

Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho

**Análise dos componentes proteolíticos e peptídicos do veneno do
escorpião *Tityus serrulatus***

São Paulo

2013

Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho

**Análise dos componentes proteolíticos e peptídicos do veneno do
escorpião *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Calheta Vieira Portaro

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Carvalho, Daniela Cajado de Oliveira Souza

Análise dos componentes proteolíticos e peptídicos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* / Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho - São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Fernanda Calheta V. Portaro

1. Escorpiões
2. Peptídeos
3. Peptídeo hidrolases
4. Venenos de escorpiões

SES/CCD/CD-274/13

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” - Madre Teresa de Calcutá.

Agradecimentos

A realização deste trabalho marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização, em especial:

Ao Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan e a Dr^a. Denise Vilarinho Tambourgi pela oportunidade de estágio e de aprimoramento profissional;

Ao Dr. Osvaldo A. Sant'Anna, coordenador do INCTTOX, pela oportunidade de desenvolvimento do projeto;

Ao Prof. Dr. Luís Roberto C. Gonçalves por todo apoio que permitiu a realização deste trabalho;

À Dr^a. Fernanda Calheta Vieira Portaro por sua orientação, carinho e dedicação.

A meu colega de laboratório e amigo Alexandre Kazuo Kuniyoshi por toda ajuda e colaboração;

Aos que contribuíram para a realização do projeto: Dr^a. Vanessa Rioli, e seu aluno Bruno Duzzi, por participação direta no trabalho, além do fornecimento das enzimas recombinantes EP24.16 e EP24.15; Dr. Fábio Gozzo e a sua aluna, Mariana Fioramonte, do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química (Campinas, SP) pelo sequenciamento das amostras; Dr^a. Mônica Spadafora Ferreira pela colaboração ao projeto;

Aos professores, pesquisadores, alunos e funcionários do laboratório, pelo trabalho exemplar e pela ajuda diária;

A FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado e o suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho;

A minha família, pelo apoio para a realização desta qualificação;

A meus amigos e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto;

Resumo

Acidentes causados por escorpiões representam um grave problema de saúde pública no Brasil, sendo a principal espécie o *Tityus serrulatus*, devido a sua ecologia, sua estratégia reprodutiva e a potência do envenenamento. Na composição deste veneno, diversos polipeptídios neurotóxicos que afetam canais de Na⁺ e K⁺ podem ser encontrados, sendo esse o maior foco das pesquisas relacionadas ao assunto. Em contrapartida, pouca informação sobre componentes proteolíticos e peptídicos no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (VTs) está disponível na literatura. Deste modo, este trabalho visou estudar novos peptídeos presentes no VTs capazes de interagir com oligopeptidases, além de caracterizar a atividade proteolítica do veneno do escorpião amarelo, relacionando substratos biológicos de importância para o envenenamento, tendo em vista que até o presente momento não existe tal assimilação. Para o estudo de atividade proteolítica do VTs, foram utilizados substratos de fluorescência apagada, sendo que Abz-GGFLRRV-EDDnp foi selecionado como substrato ideal, além da família enzimática ser determinada pelo uso de inibidores específicos. O ponto de clivagem deste substrato foi estimado ser entre leucina e arginina. Por meio de ensaios de fluorescência, padrões bioquímicos de atividade ótima do veneno total, como pH, temperatura e influência de sais, foram estabelecidos. A partir disso, foram realizados experimentos para determinação substratos peptídicos com atividade biológica, analisados em sistema de HPLC, sendo que somente foi observada hidrólise para a dinorfina 1-13, onde os fragmentos foram analisados por espectrometria de massas para a determinação dos pontos de clivagem. Foi evidenciada a liberação do peptídeo opióide leu-encefalina, podendo estar atuando sobre canais de K⁺, como indicam dados da literatura, o que estaria relacionado com os efeitos neurotóxicos do veneno. Na tentativa de verificarmos se apenas uma peptidase estava sendo responsável pela atividade observada, iniciamos etapas de purificação utilizando membrana de corte molecular de 30 kDa (fração G) e, em seguida, cromatografia de fase-reversa em HPLC. Na segunda parte, referente aos componentes peptídicos, foi enfatizada a seleção de peptídeos capazes de reduzir a atividade das oligopeptidases EP24.15 e EP14.16, escolhidas principalmente pela propriedade de interagirem com oligopeptídeos e por estarem localizadas no sistema nervoso central. Para a obtenção do *pool* peptídico, a amostra foi processada por membrana de corte molecular de 10 kDa e separação por HPLC, onde as frações obtidas foram testadas em ensaios de atividade enzimática com as oligopeptidases. Os picos de melhor capacidade inibitória tiveram suas sequências reveladas por espectrometria LC-MS/MS, onde seis sequências foram sintetizadas e novamente testadas, obtendo valor de constante de inibição e mecanismo de ação dos mesmos.

Palavras-Chave: escorpião amarelo; *Tityus serrulatus*; peptídeos; peptidase; componentes do veneno

Abstract

Accidents caused by scorpions represent a serious public health problem in Brazil, whereas the main specie is *Tityus serrulatus*, due to their easy adaptation on urban centers, its reproductive strategy and the potency of its the venom. In the composition of the venom, several neurotoxic polypeptides that affect Na⁺ and K⁺ channels can be found, being the main focus of the researches related to this subject. In contrast, little information about other peptides and proteolytic components in the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (VTs) is available in the literature. Considering it, this work aimed to find in VTs new bioactive peptides able to modulate oligopeptidase EP24.15 and EP24.16 activity *in vitro* and, in addition, to characterize the proteolytic activity of the VTs, assigning it to biologically active substrates that could be cleavage during the envenomation, considering that so far there is no such assimilation. To study the VTs proteolytic activity, FRETs were used as substrates, being Abz-GGFLRRV-EDDnp selected as the ideal substrate, also establishing the enzyme class by the use of specific inhibitors. We detected a cleavage in Abz-GGFLRRV-EDDnp between Leucine and Arginine. In the first part, in order to determine biochemical standards, we obtained values such as pH, temperature and salt influence through fluorescence assays using the whole venom. After it, experiments were conducted to determine biologically active substrates, analyzed in the HPLC system, while hydrolysis was only observed for dynorphin 1-13, where the fragments were analyzed by mass spectrometry to determine the points of cleavage. The result showed the release of the opioid peptide leu-enkephalin, which may be acting on K⁺ channels, what could indicate an indirect neurotoxic effect of the venom. In attempt to verify if only one enzyme was responsible for the observed peptidase activity, we started a preliminar purification step using a 30 kDa membrane of molecular cutoff, obtaining the fraction G that was analysed on reverse-phase chromatographed (HPLC). In the second part, which regards the peptide components, we emphasized on the selection of peptides capable to reduce the activity of oligopeptidases EP24.15 and EP14.16, chosen primarily due its property to interact with oligopeptides and due its localization in the central nervous system. To obtain the peptide pool, the VTs was processed by a 10 kDa molecular weight cut off membrane and separated by HPLC, and the fractions were tested in enzyme activity assay with the oligopeptidases. The peaks that had best inhibitory potential activity had their sequences revealed by mass spectrometries analysis, and six sequences were synthesized and re-tested. After this, the values of inhibition constant and the mechanism of action were obtained.

Keywords: yellow scorpion; *Tityus serrulatus*; peptides; peptidase; venom compounds

Lista de Tabelas

Tabela 01. Neurotoxinas de <i>T. serrulatus</i> e sua função (Adaptado de Cologna et al., 2009)	7
Tabela 02. Porcentagem e sítios de clivagens das enzimas recombinantes EP. 24.15 e EP. 24.16.	16
Tabela 03. Atividade específica e pontos de hidrólise obtidos no estudo de ponto de clivagem para os substratos fluorescentes Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5.	30
Tabela 04. Teste de atividade específica (UF/min/ μ g) com as frações obtidas por fracionamento do VTs por membranas de corte molecular. Ensaio realizado em fluorímetro utilizando o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 μ M).	38
Tabela 05. Atividade específica (UF/min/ μ g) das subfrações de G (> 30 kDa) utilizando o Abz-GGFLRRV-EDDnp como substrato	40
Tabela 06. Taxa de consumo da dinorfina 1-13 (31 μ M) pelo veneno total, a fração G e suas subfrações G02 e G10 em RP-HPLC em coluna C-18 após 5 horas de incubação	41
Tabela 07. Porcentagem de redução da hidrólise do QFS pelas oligopeptidases neurolisina e thimet oligopeptidase pelos picos de HPLC da fração P (<10kDa) do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> .	44
Tabela 08. Resultados da análise por Mascot de P13-1e P13-2. Análise em ExPASy Proteomics Server utilizando a ferramenta BLAST.	47
Tabela 09. Resultados da análise do sequenciamento <i>de novo</i> para P6-2. Dados obtidos no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química (Campinas – SP).	47
Tabela 10. Taxa de clivagem relativa (%) dos peptídeos sintéticos obtidos a partir da fração de baixo peso do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> .	48
Tabela 11. Mecanismos de inibição e constante de inibição (K _i) obtidos pela inibição das oligopeptidases EP24.15, EP24.16 e ECA por peptídeos sintéticos obtidos do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> .	49
Tabela 12. Presença do peptídeo KEILG e seu similares em região de pró peptídeo no veneno de escorpiões do gênero <i>Tityus</i> .	60

Lista de Figuras

- Figura 01.** Espécime de *Tityus serrulatus* – À esquerda, é possível visualizar as características as serrilhas dorsais nos últimos segmentos do metassoma, característica da espécie (Cologna et al., 2009); À direita, exemplar evidenciando a coloração amarelada (Foto tirada por Bruno Duzzi, Instituto Butantan, 2012). 3
- Figura 02.** Acidentes por Animais Peçonhentos no Brasil no ano de 2011 (SINAN, 2013). 4
- Figura 03.** Transcriptoma do veneno de *Tityus serrulatus* mostrando a abundância das principais moléculas transcritas (Figura adaptada, retirada de Alvarenga et al., 2012). 9
- Figura 04.** Ensaio de atividade proteolítica (Unidades de Fluorescência/minuto) para a determinação de substrato ideal para o estudo das enzimas do veneno de *Tityus serrulatus*. Somente os substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp e Abz-KLRFSKW-EDDnp foram hidrolisados. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5. S/A = sem atividade. Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%. 29
- Figura 05.** Teste de atividade utilizando os inibidores de metalopeptidases (EDTA, 50 mM) e serinopeptidases (PMSF, 1 mM). A inibição total por EDTA indica a atuação exclusiva de metalopeptidases no substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5. Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%. 31
- Figura 06.** Gráfico de curva de pH da fração do veneno total de *Tityus serrulatus*, mostrando a diferença de velocidade (UF/min) de acordo com a mudança do pH. A partir disso, pode-se dizer que os pHs ótimos são 8 e 9,5. Para cada faixa de pH, foram feitos tampões específicos: citrato de sódio 50 mM (pH 4 – pH 5); Fosfato de sódio 50 mM (pH 5,5 – pH 7,5); Tris básico 50 mM (pH 8- pH 12) Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%. 32
- Figura 07.** Influência dos cátions monovalentes (Painel A) e bivalentes (Painel B) sobre a atividade peptidásica do veneno de *Tityus serrulatus* em 33

diferentes concentrações. O gráfico mostra a média de velocidade de hidrólise (UF/min, variando com a presença de cada cátion em concentrações de 0 mM (controle) a 50 mM. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5. Ensaios feitos em triplicatas com desvios inferiores a 10%.

