus serrulatus scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics*, 2, 210-220. doi: 10.4236/ojgen.2012.24027.
- ATKINSON B et al (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.025>
- AMORIM FG et al (2019) Proteome of fraction from Tityus serrulatus venom reveals new enzymes and toxins. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-1482-18>
- BARBERÁ-CREMADES M, BAROJA-MAZO A, PELEGRÍN, P (2016) Purinergic signaling during macrophage differentiation results in M2 alternative activated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**. <https://doi.org/10.1189/jlb.1a0514-267rr>
- BARRAVIERA B (1997) Systemic inflammatory response syndrome in envenoming. **Toxicon**. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(96\)00126-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00126-2)
- BERNARDES-OLIVEIRA E et al (2019) *Tityus serrulatus*. Scorpion Venom Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. <https://doi.org/10.1155/2019/5131042>
- BONO MR et al (2015) CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. **FEBS letters**. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>
- BOREA PA et al (2018) Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological reviews**. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>

BOYUM A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, Isolation on mononuclear cells by centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**.
PMID:4179068

BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRITES-NETO J (2019) Aspectos clínicos e terapêuticos do envenenamento por escorpiões em cães e gatos. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**.
<https://doi.org/10.4025/revcivet.v6i2.46911>

BURNSTOCK G (2018) Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**.
<https://doi.org/10.1177/2398212818817494>

BURNSTOCK G (2007) Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**.
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>

BURNSTOCK G (2006) Purinergic Signalling — An Overview. **Nature Reviews Neuroscience**. p. 26–53.

BURNSTOCK G, VAUGHN B, ROBSON SC (2013) Purinergic signalling in the liver in health and disease. **Purinergic Signalling**.
<https://doi.org/10.1007%2Fs11302-013-9398-8>

CARDOSO AM, MANFREDI LH, MACIEL SFVO (2021) **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**. Editora UFFS, Brasil.

CASELLA-MARTINS A et al (2015) Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**.
<https://doi.org/10.1186%2Fs40409-015-0046-3>

CEKIC C, LINDEN J (2016) Purinergic regulation of the immune system. **Nature reviews. Immunology**.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.4>

CHAN KM et al (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)

CHAN TK et al (1975) Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. **Toxicon**.
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(75\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(75)90159-2)

CID-URIBE JI et al (2019) Dissecting Toxicity: the venom gland transcriptome and the venom proteome of the highly venomous scorpion *Centruroides limpidus* (karsch, 1879). **Toxins**.

<https://doi.org/10.3390/toxins11050247>

CID-URIBE JI et al (2020) Scorpion venomomics: a 2019 overview. **Expert Review of Proteomics**.

<https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1705158>

COLOGNA C et al (2009) *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein and peptide letters**.

<https://doi.org/10.2174/092986609788923329>

CONCEIÇÃO IM et al (2005) Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **British Journal of Pharmacology**.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706062>

COSTA LR et al (2021) Biochemical characterization of adenosine deaminase (CD26; EC 3.5.4.4) activity in human lymphocyte-rich peripheral blood mononuclear cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (on line), v. 54, p. 1-7, 2021.

<https://doi.org/10.1590/1414-431X2020e10850>

DEAGLIO S, ROBSON SC (2011) Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. **Advances in pharmacology**.

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385526-8.00010-2>

DHANANJAYA BL, D'SOUZA CJM (2010) The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. **Cell Biochemistry and Function**.

<https://doi.org/10.1002/cbf.1637>

DI VIRGILIO F et al (2018) Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**.

<https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>

DI VIRGILIO F et al (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**.

<https://doi.org/10.1182/blood.v97.3.587>

DI VIRGILIO F, VUERICH M (2015) Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117–123, 1 set. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>

DIOCHOT S (2021) Pain-related toxins in scorpion and spider venoms: a face to face with ion channels. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**.

<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0026>

DUNWIDDIE TV, MASINO SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual review of neuroscience**.

<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.31>

FUENTES E, PALOMO I (2015) Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. **Vascular pharmacology**.