Figura 08. Gráfico representando os valores obtidos de velocidade média do VTs de acordo com a variação da temperatura. Os valores testados foram de 24°C até 42°C, em intervalos de 5°C. O veneno foi pré-incubado com tampão no aparelho nas temperaturas descritas, sendo o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp adicionado em seguida. Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%. 34

Figura 09. Perfil cromatográfico pós-incubação da Dinorfina 1-13 (31µM) com 5 µg do veneno total de *Tityus serrulatus* por 4 horas em tampão Tris básico 50mM NaCl 50mM, pH 8 a 37°C, sendo que o controle está representado pela cor rosa e o incubado com o veneno roxo . Somente foi possível observar clivagem da dinorfina (clivagem total), gerando três picos. 36

Figura 10. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 12,5%, das frações P (<10 kDa) , M (10-30 kDa) e G (>30kDa), obtidas por fracionamento do VTs por membranas de corte molecular 37

Figura 11. Perfil Cromatográfico da fração G (> 30 kDa) após análise em HPLC, resultando na obtenção de 10 frações (G01-G10). Os tampões de corridas utilizados foram solução A (H₂O/0,1%TFA) e solução B (acetonitrila/tampão A 9:1). Os parâmetros da corrida foram gradiente de 1,5% B/min (Linha azul), sob fluxo de 1mL/min. 39

Figura 12. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 12,5% em coloração prata, das subfrações de G (> 30kDa), G10 e G02, obtidas por HPLC em fase reversa. 40

Figura 13. Perfil Cromatográfico da fração P (> 10 kDa) em RP-HPLC. A Figura mostra a obtenção de 15 frações (P01-P15), os quais foram coletados e liofilizados para análises posteriores. 42

- Figura 14.** Perfil cromatográfico das frações de P (<10kDa) do veneno de *Tityus serrulatus* em RP-HPLC. As amostras foram separadas com diferentes gradientes de tampão B, sendo de 15-40% (0,6 %B/min) para a fração 6 e 15-30% (0,375%B/min), utilizado para as frações P12 e P13 dependendo da especificidade de cada amostra. As frações foram coletadas e liofilizadas. 45
- Figura 15.** Ensaios de atividade de thimet oligopeptidase com peptídeos da fração P. (A) Gráfico esquemático obtido com os fragmentos de P6; (B) Resultados, em porcentagem, de inibição obtida com as frações que possuíam mais de um pico no HPLC. S/I= atividade “inibitória” não detectada. 46
- Figura 16.** Perfis cromatográficos obtidos em RT-HPLC : (A) 20µL da fração P (<10kDa) do veneno de *Tityus serrulatus* contendo 40µM de KEILG e 40µM de KELLG; (B) 20µL da fração P original ; (C) 20µM de KEILG; (D) 20µM de KELLG. O gradiente utilizado foi de 1,25% B/min com absorção UV a 214 nm. 50

Lista de Abreviaturas

Aa	Aminoácido(s)
Abs	Absorbância
Abz	Radical fluorescente ácido <i>orto</i> -aminobenzoico
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ACN	Acetonitrila
BSA	Soro Albumina Bovino
BPP	Peptídeo Potencializador de Bradicinina
EDDnp	Grupo apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP24.15	Thimet oligopeptidase
EP24.16	Neurolisina
FRET	“Free Ressonance Energy Transfer”
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
MCA	Metil Cumarina
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
MMP	Metaloprotease de Matriz
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
PAPE	Fragmentos de sequência tetrapeptídica Pro-Ala-Pro-Glu de repetição em tandem
PBS	Tampão Fostato Salino
PMSF	Fenil-metano(sulfonil)fluoreto
QFS	“Quenched Fluorescent Substrate”
Q-TOF	“Quadrupole-time of flight”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SNARE	“ SNAP (Soluble NSFAttachment Protein) RE ceptor”
SNC	Sistema Nervoso Central
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano

TsHpt	Hipotensinas do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>
TsTx	Toxina de <i>Tityus serrulatus</i>
TFA	Ácido Trifluoroacético
UF/min	Unidade de Fluorescência por minuto
VAMP	“Vesicle associated membrane protein”
VTs	Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>

Lista de Abreviaturas de Aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	The	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Sumário

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Escorpiões e suas características gerais	1
1.2 – <i>Tityus serrulatus</i> , O Escorpião Amarelo	2
1.3 – Neurotoxinas de canais iônicos e outros componentes do veneno	5
1.4 – As enzimas proteolíticas	10
1.5 – As oligopeptidases	14
1.6 – Importância do trabalho	16

2. OBJETIVOS 19

3. METODOLOGIA

3.1 – Caracterizações bioquímicas de peptidases do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	21
3.1.1 - Detecção de atividade proteolítica no veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	
3.1.2 -Determinação da classe enzimática	21
3.1.3 -Determinação do pH ótimo (curva de pH)	22
3.1.4 - Influência de cátions monovalentes e bivalentes	22
3.1.5 -Determinação da temperatura ótima	22
3.1.6 -Teste de atividade peptidásica sobre peptídeos biologicamente ativos	23
3.1.7 - Purificação parcial das metalopeptidases presentes no VTs: obtenção da fração de alta massa molecular (> 30 kDa)	23
3.1.8 – Fracionamento da fração de alta massa molecular (>30kDa) por HPLC fase reversa	24
3.1.9 - Ensaio de atividade peptidásicas sobre a Dinorfina 1-13	24
3.2 - Busca de peptídeos do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> selecionados por modular a atividade enzimática de oligopeptidases recombinantes.	25
3.2.1 - Purificação de componentes peptídicos por cromatografia em fase reversa	25
3.2.2 - Espectrometria de massas e análise das sequências primárias dos peptídeos purificados.	26
3.2.3 - Síntese dos peptídeos com atividade inibitória	26
3.2.4 - Determinação de mecanismos e constantes de inibição	27
3.2.5 – Determinação da sequencia correta de KEXLG presente no VTs	27

4. RESULTADOS	
4.1 – Estudo da atividade proteolítica do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	29
4.1.1 - Evidência de atividade proteolítica e busca por substrato ideal	
4.1.2- Determinação da classe proteolítica.	29
4.1.3 - Determinação do pH ótimo (curva de pH)	31
4.1.4- Estudo da influência de cátions monovalentes e bivalentes	33
4.1.5 - Influência da temperatura na atividade enzimática	34
4.1.6- Atividade sobre peptídeos biologicamente ativos: Incubação com peptídeos e análise HPLC	35
4.1.7 - Fracionamentos do veneno total: Purificação parcial da(s) metalopeptidase(s) do VTs (Etapas Iniciais)	36
4.1.8 - Purificação da fração G (>30 kDa) por HPLC	38
4.2 – Busca de peptídeos moduladores de atividade peptídásica de oligopeptidases recombinantes.	42
4.2.1- Obtenção e caracterização das frações do veneno de <i>T. serrulatus</i> utilizando membrana de corte molecular e HPLC	42
4.2.2 - Análise das Sequências Primária dos Peptídeos de Interesse	46
4.2.3 – Determinação da sequência correta de KEXLG presente no VTs	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	64
7. ARTIGOS GERADOS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ANEXO I – Artigo publicado “Insights into scorpion venom peptides: Alternative processing of β -KTx propeptide from *Tityus serrulatus* venom results in a new naturally occurring thimet oligopeptidase inhibitor.”

ANEXO II – Artigo publicado “Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralization potential of therapeutical antivenoms”

1. Introdução

1.1– Escorpiões e suas características gerais

Os artrópodes são os representantes invertebrados com o maior número de animais catalogados na literatura, representando cerca de 4/5 de todas as espécies descritas (Rupert e Barnes, 2005). Com exceção dos insetos (subfilo Hexapoda), o grupo de artrópodes com maior sucesso evolutivo em termos de quantidade de espécies, abundância de seres e diversidade ecológica é o dos aracnídeos (subfilo Chelicerata). Essa conquista é subsequente às diversas adaptações para a vida terrestre com ênfase especial aos pulmões foliáceos opistossomais, desenvolvidos por escorpiões e Tetrapulmonata, crucial para a transição do meio aquático para o terrestre por esses animais (Scholtz e Kamenz, 2006). Outra mudança morfológica importante para a transição desses meios foi a carapaça quitinosa que compõe seu exoesqueleto, o que auxiliou a prevenir a evaporação excessiva de seus líquidos internos (Cândido, 1999).

O êxito evolutivo dessas adaptações é comprovado, pois os escorpiões são os representantes dos aracnídeos mais antigos do planeta, com registros fósseis datados de aproximadamente 400 milhões de anos (Bortoluzzi et al, 2007). Esse grande tempo de permanência na Terra provavelmente permitiu que esses quelicerados explorassem todos os continentes do globo, não sendo encontrados somente na Antártida (Cândido, 1999).

Os escorpiões são, em sua maioria, animais noturnos, provavelmente devido a melhores condições climáticas e por seu hábito predatório (Cândido, 1999). Durante o período matinal, esses animais refugiam-se em locais escuros de temperatura e umidade relativamente estáveis tais como buracos, montes de entulho, fendas de muros, sob as areias do deserto. Devido a este estilo de vida, os acidentes causados por escorpiões são favorecidos, pois, quando encontrados, são comumente confundidos com o ambiente ou até parecem mortos, facilitando a ferroada (Cândido, 1999; Oliveira et al., 1999; Soares et al., 2002).

Quanto à taxonomia, são atualmente conhecidas na ordem Scorpiones aproximadamente 1200 espécies de escorpiões que se agrupam em 155 gêneros e 16 famílias em todo o mundo. No Brasil, atualmente, são encontradas apenas 86 espécies (Brazil et al., 2009), sendo que, de acordo com dados publicados pela Fundação

Nacional da Saúde, 60% da fauna escorpiônica brasileira é representada pelo gênero *Tityus* (FUNASA, 2001).

1.2– *Tityus serrulatus*, O Escorpião Amarelo.

O gênero *Tityus* é o principal responsável por casos de envenenamento no Brasil, sendo que a maioria dos acidentes é causada por três espécies: *Tityus serrulatus* ou escorpião amarelo, encontrado principalmente na Bahia, sul de Goiás, Paraná e Sudeste; o escorpião marrom, *T. bahienses* que, além de estar presente na região Sudeste, habita também a região Sul do Brasil; na região nordeste, a espécie *T. stigmurus* é predominante (Torres et al., 2002).

O escorpião amarelo possui um veneno com alta toxicidade e, devido ao fato de ser responsável por grande parte dos envenenamentos escorpiônicos no Brasil, atualmente é considerado um problema de relevância para a saúde pública (FUNASA, 2001). Originalmente, habitava matas e florestas, entretanto com a expansão urbana e o desmatamento, tem sido frequentemente encontrado em cidades, devido a fácil adaptação a este ambiente (Brazil et al., 2009). Além disso, sua estratégia reprodutiva, diferentemente dos outros integrantes do gênero *Tityus*, é a partenogênese, onde há desenvolvimento do embrião sem a fertilização, acarretando em uma população somente formada por fêmeas. Cada uma pode ter até quatro parições, originando um total de 70 filhotes ao longo de toda vida (Soares et al., 2002). Assim, essa facilidade de reprodução somada a ausência de predadores naturais favoreceu a colonização de *T. serrulatus* em centros urbanos, pois apenas um indivíduo pode gerar uma colônia (Brazil et al., 2009).

O escorpião *Tityus serrulatus* foi primeiramente descrito por Adolpho Lutz e Oswaldo Mello de Campos em 1922, destacando-se pela potencialidade tóxica de seu veneno (Lutz e Mello, 1922). Morfologicamente, *T. serrulatus* apresenta traços bem marcantes, característicos de sua espécie (Figura 01). As patas, cauda e pedipalpo apresentam coloração amarelada, o que proporcionou a designação popular de “escorpião amarelo”. Pode ser observada uma serrilha dorsal nos dois últimos segmentos de seu corpo, o que justifica o nome científico de “serrulatus”. O veneno é armazenado e produzido por duas glândulas localizadas no télson, sendo que a

inoculação se dá pelo ferrão (ou órgão inoculador de ferrão). São animais pequenos, geralmente medindo de 6 a 7 cm (FUNASA, 2001).