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.002>

GEREN CR et al (1976). Isolation and characterization of toxin from Brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Arch Biochem Biophys** 174:90–9

GESSI S et al (2007) Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signal**.

doi: 10.1007/s11302-006-9042-y

GIUSTI G, GAKIS C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**.

<https://doi.org/10.1159/000459567>

GOMES ACM et al (2022) Vista do Escorpiões do gênero *Tityus* no Brasil: biologia, bioquímica da peçonha e fisiopatologia do escorpionismo. **Scientia Vitae**.

GUIMARÃES P (2009) **Caracterização molecular e imunológica do veneno de *Tityus fasciolatus* e sua ação sobre camundongos**. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais.

HARRINGTON L, MITCHELL J (2005) P2X1 receptors and the endothelium. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900019>

HEYMANN D, REDDINGTON M, KREUTZBERG GW (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. **Journal of Neurochemistry**.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x>

HUANG Z et al (2021) From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**.

<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

JOÓS G et al (2017) Involvement of adenosine A3 receptors in the chemotactic navigation of macrophages towards apoptotic cells. **Immunology Letters**.

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.002>

JONES S, EVANS RJ, MAHAUT-SMITH MP (2014) Ca²⁺ influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca²⁺ signaling and ADP-evoked platelet aggregation. **Molecular pharmacology**.

<https://doi.org/10.1124/mol.114.092528>

JUNGER WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature reviews Immunology**.

<https://doi.org/10.1038/nri2938>

KAUSKOT A, HOYLAERTS MF (2012) Platelet receptors. **Handbook of Experimental Pharmacology**.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_2

KHAKH BS, NORTH RA (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. **Neuron**.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>

KOUPENOVA M, RAVID K (2018) Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity. **Frontiers in Pharmacology**.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00037>

LEAL DB et al (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.09.006>

LINDEN J, KOCH-NOLTE F, DAHL G (2019) Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. **Annual review of immunology**.

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052406>

MARCUSSI S, ARANTES EC, SOARES AM (2011) **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismo de ação de suas toxinas**. FUNPEC, Brasil.

MARTIN-EAUCLAIRE MF, BOUGIS PE, LIMA ME (2018) Ts1 from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*: A half-century of studies on a multifunctional beta like-toxin. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.024>

MIHAYLOVA-TODOROVA ST, TODOROV LD, WESTFALL DP (2002) Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: Evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**.

<https://doi.org/10.1124/jpet.102.033332>

MOREIRA, DC (2008) **Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (Aranha Marrom) e seus mecanismos moleculares**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.

MORELLO S et al (2021) Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**.

<https://doi.org/10.3390/cells10092223>

NASCIMENTO EB et al (2005) Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.020>

NENCIONI ALA et al (2018) Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**.

<https://doi.org/10.1186/s40409-018-0139-x>

NORTH RA (2004) P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. **The Journal of Physiology**. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.048587>

NORTH RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological reviews**. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>

OEHLER B et al (2021) Effects of recombinant botulinum neurotoxin type A1 on CFA-induced mechanical allodynia and sensory neuron responses to mechanical stimulation monitored with GCaMP fluorescence in mice. **Toxicon**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.452>

OLIVEIRA IS et al (2024) Understanding the complexity of *Tityus serrulatus* venom: A focus on high molecular weight components. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0046>

OURY C, WÉRA O (2021) P2X1: a unique platelet receptor with a key role in thromboinflammation. **Platelets**.

PARRELA AFB et al (2022) Scorpion envenomation in Brazil: an update. **Infectio**. <https://doi.org/10.22354/in.v26i2.1018>

PASQUINI S et al (2021) Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. **International Journal of Molecular Sciences**. <https://doi.org/10.3390%2Fijms22147685>

PEREIRA N, PEREIRA M (2017) Scorpionic neurotoxins acting on ion channels: a literature review. **Scientia vitae**. <https://www.revistafpsr.com/>. Acessado em 15 de março de 2024.

PETRICEVICH VL (2002) Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of Inflammation**. <https://doi.org/10.1080/09629350210308>

PETRICEVICH VL (2010) Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of inflammation**. <https://doi.org/10.1155/2010/903295>

PILLA C et al (1996) ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**. <https://doi.org/10.3109/09537109609023582>

PUCCA MB et al (2015) *Tityus serrulatus* venom – A lethal cocktail. **Toxicon**. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.015>

RAWISH E, LANGER HF (2022) Platelets and the Role of P2X Receptors in Nociception, Pain, Neuronal Toxicity and Thromboinflammation. **International Journal of Molecular Sciences**. <https://doi.org/10.3390/ijms23126585>

REIS MB et al (2020) Interleukin-1 receptor-induced PGE2 production controls acetylcholine-mediated cardiac dysfunction and mortality during scorpion envenomation. **Nature Communications**. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19232-8>

RITA RC et al (2019) Scorpion venom increases acetylcholine release by prolonging the duration of somatic nerve action potentials. **Neuropharmacology**.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.013>

SALES PBV, SANTORO ML (2008) Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.003>

SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ C et al (2018) Transcriptomic Analysis of Pseudoscorpion Venom Reveals a Unique Cocktail Dominated by Enzymes and Protease Inhibitors. **Toxins**.

doi:10.3390/toxins10050207

SANTUSSI WM et al (2017) Antifungal Activity against Filamentous Fungi of Ts1, a Multifunctional Toxin from *Tityus serrulatus* Scorpion Venom. **Frontiers In Microbiology**.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00984>

SAWYNOK J (1998) Adenosine receptor activation and nociception. **European journal of pharmacology**. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)01605-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01605-1)

SAWYNOK J (2016) Adenosine receptor targets for pain. **Neuroscience**.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.031>

SAWYNOK J et al (1997) Adenosine A3 receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine. **European journal of pharmacology**. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01110-2)

SAWYNOK J, REID A, LIU XJ (2000) Involvement of mast cells, sensory afferents and sympathetic mechanisms in paw edema induced by adenosine A(1) and A(2B/3) receptor agonists. **European journal of pharmacology**.

[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00125-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00125-4)

SAZE Z et al (2013) Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. **Blood**. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482406>

SHETH S et al (2014) Adenosine receptors: expression, function and regulation.

International journal of molecular sciences. <https://doi.org/10.3390%2Fijms15022024>

SOUZA VCG et al (2012) E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Parasitology International**.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.008>

YANG D et al (2010) A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03769.x>

YANG, D. et al. A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 8, n. 4, 2010.

YEGUTKIN GG (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>

ZHANG T et al (2024) Adenosine 2A receptor antagonists promote lymphocyte proliferation in sepsis by inhibiting Treg expression of PD-L1 in spleen. **Immunology**. doi: 10.1111/imm.13744

ZHOU J et al (2019a) Involvement of P2X7 receptors in satellite glial cells of dorsal root ganglia in the bmk i-induced pain model of rats. **General Physiology and Biophysics**. https://doi.org/10.4149/gpb_2019026

ZHOU J et al (2019b) Up-regulation of P2X7 Receptors Contributes to Spinal Microglial Activation and the Development of Pain Induced by BmK-I. **Neuroscience Bulletin**. <https://doi.org/10.1007%2Fs12264-019-00345-0>

ZIMMERMANN H (2021) History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114322>

ZUKOWSKA P et al (2015) The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. **Pharmacological Reports**. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.002>

Figure captions

Figure 1. Effect of *T. confluens* crude venom on E-NTPDase activity in lymphocytes. A) ATP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 72.08 (mean) $\pm$ 41.02 (standard deviation) nmol of Pi/ min/ mg of protein; B) ADP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 75.2 (mean) $\pm$ 46.75 (standard deviation) nmol of Pi/min/mg of protein. The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. * $p < 0.05$. N = 4.

Figure 2. Effect of *T. confluens* crude venom on E-ADA activity in lymphocytes. ADO hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 8.06 (mean) $\pm$ 5.72 (standard deviation) nmol of Pi/ min/ mg of protein. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. N = 6.