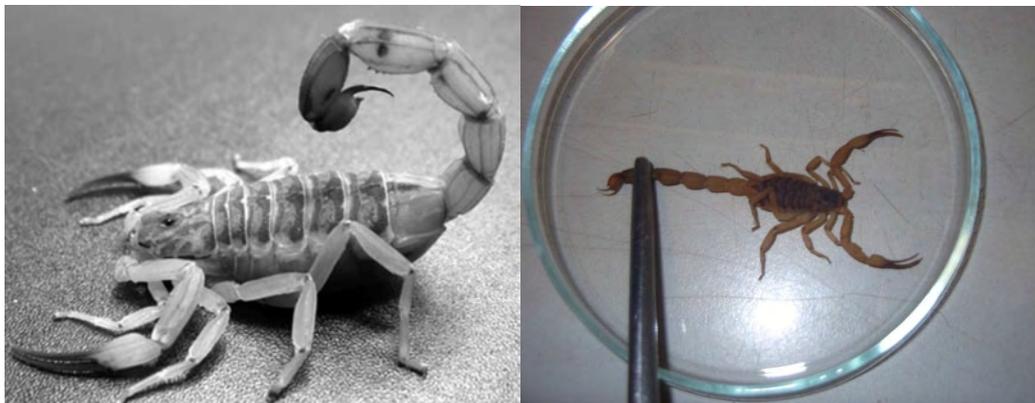


Figura 01. Espécime de *Tityus serrulatus* – À esquerda, é possível visualizar as serrilhas dorsais nos últimos segmentos do metassoma, característica da espécie (Cologna et al., 2009); À direita, exemplar evidenciando a coloração amarelada (Foto tirada por Bruno Duzzi, Instituto Butantan,2012).

No Brasil, os acidentes por animais peçonhentos representam um problema histórico e atual de relevância para a saúde pública, pois o envenenamento pode gerar incapacidade temporária ou definitiva ou até levar a vítima a óbito. Segundo o ministério da saúde, em 2011, ocorreram aproximadamente 60 mil casos de acidentes por escorpiões, sendo 87 óbitos registrados pelo agravo notificado. Dados apresentados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), publicados pela agência de notícias da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo no Boletim de setembro de 2007, mostram que os acidentes causados por escorpiões são responsáveis por um terço de envenenamentos por animais em todo o Brasil, superando acidentes provocados por cobras e aranhas desde 2004. A Figura 02 mostra o panorama de acidentes provocados por animais peçonhentos no ano de 2011.

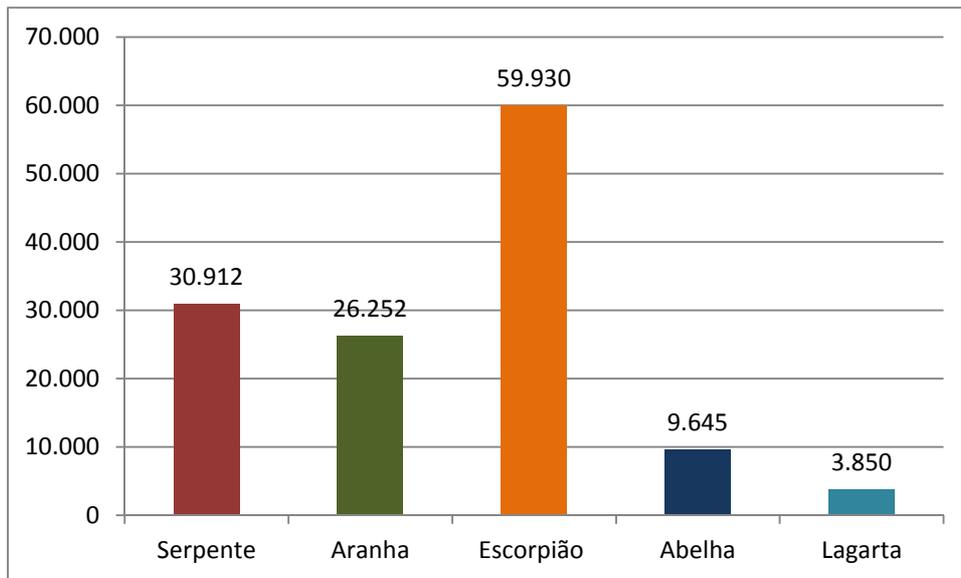


Figura 02. Acidentes por Animais Peçonhentos no Brasil no ano de 2011 (SINAN, 2013).

O acidente humano cujo agente etiológico é o escorpião denomina-se escorpionismo (Lira-da-Silva et al., 2009). Segundo Chippaux e Goyffron (2008), a sintomatologia pode ser dividida didaticamente em três fases: A primeira etapa, estágio I, inicia-se logo após a picada, sendo caracterizada pela intensa e persistente dor relatada pela vítima. Esta fase pode durar de 10-15 horas e, algumas vezes, até um dia. Outros sintomas podem ser notados, como agitação, estado febril, sudorese, náuseas, fraqueza, sensação de desmaio e hipertensão/hipotensão arteriais. Geralmente, o paciente busca atendimento logo após o acidente. Caso o tratamento não seja iniciado, o envenenamento se torna severo. A partir disso, o estágio II apresenta piores sintomas, tais como, dor epigástrica, cólicas, vômitos, diarreia, hipotensão, bradicardia, obstrução pulmonar. O estágio III corresponde a um quadro clínico potencialmente letal, pois o risco de colapso cardíaco é aumentado, além de um agravamento de problemas respiratórios. Em crianças, o risco da evolução direta do estágio I para o estágio III é grande.

Para o tratamento nas primeiras horas após a picada, o paciente deve receber além de analgésicos para diminuição da dor, doses de soro anti escorpiônico, cuja quantidade varia de acordo com a sintomatologia. Em crianças, é altamente recomendado o tratamento sorológico, enquanto em adultos, o uso de analgésicos já

promove uma melhora ao paciente (Chippaux e Goyfroon, 2008). Tal fator se dá pela dose de veneno inoculada em relação à idade e ao tamanho do indivíduo.

Os efeitos do envenenamento no sistema nervoso central e inflamação pulmonar aguda implicam no questionamento de quais células, moléculas e fatores estariam sendo afetados e por quais componentes tóxicos do veneno. A observação do quadro clínico pode servir de gatilho inicial para pesquisas que busquem desvendar quem são estes componentes e onde atuam. Para *T. serrulatus* a ação de seu veneno é caracterizada principalmente como neurotóxica, promovida por peptídeos que afetam canais iônicos, sendo que pouco se sabe da ação de outros componentes do veneno durante o envenenamento.

1.3 – Neurotoxinas de canais iônicos e outros componentes do veneno

Atualmente, são encontradas na literatura descrições de aproximadamente 400 neurotoxinas em venenos escorpiônicos, sendo que dentre elas 200 são neurotoxinas que atuam em canais de sódio, 150 atingem canais de potássio, 19 em canais de cloro e apenas 10 toxinas descritas afetam canais de cálcio (Zhijian, 2005). As neurotoxinas de escorpião mais estudadas são as que atuam sobre canais de Na^+ e K^+ . A maioria das Na^+ -toxinas são compostas de 61-70 aa, as K^+ -toxinas apresentam 31-39 aa, enquanto que a clorotoxina, específica para canal de Cl^- apresenta 36 aa. Todas elas têm sua estrutura estabilizada por 3 a 4 pontes dissulfeto (Becerril et al., 1997). Apesar da variação da estrutura primária, existe um motivo estrutural conservado entre as famílias dessas toxinas. Todas elas apresentam uma sequência básica altamente conservada formada por uma estrutura α -hélice e 3 folhas- β , mantidos por 2 pares de pontes dissulfeto formadas entre 2 sequências constantes estiradas Cys-X-X-X-Cys e Cys-X-Cys, onde X é um aminoácido qualquer.

Em geral, os canais iônicos são importantes para diversas funções do sistema nervoso central e, com isso, as neurotoxinas de escorpiões exploram esse envolvimento neurofisiológico para obterem sucesso no envenenamento. No caso dos canais de cálcio, participam na geração do potencial de ação e na sinalização para eventos de transdução na membrana celular, podendo ser encontrados em células cardíacas, neuronais, esqueléticas e endócrinas. A entrada de íons de cálcio também pode estar relacionada a liberação de neurotransmissores (Yamakagi e Namiki, 2002). Já os canais de cloro são

seletivos poros de ânions com numerosas funções fisiológicas, dentre as quais se podem citar: estabilização do potencial de membrana em músculo esquelético; regulação de volume em diversas células; em epitélio, ajuda no transporte de fluidos; possui papel importante na formação dos receptores de GABA na membrana pós-sináptica (para revisão, Suzuki et al., 2005). Apesar de diversas espécies de escorpiões apresentarem toxinas que atuem nesses dois tipos de canais, até o presente momento não foram diagnosticadas neurotoxinas que afetem canais de cálcio e cloro no veneno do *T. serrulatus*.

Desta maneira, segundo Cologna et al. (2009), as neurotoxinas e *T. serrulatus* encontradas atualmente somente agem sobre **canais de sódio**, principalmente, e **potássio**, como mostra a Tabela 01. Os **canais de sódio** dependentes de voltagem são responsáveis pela ativação do potencial de membrana em neurônios e outras células excitáveis por carga elétrica (Catarral et al., 2000). Devido a existência de diferentes efeitos farmacológicos, as toxinas específicas para canais de sódio podem ser divididas em dois grupos: α - e β -toxinas. As alfa toxinas bloqueiam o sítio três dos canais de sódio voltagem dependente, as β -toxinas bloqueiam o sítio quatro dos canais independentemente do potencial de membrana, afetando assim a ativação dos mesmos (Possani et al., 1999). Os **canais de potássio** são altamente conservados durante a evolução e podem apresentar funcionalidades em cooperação com canais de sódio, dimensionando a entrada de potássio e mantendo o volume celular. Porém, outras funções ainda lhe são cabíveis, tais como a participação da liberação de hormônios e neurotransmissores, excitação de neurônios e músculos ou até participando no controle do potencial de membrana.

Tabela 01. Neurotoxinas de *T. serrulatus* e suas funções (Adaptado de Cologna et al., 2009)

Canal	Nome	Função
Neurotoxinas que afetam Canais de Sódio	TsTx	Provoca liberação de neurotransmissores (especialmente catecolaminas e acetilcolina), além de provocar liberação de NO para induzir o relaxamento muscular em corpos cavernosos.
	TsTx-I	Despolarização da membrana de nervos periféricos em anfíbio anuro <i>Xenopus laevis</i> , induzindo atividade espontânea que se cessa em poucos minutos
	TsTx-II/ TsTx-III	Injeções em hipocampo provocaram uma neurodegeneração; Pode causar aumento da liberação de glutamato.
	TsTx-V	Em nervo vago de coelhos foi demonstrado que promove a prolongação do potencial de ação em fibras mielinizadas; induz liberação de NO; aumenta indiretamente a permeabilidade de K ⁺ ; induz a liberação de catecolaminas.
Neurotoxinas que afetam Canais de Potássio	TsTx-IV	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 K ⁺
	TsTx-K α	Em culturas de neurônios de mamíferos, é um potente e seletivo bloqueador de canal de potássio.
	TsTx-K β	Bloqueia canais de potássio voltagem dependente de sinaptossomos de cérebro de rato.
	Ts Kappa	Compete com a apamina em cérebros de rato.