Figure 3. Effect of *T. confluens* crude venom on the E-NTPDase activity of rat platelets. A) ATP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 27.2 (mean) $\pm$ 19.3 (standard deviation) nmol of Pi/ min/ mg of protein; B) ADP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 13.8 (mean) $\pm$ 7.3 (standard deviation) nmol of Pi/ min/ mg of protein. The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. ** $p < 0.01$. N = 4.

Figure 4. Effect of *T. confluens* crude venom on E-5'-NT activity of rat platelets. AMP hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 6.8 (mean) $\pm$ 5.2 (standard deviation) nmol of Pi/ min/ mg of protein. The results are expressed as median and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. N = 4.

Figure 5. Effect of *T. confluens* crude venom on E-ADA activity in platelets. ADO hydrolysis activity. Absolute activity of the control group = 3.09 (mean) $\pm$ 2.87 (standard deviation) nmol of Pi/ min/ mg of protein. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. N = 6.

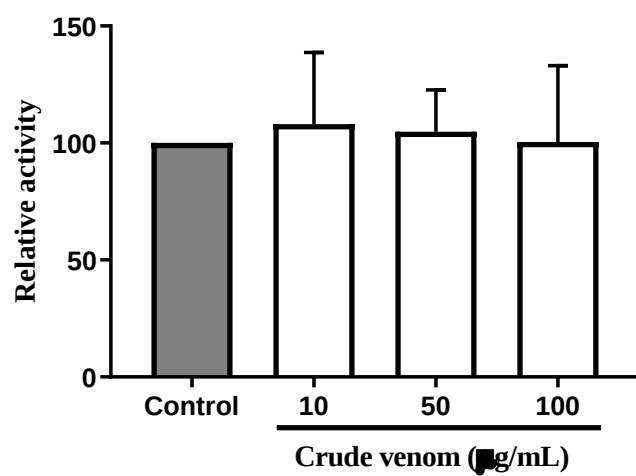
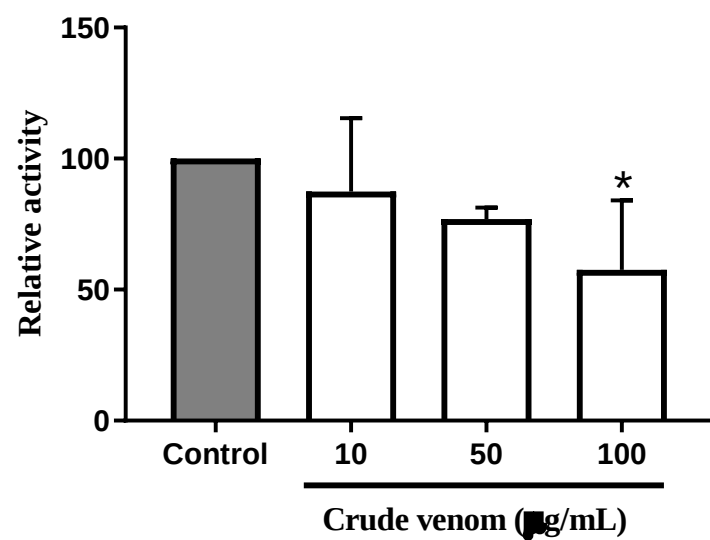
Figure 1**a****b**

Figure 2

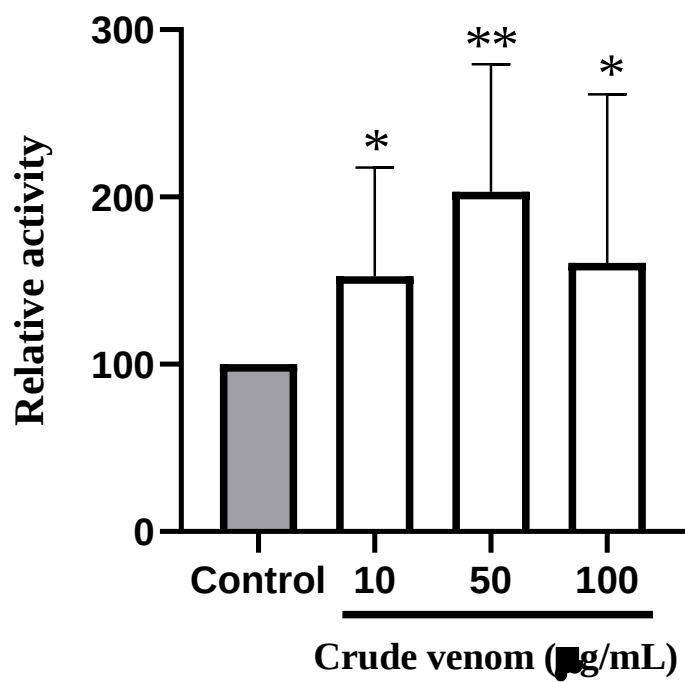
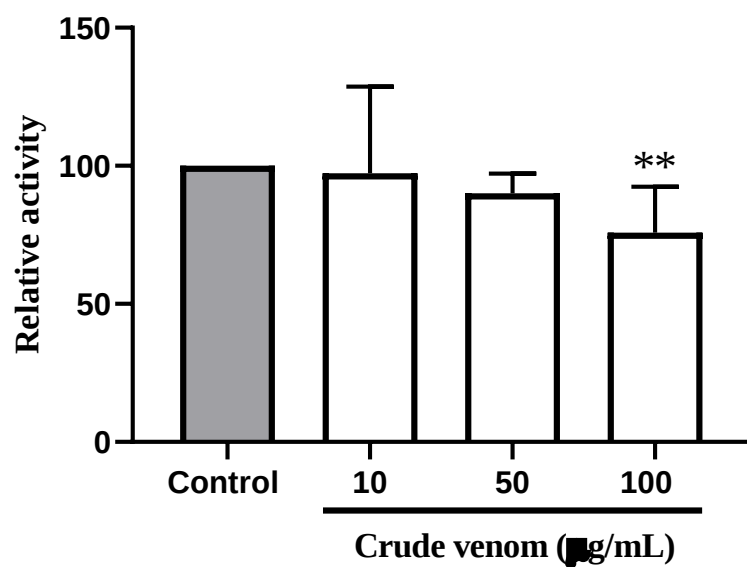