Componentes não neurotóxicos

Além das neurotoxinas, apesar de menos conhecidos, outros componentes do veneno de *T. serrulatus* já foram descritos. A análise peptidômica do veneno por Rates et al. (2008) demonstra que, em meio às neurotoxinas, existe grande diversidade de peptídeos ainda não caracterizados. Muitos não puderam ser encontrados em banco de dados, uma vez que estas informações são raras, necessitando desta forma de um sequenciamento *de novo*. Apesar de localizados, a função da maioria desses peptídeos é desconhecida. Dentre as moléculas descritas neste peptidoma estão componentes considerados como “não tóxicos”, denominados como fragmentos peptídicos tipo PAPE, por possuírem sequência em “*tandem*” de resíduos de prolina (P), ácido glutâmico (E) e alanina (A). Ainda, este estudo identificou outros componentes já descritos, como as hipotensinas e peptídeos “tipo hipotensina” (Rates et al., 2008).

As hipotensinas de *Tityus serrulatus* (TsHpt) são consideradas como Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPP) por promoverem uma forte hipotensão quando testadas em ratos. O mecanismo de redução de pressão pela família das hipotensinas foi analisado por Verano-Braga et al. (2008) e foi caracterizado por potencializar a ação da bradicinina e por, provavelmente, estar envolvido com o processo de liberação de NO em vasos sanguíneos. Foi ainda constatado que a atividade da ECA (Enzima Conversora de Angiotensina) na presença de TsHpt-I (AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA) não sofria alterações, excluindo uma possível similaridade de ação entre essas moléculas e o Captopril, conhecido inibidor da ECA. Em 2010, Verano-Braga et al. realizaram um estudo com fragmentos de TsHpt-I (KETNAKPPA e KPP), produzidos por ação de carboxipeptidase, concluindo que a porção C-terminal das hipotensinas é a responsável por potencializar a atividade da bradicinina e promover liberação de NO. Os autores destacam a similaridade da porção KPP com os BPPs devido a presença da dupla de prolinas, porém devido a ausência de inibição da ECA, acreditam que esta fração pode estar agindo sobre outra via, ligada ao óxido nítrico.

Em relação aos componentes enzimáticos, dados recentes da literatura demonstraram a presença de uma metalopeptidase presente no veneno do *T. serrulatus*, denominada como antarease. Nestes estudos, os autores mostraram que a protease é capaz clivar SNAREs (proteínas importantes no transporte de vesículas) em casos de pancreatite, as chamadas VAMP (no caso, VAMP2 e VAMP8). Apesar da publicação

sobre esta protease, o foco maior deste grupo de estudo foi desvendar ações da VAMP e outras funções da metaloproteinase denominada de antarease ainda não são conhecidas, pois provavelmente esta protease deve ter participação muito mais importante no envenenamento (Fletcher et al., 2010). A atividade de serinopeptidases também foi descrita por Almeida et al. (2002), em *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, porém até o momento esta(s) peptidase(s) não foi (ram) purificada(s). Ainda, há descrição de atividade hialuronidásica, sendo um fator que aumenta a eficácia de outras toxinas, por facilitar suas difusões, não causando toxicidade própria (Cologna et al., 2009).

Recentemente, em 2012, um estudo transcriptômico identificou o perfil de moléculas transcritas no veneno de *Tityus serrulatus*, como mostra a Figura 03. Como resultado, foram encontradas muitas moléculas ainda não descritas, em especial, pode-se destacar a presença da antarease e uma nova metalopeptidase ainda não caracterizada (UniProtKB/Swiss-Prot: P85842.1), e suas possíveis isoformas, compondo cerca de 6% do total de moléculas expressadas no veneno. É importante ressaltar que não foram detectadas outras classes de enzimas proteolíticas. Curiosamente, os componentes mais abundantes expressos no veneno são os fragmentos PAPE (23%), superando neurotoxinas de canais de sódio (16%) e potássio (22%). Foram também encontrados peptídeos aniônicos, anti microbiais (AMPs), a anatoxina TsNTxP, hipotensinas e peptídeos ainda não caracterizados classificados na figura como “outros” (Alvarenga et al., 2012).

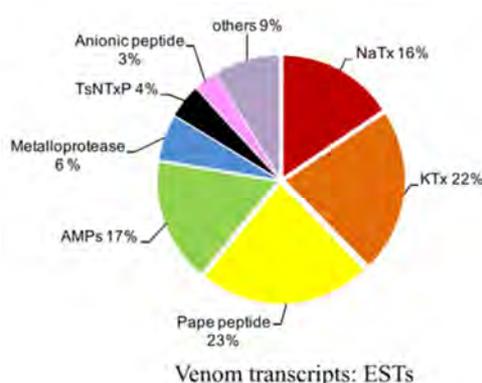


Figura 03. Transcriptoma do veneno de *Tityus serrulatus* mostrando a abundância das principais moléculas transcritas (Figura adaptada, retirada de Alvarenga et al., 2012).

A dificuldade de descrição de moléculas não neurotóxicas no veneno de *Tityus serrulatus* se dá principalmente pelo foco no estudo de neurotoxinas que afetam canais iônicos e pela particularidade do veneno de artrópodes, que diferentemente de serpentes, são constituídos principalmente de peptídeos (Pimenta e De Lima, 2005). Esses peptídeos muitas vezes são descartados nos estudos proteômicos pelo seu tamanho reduzido ou também por ser muito difícil sua detecção. Estima-se que apenas 0,01% dos peptídeos de venenos animais tenham sido identificados (Quinton et al., 2011), contudo, dado ao atual interesse biotecnológico no uso de peptídeos e ao avanço nas técnicas de proteômicas, o cenário tem mudado. A estabilidade e seletividade de compostos peptídicos têm sido exploradas para a busca de moléculas com potencial terapêutico (Lewis e Garcia, 2003). Um exemplo clássico é do Captopril, pois este medicamento anti-hipertensivo foi desenhado a partir de um BPP (<EKWAP; onde <E é piroglutamil) encontrado no veneno de *Bothrops jararaca*, onde o mecanismo de ação é via inibição de ECA e potencialização de bradicinina. Neste contexto, novas tecnologias têm sido utilizadas para auxiliar neste processo de identificação e seleção, como a cromatografia de fase reversa, a espectrometria de massas e a síntese de peptídeos (Pimenta e De Lima, 2005).

1.4 – As enzimas proteolíticas

A catálise de reações químicas é fundamental para a vida de um organismo, pois o catalisador permite que estas reações ocorram de maneira mais rápida e eficiente. As enzimas são os catalisadores biológicos mais eficientes por promoverem uma aceleração eficiente entre reações (diminuem a energia de ativação para que uma reação ocorra), por regularem de maneira harmoniosa vias metabólicas e por possuírem alta especificidade por seus substratos (Nelson e Cox, 2002).

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas são primeiramente classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam. Atualmente, existem seis grandes classes: as oxidoreduases, as transferases, as lipases, as liases, as isomerases, as ligases e as hidrolases. Em destaque, as hidrolases são enzimas que hidrolisam ligações covalentes, dentre elas, ligações peptídicas, caracterizando as enzimas proteolíticas.

As enzimas proteolíticas participam do processamento e da organização molecular de cadeias peptídicas, de precursores de hormônios proteicos, bem como receptores e fatores de crescimento. Podem ainda mediar cascatas proteolíticas importantes, envolvendo-se em processos como coagulação sanguínea, a fibrinólise e sistema complemento (Neurath, 1999). Além de serem importantes em reações fisiológicas, estão presentes em situações patológicas. Neste contexto, os inibidores enzimáticos tem sido foco de estudo.

Classificação das peptidases

Em meio a uma variedade de funções e estruturas, as enzimas proteolíticas foram classificadas por agrupamentos. Com base no tipo de reação catalisada e nas estruturas primárias e terciárias, as peptidases podem ser divididas em classes, famílias e clãs. Assim, as peptidases são subdivididas em oito classes catalíticas, com base no mecanismo catalítico: aspartil-peptidase (classe A, peptidases dependentes de dois resíduos de ácido aspártico), cisteínopeptidase (classe C, apresentam um grupo tiol de um resíduo de cisteína envolvido no mecanismo de catálise), metalopeptidases (classe M, dependentes de metal, geralmente o zinco), serinopeptidase (classe S, dependentes de um resíduo de serina), treonina peptidases (classe T, dependentes de um resíduo de treonina), glutamil peptidases (classe G, dependentes de um resíduo de ácido glutâmico), asparagina peptidases (classe N, dependentes de um resíduo de asparagina) e a classe das peptidases com mecanismo catalítico ainda indefinido, denominada como classe U (Rawlings et al., 2012). Utiliza-se o termo “família” quando um grupo de peptidases apresenta semelhanças em certas sequências de aminoácidos na região do sítio ativo. Quando as peptidases são derivadas de um mesmo ancestral e diferenciadas com ao longo da evolução, denomina-se que estas enzimas pertencem ao mesmo clã (Rawlings et al., 2012).

De acordo com o tipo de catálise, duas subfamílias de peptidases são conhecidas: as exopeptidases que hidrolisam as ligações peptídicas nas porções N- ou C-terminal do substrato e as endopeptidases que hidrolisam ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica. As exopeptidases que atuam na porção livre N-terminal liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases) ou um dipeptídeo ou um tripeptídeo (dipeptidil-peptidase e tripeptidil-peptidase). Aqueles que agem na porção livre C-terminal liberam um único resíduo (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-

dipeptidase). Mais afundo, ainda são conhecidas duas outras categorias de peptidases: as oligopeptidases, endopeptidases que hidrolisam substratos de pequeno tamanho e as ômega peptidases, dipeptidases específicas que removem os resíduos modificados das porções N- ou C- terminais do substrato (Rawlings et al., 2012).

Peptidases em venenos animais

Venenos de animais são complexas misturas de moléculas bioativas, sendo frequentemente encontradas em sua composição, dentre outras moléculas, as peptidases. Um estudo comparativo da atividade enzimática de várias espécies animais, incluindo serpentes, anfíbios, lagartos e artrópodes (aranhas, escorpiões, formigas e abelhas) detectou atividade peptidásica no veneno de todos os seres testados, contudo com diferentes intensidades (Tan e Ponnudurai, 1992). Para os venenos de escorpiões, baixas atividades peptidásicas foram identificadas, com exceção de duas espécies (*L.q. hebraeus* e *H. spinnifer*). Os venenos de escorpião não exibiram valores significativos de atividades hemorrágicas, pro coagulante e anticoagulante, padrão também analisado neste mesmo trabalho (Tan e Ponnudurai, 1992).

Poucos estudos buscam peptidases em venenos de escorpiões, seja pela baixa atividade peptidásica, pela ausência de efeitos mais comuns reconhecidamente causados por venenos com maiores composições de proteases ou até mesmo pela dificuldade de obtenção de quantidades ideais desses venenos. Apesar destas barreiras, recentemente novos estudos têm abordado a presença de peptidases nesses quelicerados, questionando se sua presença no veneno seria somente para a produção do peptidoma ou se haveria alguma função durante o envenenamento.

Além do transcriptoma de *Tityus serrulatus*, o qual apresenta somente enzimas proteolíticas do tipo metalopeptidases em seu veneno (Alvarenga et al., 2012), como já descrito nesta introdução, existem estudos transcriptômicos para outras espécies de escorpiões que revelam a existência de peptidases. Para *Tityus stigmurus*, por exemplo, foram somente encontradas no transcriptoma seis metalopeptidases, sendo quatro delas similares a antarease, não sendo detectadas serinopeptidases (Almeida et al., 2012). As metalopeptidases também foram observadas em meio às sequências transcritas do escorpião *Hottentotta judaicus*, porém em maior abundância em relação ao outros escorpiões, representando em torno de 16% de todas as sequências analisadas

(Morgenstern et al., 2011). Assim, pode-se dizer que as metalopeptidases são principais representantes proteolíticos no veneno de escorpiões, sendo detectadas tanto em transcriptômas quanto em *screenings* de atividade peptidásica. Contudo, apesar das análises transcriptômicas serem excelentes parâmetros, são necessários estudos de purificação destas enzimas para comprovar a existência no veneno.

As presenças das peptidases em venenos podem ter função de produção de moléculas. Segundo Tashima e colaboradores (2012), a coleta de veneno de três serpentes do gênero *Bothrops* acompanhada por coquetel de inibidores proteolíticos altera o perfil de peptídeos em análise de espectrometria de massas, incluindo BPPs, importantes para os efeitos do envenenamento. Com isso, peptidases também tem função de manter a complexidade do veneno, como provavelmente ocorre com venenos de artrópodes, sabendo que são compostos por peptídeos e pequenas moléculas prioritariamente.

As metalopeptidases

As metalopeptidases possuem mecanismo catalítico dependente de um metal, geralmente o zinco. De maneira geral, possuem uma sequência de consenso H-E-X-X-H em sua estrutura primária integrada à alça do sítio ativo, sendo que o X representa qualquer aminoácido (Bode et al., 1993). Nas metalopeptidases um cátion metal bivalente, geralmente zinco, mas algumas vezes cobalto ou manganês, ativa a molécula de água, tornando-se reativa e possibilitando a atividade enzimática.

As metalopeptidases estão divididas em dois grandes grupos dependendo do número de íons requerido para a catálise. Em muitas metalopeptidases, somente um íon zinco é requerido, mas em algumas famílias há dois íons metais que atuam cataliticamente. Todas as metalopeptidases em que o cobalto ou o manganês são essenciais são necessários dois íons metais, mas há também famílias de metalopeptidases zinco dependentes onde dois íons zinco são importantes.

Os resíduos ligantes de metais conhecidos são os resíduos His, Glu, Asp ou Lys. Além destes, pelo menos outro resíduo é necessário para catálise, que é geralmente um resíduo Glu. As metalopeptidases estão envolvidas nas mais variadas atividades como: no desenvolvimento embrionário, na formação óssea, reprodução, artrite e câncer. Desta família fazem parte neurotoxinas, como as toxinas tetânica e botulínica, e algumas

toxinas de venenos animais. As diversas famílias foram agrupadas em 15 clãs: MA, MB, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MN, MO, MP e MT (Rawlings et al., 2012).

As metalopeptidases de venenos são responsáveis principalmente pela atividade hemorrágica no local da picada, como observadas nas famílias *Viperidae* e *Crotalidae* de serpentes (Kuniyoshi et al., 2012). O potencial hemorrágico é associado a capacidade destas enzimas de degradar componentes da membrana basal, tais como laminina, colágeno tipo IV e nidogênio, o que causa uma lenta ruptura de capilares sanguíneos. Além disso, a presença de um domínio desintegrina rico em cisteína na estrutura das metalopeptidases é um fator que aumenta a capacidade hemorrágica.

1.5 - Oligopeptidases

Neste trabalho, oligopeptidases recombinantes foram utilizadas como estratégia de se obter pequenos peptídeos do VTs não relacionados a toxinas de canal, tendo em vista que são enzimas que interagem apenas com pequenas moléculas. Por este motivo, essas enzimas serão introduzidas a seguir.

O subclã MA(E) abrange as metaloendopeptidases, sendo que as oligopeptidases pertencem a família M3. Este grupo, em particular, é caracterizado por não clivar proteínas e sim apenas pequenos peptídeos (ou oligopeptídeos), pois o sítio catalítico está localizado em um canal profundo, impedindo o acesso de moléculas maiores. As oligopeptidases foram primeiramente descritas como encefalinases, devido ao fato de estarem associadas ao metabolismo de neuropeptídios, dentre elas a thimet oligopeptidase e a neurolisina (Acker et al., 1987).

A thimet oligopeptidase (EP24.15) é uma metaloendopeptidase presente em abundância em mamíferos, sendo encontrada em grandes quantidades em testículos, hipófise e cérebro, e em menores proporções em pulmões, fígado, rins e baço (Shirampton et al., 2001). Por ser uma oligopeptidase, somente substratos de 5-17 aminoácidos podem acessar o sítio ativo, que se encontra resguardado por conta de dois domínios compostos em α -hélice (Ray et al., 2004).

A presença da EP24.15 é predominante em regiões ricas em neuropeptídios e, por isto, tem sido atrelada principalmente ao metabolismo destes, como dinorfina e

neurotensina, além de angiotensina I e bradicinina (Rioli et al., 1998). Ainda, em neurônios retiniais de pombos, é encontrada localizada com a leu-encefalina. Por conta destas atividades e de sua localização em diferentes tecidos, acredita-se que haja participação desta enzima em processos fisiológicos como percepção da dor, homeostasia cardiovascular e renal e reprodução (Shirampton et al., 2001). Além disso, foi evidenciado que esta oligopeptidase possui papel no reconhecimento de peptídeos que participam da apresentação por moléculas de MHC de classe I, atuando no “*trimming*” dos epítomos, após sua liberação pelo proteossoma (Kessler et al., 2011). Kessler et al. observaram que a inibição da thimet oligopeptidase resulta em diminuição significativa de reconhecimento antigênico, pois a formação da região C-terminal do epítomo é dependente desta oligopeptidase, evidenciando, deste modo, sua função também em sistemas imunológicos.

A EP24.15 é considerada uma enzima de atuação intracelular por não apresentar peptídeo sinal e não estar localizada nas vias secretoras clássicas. Apesar disso, trabalhos atuais demonstram que esta oligopeptidase pode ser secretada por vias não convencionais mediadas por interação com a calmodulina e cálcio (Cunha et al., 2009; Russo et al., 2009). Segundo Russo et al. (2009), em células embrionárias renais (HEK293), a calmodulina ajuda na secreção de EP24.15 por direcionar esta enzima próxima a regiões específicas da membrana plasmática, facilitando sua secreção quando ocorre aumento da concentração de cálcio intracelular. Além disso, foi observado que a calmodulina e a EP24.15 estão colocalizadas, o que indica interação entre essas moléculas (Russo et al., 2009).

Assim como a EP24.15, a neurolisina (EP24.16) é uma neuropeptidase dependente de zinco que atua principalmente no controle de neurotransmissores e neuro-hormônios em mamíferos. Foi primeiramente isolada e purificada de membranas sinápticas de ratos por causar inativação da neurotensina no sistema nervoso central e periférico, clivando este substrato entre os resíduos Pro¹⁰-Tyr¹¹ (Barelli et al., 1987). Segundo Gome-Ruth (2008), além da neurotensina, a neurolisina tem como substrato preferencial a prolactina. Contudo, é considerada uma enzima inespecífica, pois pode reconhecer um número considerável de 15 sequências peptídicas para a clivagem.

Shirampton et al., (2002) mostram grandes similaridades entre a EP24.15 e a EP24.16 em relação a propriedades bioquímicas e fisiológicas destas duas enzimas. Ambas podem ser encontradas solubilizadas ou associadas à membranas, porém a forma

considerada dominante é a solúvel. Fontenele-Neto et al. (2001) demonstraram que ambas oligopeptidases estão expressas em neurônios por análise imunohistoquímica em cérebros de ratos, sugerindo que a EP24.15 e EP24.16 atuem de maneira distinta e, ao mesmo tempo complementar, no sistema SNC.

Estas duas oligopeptidases são capazes de clivar neuropeptídios como neurolisina, angiotensina I e dinorfina 1-13. Todavia, a neurotensina é um determinante importante para diferenciar estas duas enzimas, pois no passo que a EP24.15 cliva entre resíduos Arg-Arg, a neurolisina atua entre os resíduos Pro-Tyr (Tabela 02). Além disso, a clonagem e expressão de neurolisina revelou 60,2% de homologia com a thimet oligopeptidase (Dauch et al., 1995), o que pode ter impulsionado maior interesse científico e o manejo experimental com estas peptidases.

Tabela 02. Porcentagem e sítios de clivagens das enzimas recombinantes EP. 24.15 e EP. 24.16.

		Porcentagem de Clivagem	
<i>Peptídeos</i>	<i>Sítio de Clivagem</i>	<i>EP. 24.15</i>	<i>EP. 24.16</i>
Bradicinina	RPPGF ↓↓ FSPFR	100	108
Neurotensina	ELYENKPR ↓ RP ↓ YIL	80	95
Angiotensina -I	VYIHP ↓↓ FFHL	80	95
Dinorfina _[1-8]	YGGFL ↓↓ RRI	110	60

Cada seta indica a clivagem feita por cada enzima, onde a seta azul representa a 24.15, a seta preta 24.16c. (Adaptado de Rioli et al., 1998).

1.6 - Importância do trabalho

Os venenos animais são formados por uma mistura de toxinas de natureza polipeptídica com uma grande diversidade de ações biológicas. Essas moléculas evoluíram de componentes constitutivos desses animais que passaram por um processo de evolução acelerada e foram selecionadas de acordo com as necessidades de sobrevivência de cada espécie. Alguns trabalhos mostram que essas moléculas encontradas e caracterizadas primeiramente em venenos animais, apresentam fortes similaridades estruturais e funcionais com as moléculas constitutivas das demais espécies animais, incluindo os mamíferos.

O escorpião amarelo é um dos principais causadores de envenenamento por animais no país. Diferentemente das serpentes, pouco se sabe sobre componentes

proteolíticos e peptídicos nos venenos destes artrópodes, sendo que o objeto de estudo deste veneno resume-se basicamente a neurotoxinas que agem em canais iônicos, além de poucas informações sobre outros peptídeos biologicamente ativos e, mais recentemente, a metalopeptidase denominada antarease (Alvarenga et al., 2012; Rates et al., 2008; Fletcher et al., 2010).

Em adendo, o fato das oligopeptidases serem seletivas para a interação com moléculas de acordo com número de resíduos de aminoácidos que as compõem foi considerado para o uso destas enzimas no presente trabalho, pois deste modo serão estudados apenas peptídeos de tamanho restrito (até 20 aminoácidos). Segundo Pimenta e De Lima (2005), os oligopeptídeos foram negligenciados pela comunidade científica, seja pela difícil visualização, seja pelo baixo efeito no envenenamento em comparação com moléculas maiores. Contudo, metodologias atuais vêm revertendo este cenário, abrindo o campo de estudo destas moléculas. Assim, o presente trabalho atuou também na obtenção de peptídeos, selecionados através da interação com as oligopeptidases, sendo um diferente método de obtenção desses pequenos peptídeos.

Outro ponto a ser considerado é que trabalhos atuais indicam que toxinas que afetam canais iônicos podem ter outra funcionalidade. A clorotoxina (CTX), neurotoxina atuante em canais de cloro encontrada no escorpião *Leiurus quinquestriatus*, está atualmente sendo utilizada na identificação de células de glioma (tumor cerebral humano) através da inibição da MMP-2, metalopeptidase secretada em excesso por células tumorais (Deshane et al. 2002, Wu et al. 2010). Os ensaios estão em fase clínica II. Outro exemplo é a neurotoxina BMK Angi de *Buthus martensi* (Karch), que tem sido relacionada com analgesia (Cao, 2004). Com isso, a grande diversidade de neurotoxinas descritas no veneno (Taxas et al., 2008) pode ser uma oportunidade para descoberta de novas propriedades para moléculas já conhecidas.

A atividade peptidásica de *T. serrulatus* também foi alvo de investigação deste trabalho. Como já citado, Fletcher et al. (2010) purificaram a primeira metalopeptidase deste veneno, todavia, é necessário um estudo para se compreender como esta atividade atua no envenenamento, provavelmente clivando substratos de importância fisiológica, contribuindo para o quadro clínico. Em adição, é necessário verificar se apenas a antarease é responsável pela atividade peptidásica do veneno ou se existem mais compostos ainda não encontrados.