Figure 3

a



b

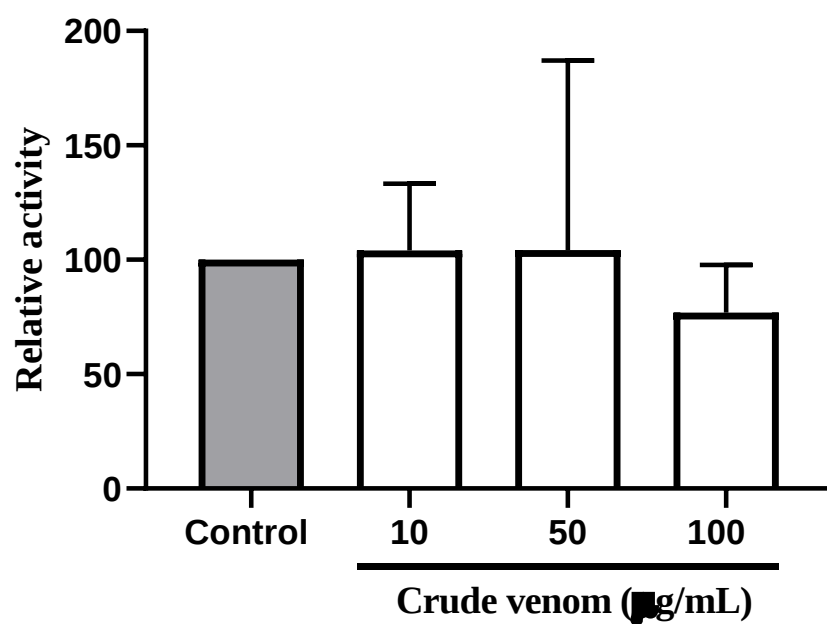


Figure 4

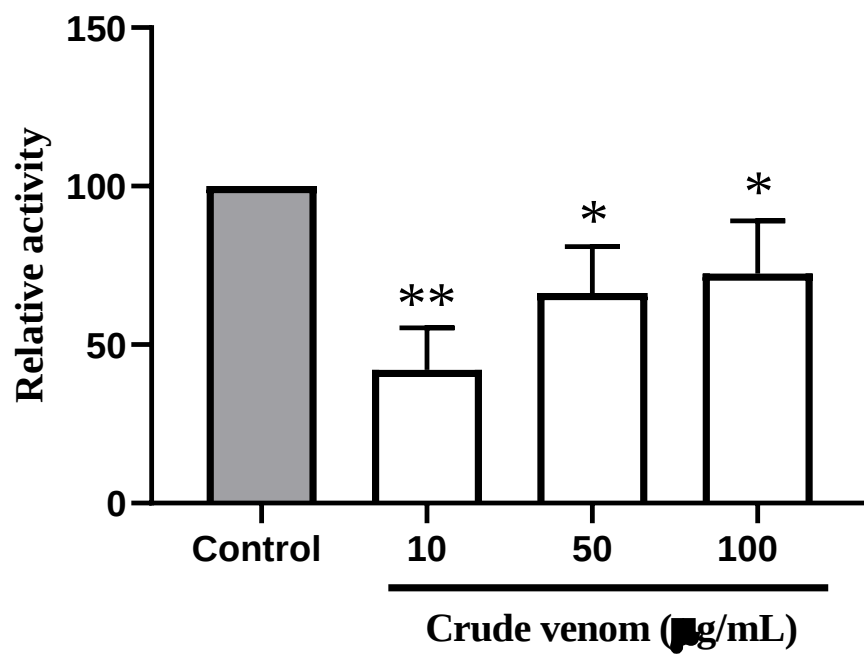


Figure 5

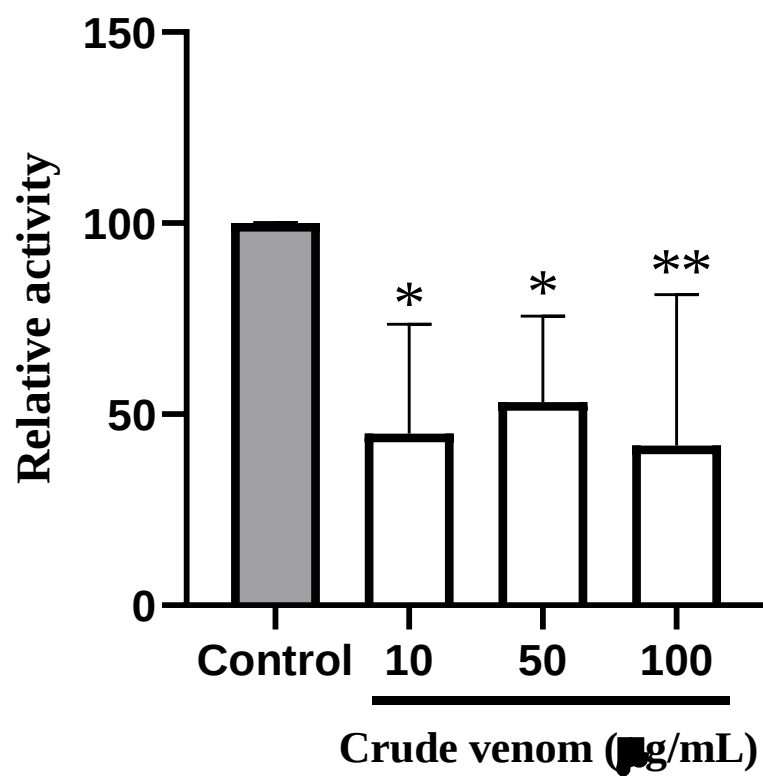


Table 1. Hydrolysis of adenine nucleotides and adenosine by the crude venom of *T. confluens*.