Em suma, visto que os venenos animais têm se revelado uma rica fonte de moléculas biologicamente ativas, existe a possibilidade do estudo de peptídeos presentes no veneno, selecionados por enzimas que possuem especificidade quanto ao tamanho do substrato, as oligopeptidases. A falta de informações sobre componentes não neurotóxicos de baixa massa presentes no veneno do *T. serrulatus* e o estudo da sua atividade peptidásica foram fatores que levaram à elaboração deste trabalho.

2. Objetivos

- Gerais

Com o pressuposto de existirem poucas informações sobre os componentes de baixa massa molecular não classificados como neurotoxinas e das proteases presentes no veneno do *T. serrulatus*, tivemos como objetivos gerais:

- Estudar e caracterizar a atividade peptidásica do veneno do escorpião amarelo e determinar, *in vitro*, substratos biológicos que possam estar relacionados no processo de envenenamento.

-Buscar e analisar novos peptídeos do veneno, selecionados como inibidores de peptidases humanas, visto que os venenos animais têm se revelado uma rica fonte de moléculas biologicamente ativas;

- Específicos

No decorrer do projeto, pontos específicos foram analisados, tais como:

-Fracionamento do veneno bruto do *T. serrulatus* separando os componentes proteolíticos dos peptídicos;

-Caracterização bioquímica inicial da(s) protease(s) do veneno de *Tityus serrulatus* através de curva de pH, temperatura e interferência de cátions mono e bivalentes,

-Buscar possíveis substratos biologicamente ativos de mamíferos que possam estar sendo alvo no envenenamento para as peptidases do VTs;

-Iniciar o processo de purificação da(s) protease(s) para a verificação da identidade única da atividade metalopeptidásica, referente à antarease, ou se mais de uma molécula participa deste processo;

-Estudo e purificação dos componentes de baixa massa molecular (<10kDa) do veneno do escorpião amarelo por cromatografia de fase reversa (HPLC);

-Análise do poder inibitório das frações obtidas na etapa de HPLC utilizando substrato fluorescente e oligopeptidases recombinantes;

-Verificação do perfil cromatográfico das frações que demonstraram conter peptídeos com potencial “inibitório”

-Purificação à homogeneidade dos componentes das mesmas em HPLC;

-Determinação a estrutura primária do(s) peptídeo(s) de interesse por espectrometria de massas e realização da síntese dos peptídeos;

-Determinação dos mecanismos e constante de inibição dos peptídeos sintetizados sobre as oligopeptidases.

3. Metodologia

Parte I: Estudo de componentes proteolíticos

3.1 – Caracterizações bioquímicas de peptidases do veneno de *Tityus serrulatus*

3.1.1 - Detecção de atividade proteolítica no veneno de *Tityus serrulatus*

Os ensaios de a atividade enzimática foram realizados em espectrofluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), ajustado para leitura de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura manteve-se constante a 37° C e as leituras foram realizadas sob agitação, sendo feita 1 leitura/minuto durante 15 minutos. Esses parâmetros do aparelho foram mantidos em todo o trabalho, com exceção do experimento de variação de temperatura.

O veneno liofilizado de *Tityus serrulatus* (VTs) foi solubilizado em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 6,4. Além de evidenciar a existência de peptidases neste veneno, foi determinado o melhor substrato, padronizando os testes de atividades proteolíticas subsequentes. Para a busca do substrato, o VTs foi incubado, na concentração de 5 µg/poço, com diversas sequências FRET: Abz-GGFLRRV-EDDnp; Abz-KLRFSKW-EDDnp; Abz-LYENKPRRPYILQ-EDDnp; Abz-GLAAKKGAAQ-EDDnp; Abz-VGPRSFL-EDDnp; Abz-FASSA-EDDnp; Abz-FRSSR-EDDnp; 7-MCA-4-ac-PLGPDlys-(2,4-dinitrofenil). Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os resultados foram analisados em software Grafit 5.

A estimativa do ponto de clivagem do substrato fluorescente pelo VTs foi determinada pelo uso de FRETs com sequências análogas ao Abz-GGFLRRV-EDDnp, sendo analisada a atividade específica (UF/min/µg) para cada substrato. A biblioteca utilizada foi: Abz-GGFLRRV-EDDnp; Abz-AAFLRRV-EDDnp; Abz-FLRRV-EDDnp; Abz-GGFLR-EDDnp; Abz-KLRFSKQ-EDDnp; Abz-GGFLTSE-EDDnp, todos com concentração de 5 µg/poço.

3.1.2 - Determinação da classe enzimática

Para a determinação da classe enzimática da(s) peptidase(s) presente(s) no VTs foram utilizados os inibidores EDTA, inibidor de metalopeptidases, e PMSF, inibidor de serinopeptidases. Para esse experimento foram testados 5 µg de veneno total e 5 µM de Abz-GGFLRRV-EDDnp, sendo o volume final 100 µL completado com tampão

fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4. Para os inibidores EDTA e PMSF, as concentrações foram 50 mM e 1 mM, respectivamente. Os ensaios foram realizados em espectrofluorofotômetro,

3.1.3 - Determinação do pH ótimo (curva de pH)

Foram realizados testes de atividade proteolítica com alteração do pH do tampão de incubação, com o objetivo de encontrar o pH ideal para a atividade destas enzimas. A faixa de pH testada foi de 4,0 a 12,0. Foram preparados tampões específicos para cada faixa de pH: Para pH 4,0 a pH 5,0, citrato de sódio 50 mM; Para faixa entre pH 5,5 e pH 7,5, fosfato de sódio 50 mM; Para pH entre 8,0 e 12, Tris básico 50 mM. As concentrações de VTs e substrato FRET foram de 5 µg e 5 µM, respectivamente, com temperatura mantida a 37°C. Os ensaios foram realizados em espectrofluorímetro e analisados pelo software Grafit 5.

3.1.4 - Influência de cátions monovalentes e bivalentes

O estudo da influência dos cátions monovalentes (Li^+ , Na^+ , K^+) e bivalentes (Mg^{2+} , Cs^{2+} , Ca^{2+}) na atividade enzimática do veneno total foi determinada em espectrofluorímetro a partir da reação com o substrato fluorescente Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 µM) em tampão Tris 50mM, pH 8, à 37°C, com a adição de concentrações crescentes dos cátions na forma de cloreto (Controle, 5 mM, 10 mM, 20 mM e 50 mM) durante 15 minutos.

3.1.5 -Determinação da temperatura ótima

A influência da temperatura na velocidade de hidrólise pelas peptidases do veneno de *T. serrulatus* também foi analisada em ensaios de fluorimetria. Foram testadas temperaturas entre 24°C e 42°C, em intervalos de 5°C, utilizando tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0, com base nos resultados dos experimentos anteriores. O VTs foi previamente incubado durante 15 minutos no tampão dentro do aparelho climatizado com cada temperatura específica e, após esse período, o substrato foi adicionado.

3.1.6 - Teste de atividade peptidásica sobre peptídeos biologicamente ativos

Os peptídeos biologicamente ativos angiotensina I (65 μ M, Sigma), bradicinina (50 μ M, Sigma), neurotensina (12 μ M, Sigma) e dinorfina 1-13 (31 μ M, Sigma) foram incubados com o veneno total (5 μ g) em banho maria a 37°C durante 4 horas em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8. Após este período, a reação foi parada com adição de 10% de tampão B. A análise da clivagem foi realizada em HPLC.

O sistema de HPLC utilizado é composto por um sistema binário onde existem duas bombas que trabalham com solventes diferentes (Solvente A e B, modelos LC 20AD); um degaseificador (modelo DGU 20A3); um detector de UV (modelo SPD 20A) e um detector de fluorescência (modelo RF 10AXL). Também fazem parte do equipamento um injetor automático (SIL 20AC HT) e um módulo controlador, além de uma coluna C-4 (Shodex) e uma C-18 (Shim-Pack). Trata-se de um sistema Shimadzu Prominence.

Para este ensaio, foi utilizada coluna C-18 Nucleosil (15,0 x 4,0 mm), modelo Shim-Pack, da marca Shimadzu. O gradiente inicial utilizado foi de 10-60% de solvente B em 40 min (solvente A: H₂O/TFA 0,01% e solvente B: ACN/solvente A 9:1) sob fluxo de 1,0 mL/min. Assim, a velocidade de troca de B/min foi de 1,2%B/min

Os picos de hidrólise da dinorfina 1-13 (31 mM) foram coletados manualmente, secos em sistema de Speed-vac e analisados pela Central Analítica IQ-USP para a determinação de seus pontos de hidrólise.

3.1.7 - Purificação parcial das metalopeptidases presentes no VTs: obtenção da fração de alta massa molecular (> 30 kDa)

A separação foi realizada utilizando o método de filtração por membranas de corte molecular (Ultrafree, Millipore) de 30 kDa e 10 kDa. Inicialmente, foi utilizada membrana de 30 kDa com 7,3 mg de veneno dissolvido em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20mM, pH 6,4, sendo centrifugado a 4°C, 1200 xg, por 15 minutos. O material retido na membrana foi coletado e denominado como Fração G, contendo moléculas superiores a 30 kDa. O material filtrado foi submetido a nova separação com membrana de corte molecular de 10 kDa. Os parâmetros da centrifuga foram 5.000 xg a 4°C durante 5 minutos. O que ficou retido da membrana foi coletado

(M, fração entre 10-30 kDa), assim como o material filtrado (P, <10 kDa), que foi utilizado para a busca de novos peptídeos com poder inibitório sobre a EP24.15 e EP24.16. A estimativa da concentração proteica das amostras foi realizada pelo método de Smith (1985) utilizando o Kit —BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, EUA) e BSA (Calbiochem, EUA) foi usada como padrão de referência. A leitura da placa foi realizada em leitor de placas de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Finlândia) e a absorbância foi determinada utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Após a dosagem, as frações foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12,5%, como descrito por Laemmli (1970). Após isso, a atividade específica das frações sob substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 µM) foi determinada em espectrofluorímetro a fim de selecionar a fração com maior atividade proteolítica.

3.1.8 – Fracionamento da fração de alta massa molecular (>30kDa) por HPLC fase reversa

A fração G (>30kDa) foi submetida à análise em HPLC, descrito anteriormente, utilizando coluna de fase-reversa C-4 (Shodex) sob fluxo de 1 mL/min e gradiente de 1,25%B/min. As subfrações obtidas foram coletadas e imediatamente liofilizadas, sendo ressuspensas em Tampão Tris básico 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0.

Após a dosagem proteica das subfrações, como citado anteriormente, as mesmas foram submetidas a seguir a ensaio de atividade proteolítica com o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 µM) utilizando 5 µg de amostra. As frações com atividade peptidásica positiva foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5% a fim de observar o perfil eletroforético.

3.1.9 - Ensaio de atividade peptidásicas sobre a dinorfina 1-13

Para o teste de atividade sobre substrato biológico em HPLC, as frações G02 e G10 (resultantes do fracionamento descrito acima, item 3.1.8) foram incubadas (5 µg) com dinorfina 1-13 (31 µM) durante 5 horas em tampão apropriado. Em paralelo, foram preparados incubados com o veneno total (5 µg, fração G) e controle negativo (somente dinorfina 1-13 e tampão) durante 4 horas. A hidrólise da dinorfina 1-13 foi acompanhada pela técnica de HPLC, já descrita anteriormente no item 3.1.6.

Parte II: Estudo de componentes peptídicos

3.2 - Busca de peptídeos do veneno de *Tityus serrulatus* selecionados por modular a atividade enzimática de oligopeptidases recombinantes.

Para os ensaios de atividade inibitória foram utilizadas as oligopeptidases recombinantes neurolisina (EP24.16) e thimet oligopeptidase (EP24.15), fornecidas pela Dra. Vanessa Rioli do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan. O potencial de inibição da fração de baixa massa molecular (P, < 10 kDa) foi verificado por meio de ensaios de fluorescência utilizando o substrato QFS, 7-MCA-4-ac-PLGPDlys-(2,4-dinitrophenyl), 10 μ M (Berti et al., 2009).

Em placa branca de 96 poços, foram adicionados 7,5 ng/mL de EP24.15, QFS a 10 μ M em 96 μ L de tampão fosfato 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4, contendo 1% de mercaptoetanol a 37°C. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter), como descrito no item 3.1.1. As mesmas condições descritas foram adotadas para EP 24.16, com exceção do tampão, que não continha mercaptoetanol. No caso da enzima conversora de angiotensina (ECA), utilizou-se ECA purificada a partir de pulmão de coelho (0,05 ng, Sigma-Aldrich) e substrato Abz-FRK((2,4-dinitrophenol)P-OH), $K_m = 4 \mu$ M (Araujo et al., 1999) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 60 mM, $ZnCl_2$ 10 μ M, pH 7,0. O substrato da ECA foi fornecido pela Dra. Adriana Carmona do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Os experimentos foram sempre realizados em duplicatas.

3.2.1 - Purificação de componentes peptídicos por cromatografia em fase reversa

Para a purificação de componentes peptídicos, a fração P foi submetida a cromatografia em HPLC de fase-reversa utilizando coluna C-18 (Shim-pack). O gradiente utilizado foi de 10-60% de solvente B em 40 min (1,2%B/min) sob fluxo de 1,0 mL/min e detector ajustado para 214 nm, sendo solvente A H₂O/TFA (Sigma) 0.01% e solvente B, Acetonitrila (Carlo Erba)/ solvente A (9:1). Os picos foram coletados manualmente, secos em speed vac e ressuspensos em 50 μ L de H₂O milli-Q.

Após avaliação de atividade inibitória, os picos foram re-cromatografados nas mesmas condições descritas acima, variando apenas o gradiente, de acordo com a particularidade de cada amostra e objetivando a obtenção do peptídeo puro.

3.2.2 - Espectrometria de massas e análise das sequências primárias dos peptídeos purificados.

A etapa de análise por espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química (Campinas – SP) com a colaboração do Dr. Fábio Gozzo e sua aluna, Mariana Fioramonte. As frações selecionadas com melhor atividade “inibitória” foram purificadas em RP-HPLC com diferentes gradientes repetidas vezes até o maior grau de pureza possível. Os peptídeos foram analisados em LC-MS/MS em uma Waters Synapt HDMS (Waters Co) acoplado a um nanoAcquity UPLC (Waters Co). Os peptídeos foram ressuspensos em água e cerca de 5 µL foi injetado em uma coluna de captura Symmetry C18 (180 µm× 20 mm, Waters). O sal foi removido das amostras por 15 min e os peptídeos capturados foram separados em modo de eluição por gradiente constituído de água/acetona contendo ácido fórmico 0,1% em uma coluna BEH 130 - C18 (100 µm x100 mm, Acquity Waters), como descrito anteriormente (Berti et al., 2009). A obtenção dos dados foi em modo dependente e os peptídeos selecionados foram desagregados por dissociação induzida por colisão (CID). As condições do ensaio incluem fluxo de 600 nL/min, voltagem capilar de 3.5 kV, temperatura do bloco a 100°C, e a voltagem do cone a 100V. O espectro de MS foi analisado manualmente com auxílio do software PepSeq (Micromass), para a fração P6-2, e no software Mascot (Matrix Science), para P13-1 e P13-2.

As sequências obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta Blast (ExPasy Proteomics Server). Para sequências não encontradas, a pesquisa por moléculas similares foi feita por busca na literatura.

3.2.3 - Síntese dos peptídeos com atividade inibitória

Os peptídeos foram sintetizados como descrito por Atherton and Sheppard (1989) no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada com a colaboração do Dr. Robson Lopes Melo, onde foi obtida pureza acima de 95%.

3.2.4 - Determinação de mecanismos e constantes de inibição

Com a constatação de atividade inibitória dos peptídeos, verificou-se a possibilidade destes serem substrato para as oligopeptidases. Para tal, foi realizado um ensaio de clivagem em fase reversa onde os peptídeos foram incubados com as oligopeptidases durante 4 horas e, em paralelo, amostras padrão dos peptídeos (sem enzima, controle negativo). Os perfis dos peptídeos foram analisados em coluna C-18 e comparados aos incubados com as oligopeptidases nas mesmas condições iniciais: 1,2%B/min sob fluxo de 1mL/min a 214nm. A bradicinina (25 µM) foi utilizada como controle positivo.

Para a determinação da constante de inibição (K_i) foram utilizadas quatro concentrações do substrato fluorescente 7-MCA-4-ac-PLGPdLys-(2,4-dinitrophenyl) (4 µM, 6 µM, 8 µM and 10 µM), e três concentrações diferentes dos peptídeos sintetizado, sendo controle (sem peptídeo), 25 µM e 50 µM. Para cada concentração de substrato foi feito um controle (ausência do peptídeo). As amostras foram analisadas em duplicatas e, durante todo o experimento, foi mantido o consumo de substrato inferior a 10% da concentração total. As reações ocorreram como descrito no item 3.1.1, sendo analisadas no software Grafit 5. O mecanismo de inibição foi determinado através de gráficos $1/V \times 1/[S]$ (plote de Lineweaver-Burk) e os valores das constantes de inibição (K_i) foram determinados através da relação da constante de inibição aparente ($K_{i(app)}$) (Nicklin e Barrett, 1984), descrito a seguir:

$$K_{i(app)} = \frac{[I]}{\left[\left(\frac{v_0}{v_i}\right) - 1\right]} \text{ e } K_i = \frac{K_i(app)}{\left[\frac{K_m}{[S]} + 1\right]} \text{ (inibição competitiva)}$$

Onde; $[I]$ = concentração de inibidor; (v_0/v_i) = velocidades de hidrólise na ausência e presença de inibidor, respectivamente e; $K_m/[S]$ = relação entre o K_m do substrato e sua concentração.

3.2.5 – Determinação da sequência correta de KEXLG presente no VTs

Tendo em vista a impossibilidade de determinação da sequência do peptídeo KEXLG (X=isoleucina ou leucina) por espectrometria de massas, foi realizada análise em RP-HPLC utilizando os peptídeos sintéticos KELLG, KEILG e fração P (<10kDa) com o objetivo de determinar a sequência real presente no veneno. Mantendo

parâmetros descritos no item 3.2.1, foi realizada uma comparação entre os perfis: 1) peptídeo sintético KELLG e 2) KEILG (ambos a 40 µM); 3) “mix” peptídico contendo 20 µL de fração P, 40 µM de KEILG e 40 µM de KELLG; 4) 20 µL de fração P.

O mecanismo de ação foi determinado pela realização de gráfico $V \times V/[S]$ (plote de Eadie–Hofstee), utilizando duas concentrações dos inibidores (25 µM e 50 µM) e seis de substrato QFS (4 µM, 6 µM, 8 µM, 10 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM).

Para o cálculo do K_i para inibição acompetitiva, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \text{ (inibição acompetitiva)}$$

4. Resultados

Parte I: Estudo de componentes proteolíticos

4.1 – Estudo da atividade proteolítica do veneno de *Tityus serrulatus*

4.1.1 - Evidência de atividade proteolítica e busca por substrato ideal

O veneno liofilizado do escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*) foi solubilizado em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20mM, pH 6,4. Para a busca do substrato, o VTs foi incubado, na concentração de 5 µg/poço, com substratos FRETs, selecionados por apresentarem sequências diferenciadas de aminoácidos. Além de evidenciar a existência de peptidases neste veneno, foi determinado o melhor substrato, padronizando os testes de atividade proteolítica subsequentes. A Figura 04 mostra o resultado da velocidade de hidrólise e atividade específica para diferentes substratos (todos em concentração de 5 µM/poço).

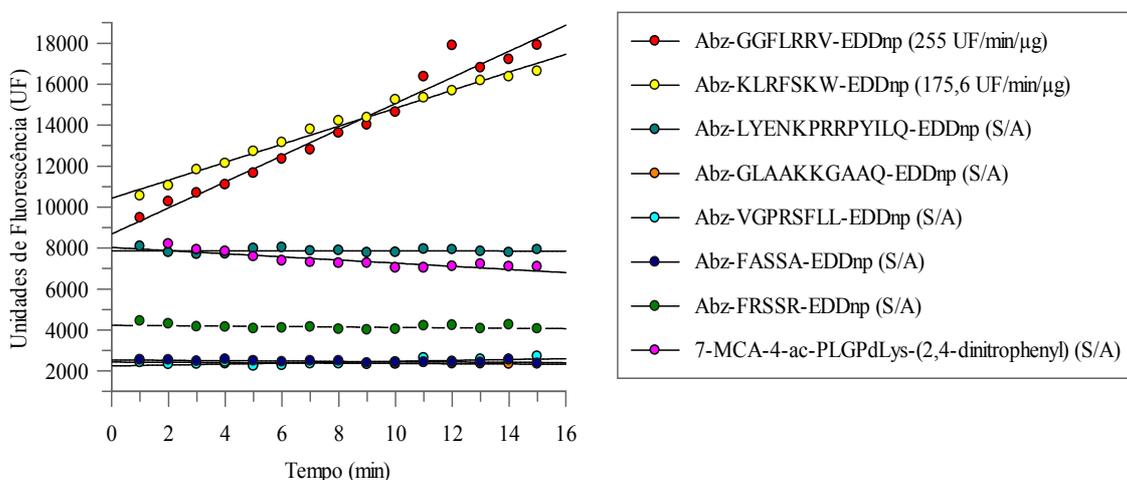


Figura 04 Ensaio de atividade proteolítica (Unidades de Fluorescência/minuto) para a determinação de substrato ideal para o estudo das enzimas do veneno de *Tityus serrulatus*. Somente os substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp e Abz-KLRFSKW-EDDnp foram hidrolisados. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5. S/A = sem atividade. Ensaio feito em triplicata com desvios inferiores a 10%.

Os substratos de fluorescência apagada Abz-GGFLRRV-EDDnp e Abz-KLRFSKW-EDDnp foram os únicos a serem hidrolisados pelo veneno total, sendo que

Abz-GGFLRRV-EDDnp apresentou maior atividade específica. Assim, foi selecionado como substrato ideal, sendo utilizado em todos os ensaios de atividade peptidásica. É importante observar que as sequências de aminoácidos dos substratos FRETs utilizados são bastante variados e, uma vez que apenas duas delas foram hidrolisadas, pode-se dizer que estamos em busca de protease(s) com especificidade restrita para a hidrólise de seus substratos.

A fim de se determinar o ponto de clivagem da(s) peptidase(s) sobre o substrato fluorescente Abz-GGFLRRV-EDDnp, foram utilizadas sequências análogas de FRETs. A tabela a seguir mostra o ponto de clivagem obtido por dedução devido a atividade específica da(s) peptidase(s) pelo substrato.

Tabela 03. Atividade específica e pontos de hidrólise estimados no estudo de ponto de clivagem para os substratos fluorescentes. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5.