	Crude venom concentration		
	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
ATP hydrolysis	0,622 ± 0,11	3,189 ± 1,94	5,871 ± 3,14
ADP hydrolysis	N.D	N.D	N.D
AMP hydrolysis	N.D	N.D	N.D
ADO hydrolysis	N.D	N.D	N.D

Results are expressed as mean and standard deviation. Absolut activity is expressed as nmol of Pi/ min. N.D = not detected. N = 4.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da peçonha e da hemolinfa de escorpiões *tityus* sp. sobre a atividade de enzimas do sistema purinérgico de linfócitos e plaquetas de ratos”, registrada com o nº 1.262/2022, sob a responsabilidade de Jeandre Augusto dos Santos Jaques - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 01/11/2022.

Finalidade	() Ensino	(x) Pesquisa
Vigência da Autorização	01/12/2022 a 10/10/2025	
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)	
Nº de animais	108	
Peso/Idade	200 gr / adultos	
Sexo	Machos e Fêmeas	
Origem	Biotério central da UFMS	

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 07 de novembro de 2022

ANEXO II – Comprovante de Cadastro de Acesso no SisGen



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A50DE86

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A50DE86**
 Usuário: **UFMS**
 CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Tityus serrulatus

Tityus confluens

Tityus paraguayensis

Título da Atividade: **Efeitos biológicos de componentes da peçonha e da hemolinfa de escorpiões do gênero Tityus**

Equipe

Jeandre Augusto dos Santos Jaques	UFMS
Romário da Silva Portilho	UFMS
Igor Leal Brito	UFMS
Ana Paula Andino Costa	UFMS
Gabriel Silvino de Oliveira Venâncio	UFMS
Malson Neilson de Lucena	UFMS
Henrique Ranieri Covali Pontes	UFMS

Bruna Pache Moreschi
Laís Corrêa
Andreza Negreli Santos

UFMS
UFMS
UFMS

Data do Cadastro: **24/08/2022 17:26:36**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:26** de **24/08/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO III – Licença permanente do ICMBio para coleta de material zoológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 86953-1	Data da Emissão: 27/01/2023 11:12:46	Data da Revalidação*: 27/01/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Malson Neilson de Lucena	CPF: 070.026.526-05
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	CNPJ: 15.461.510/0001-33

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
4	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
7	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
8	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
9	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
10	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
11	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
12	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
13	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
14	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0869530120230127

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 86953-1	Data da Emissão: 27/01/2023 11:12:46	Data da Revalidação*: 27/01/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Malson Neilson de Lucena	CPF: 070.026.526-05
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	CNPJ: 15.461.510/0001-33

Outras ressalvas

1	Esta licença não autoriza a coleta em cavidades naturais e adjacências.	CECAV Brasília-DF
---	---	-------------------

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
2	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Ordem	Animalia > Arthropoda > Arachnida > Scorpiones

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0869530120230127

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 86953-1	Data da Emissão: 27/01/2023 11:12:46	Data da Revalidação*: 27/01/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Malson Neilson de Lucena	CPF: 070.026.526-05
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	CNPJ: 15.461.510/0001-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0869530120230127

Página 3/3

ANEXO IV – Comprovante de submissão

Química Nova

química nova

First evidence that the venom of *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Buthidae) alters the purine metabolism in blood cells of rats

Journal:	Química Nova
Manuscript ID	QN-2024-0061
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Feb-2024
Complete List of Authors:	Portilho, Romário; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, INBIO dos Santos, Andreza N.; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, INBIO Brito, Igor; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências de Lucena, Malson Neilson; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Jaques, Jeandre Augusto; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Keyword:	Ectonucleotidases, Adenosine deaminase, Adenine nucleotides, Venom, Scorpion
Please, specify if the submission is for a Regular Issue or Special Issue:	Regular Issue

SCHOLARONE™
Manuscripts