Substratos (Abz-.....-EDDnp)											Atividade específica (UF/min/μg).	
#	P5	P4	P3	P2	P1	↓	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	
1		G	G	F	L	↓	R	R	V			299,6
2		A	A	F	L	↓	R	R	V			258
3		G	G	F	L	↓	R					117,5
4				F	L	↓	R	R	V			172,9
5				K	L	↓	R	F	S	K	Q	148,4
6		G	G	F	L	∅	T	S	E			S/A

Condições de hidrólise: Incubação do VTs (5μg) com o substrato fluorescente (5μM) em tampão fosfato de sódio 50mM, NaCl 20 mM, pH 7,4 a 37°C. Leituras realizadas em espectrofluorímetro em triplicatas, com desvio inferior a 10%.

Segundo a Tabela 03, a determinação do ponto de clivagem do substrato FRET foi estimada ser entre leucina e arginina, pois a única sequência que não foi hidrolisada pelo VTs, Abz-GGFLTSE-EDDnp, apresenta a ausência de um resíduo de arginina na

posição P'1. A atividade foi observada na ausência de Gly⁴-Gly³ (sequência 1), Phe² (sequência 5) e ausência de Arg²-Val³(sequência 3), corroborando com o ponto de clivagem estimado. Contudo, é bastante provável que outros pontos de clivagem existam, não sendo detectados por esta biblioteca utilizada, como a hidrólise após o resíduo de arginina na posição P'1 como os resultados obtidos com a dinorfina 1-13, descrito a seguir no item 4.1.6.

4.1.2- Determinação da classe proteolítica

Para a determinação da classe enzimática da(s) peptidase(s) presente(s) no veneno de *T. serrulatus* capazes de clivar o substrato fluorescente Abz-GGFLRRV-EDDnp, foram utilizados os inibidores EDTA, inibidor de metalopeptidases, e PMSF, inibidor de serinopeptidases. O resultado está demonstrado na figura a seguir.

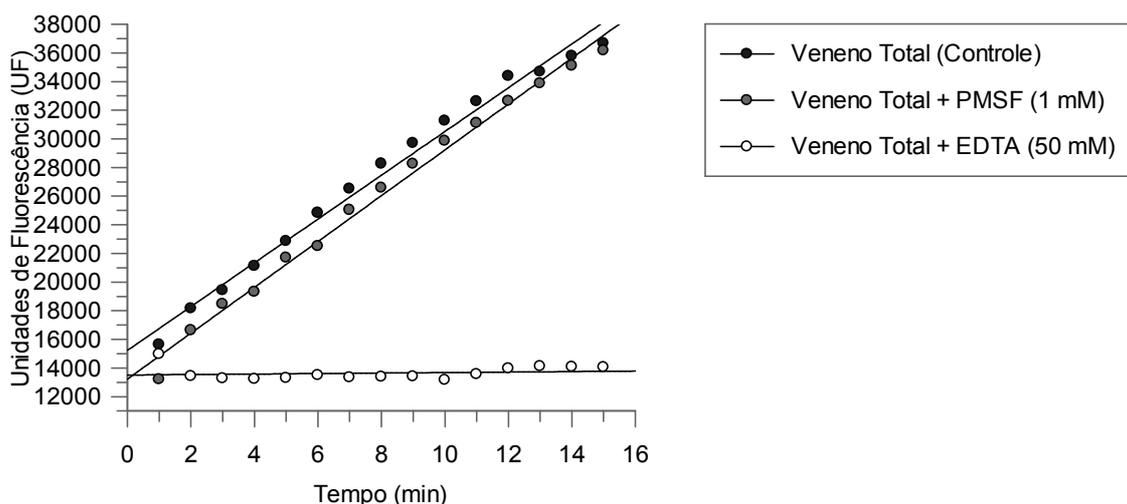


Figura 05. Teste de atividade utilizando os inibidores de metalopeptidases (EDTA, 50 mM) e serinopeptidases (PMSF, 1 mM). A inibição total por EDTA indica a atuação exclusiva de metalopeptidases no substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5. Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%.

A partir dos dados demonstrados acima (Figura 05), pode-se dizer que, pelo fato de a atividade observada no veneno total ter sido inibida após a incubação com o EDTA, são enzimas exclusivamente do tipo metalopeptidases.

Após a determinação do substrato ideal (Abz-GGFLRRV-EDDnp) e da classe enzimática, foram iniciadas as determinações de pH ótimo, influência de cátions e temperatura na hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp pelo VTs, a fim de se estabelecer parâmetros bioquímicos ótimos para a atividade peptidásica deste veneno.

4.1.3 - Determinação do pH ótimo (curva de pH)

Foram realizados testes de atividade proteolítica com alteração do pH do tampão de reação, com o objetivo de encontrar o pH de atividade ideal destas enzimas. A faixa de pH testada foi de 4,0 a 12,0 e os resultados podem ser observados na Figura 06. As concentrações de VTs e substrato foram de 5 μ g e 5 μ M, respectivamente.

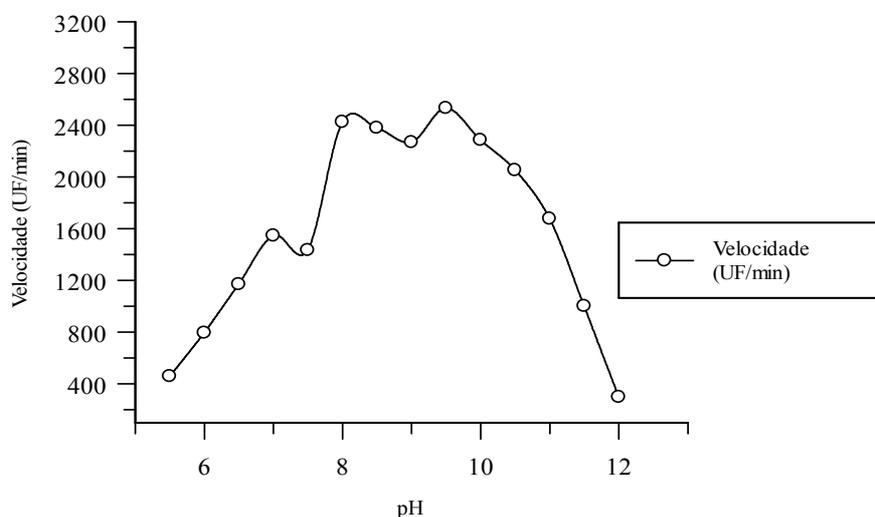


Figura 06. Gráfico de curva de pH da fração do veneno total de *Tityus serrulatus*, mostrando a diferença de velocidade (UF/min) de acordo com a mudança do pH. A partir disso, pode-se dizer que os pHs ótimos são 8 e 9,5. Para cada faixa de pH, foram feitos tampões específicos: citrato de sódio 50 mM (pH 4 – pH 5); Fosfato de sódio 50 mM (pH 5,5 – pH 7,5); Tris básico 50 mM (pH 8- pH 12). Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%.

É possível observar na Figura 06 que dois pHs favorecem a atividade peptidásica do VTs (pH 8,0 e 9,0). Apesar de se ter testado pH até 4,5 não foi possível identificar atividade abaixo de pH 5,5. Em contrapartida, as faixas de pH alcalinas (pH 8,0 a pH 10,0) contribuíram positivamente na atividade peptidásica, sendo que a partir do pH 9,5 a atividade é reduzida. A observação de dois pHs ótimos pode indicar a presença de mais de uma metalopeptidase no VTs.

Apesar da atividade em pH 7,4 ser menor do que na faixa de pH 8-9,5 ainda há velocidade significativamente boa neste valor e, portanto, acreditamos na capacidade enzimática em sistemas fisiológicos.

4.1.4- Estudo da influência de cátions monovalentes e bivalentes

O estudo da influência dos cátions monovalentes (Li^+ , Na^+ , K^+) e bivalentes (Mg^{2+} , Cs^{2+} , Ca^{2+}) na atividade enzimática do veneno total foi determinada em espectrofluorímetro a partir da reação com o substrato fluorescente Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 μM) em tampão Tris 50 mM, pH 8 à 37°C, com a adição de concentrações crescentes dos cátions na forma de cloreto (Controle, 5 mM, 10 mM, 20 mM e 50 mM) durante 15 minutos. Os resultados estão expressos na Figura 07.

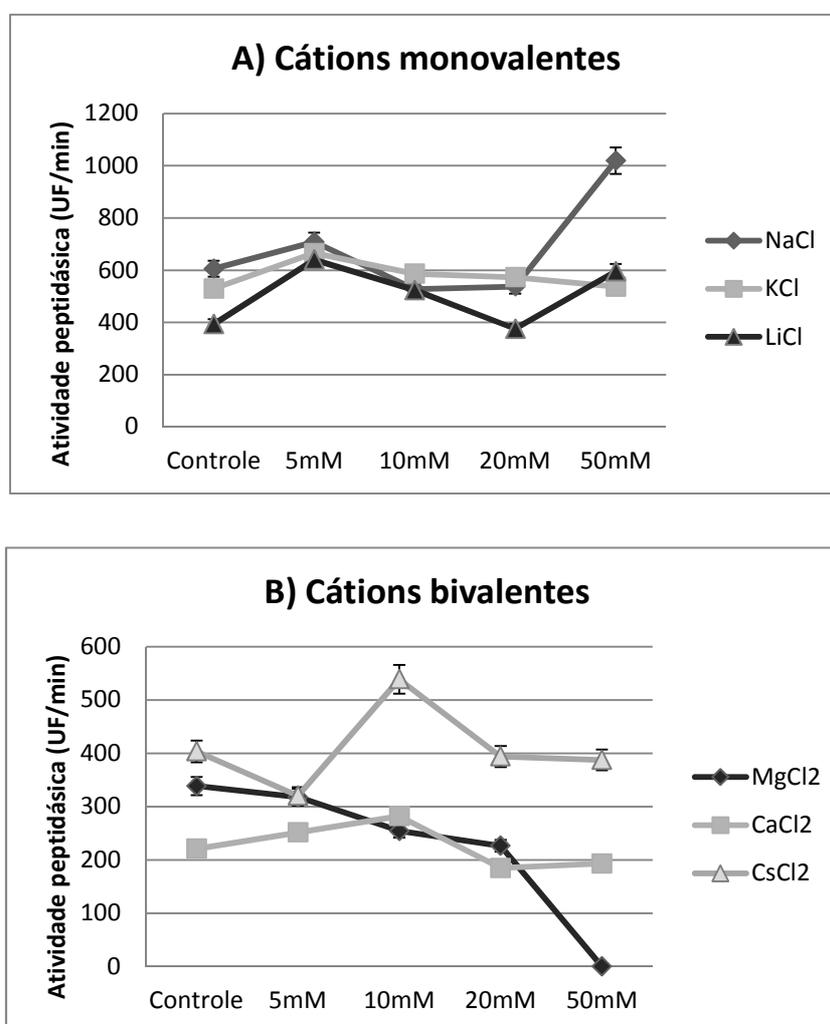


Figura 07. Influência dos cátions monovalentes (Painel A) e bivalentes (Painel B) sobre a atividade peptidásica do veneno de *Tityus serrulatus* em diferentes concentrações. O gráfico mostra a média de velocidade de hidrólise (UF/min), variando com a presença de cada cátion em concentrações de 0 mM

(controle) a 50 mM. Leitura realizada em fluorímetro (Victor – Perkin-Elmer 1420 Multilabel Counter) e resultados analisados em software Grafit 5. Ensaios feitos em triplicatas com desvios inferiores a 10%.

Segundo a Figura 07, painel B, pode-se dizer que, em geral, há pouca influência da presença de cátions bivalentes na atividade peptidásica de *T. serrulatus*. Contudo, $MgCl_2$ em 50 mM foi um bom modulador, inibindo totalmente a velocidade em diferentes testes realizados. Esta redução de atividade pode ser explicada por competição com o metal bivalente, provavelmente o zinco, componente do sítio ativo da metalopeptidase, interferindo em sua estrutura tridimensional, sendo dose resposta, reduzindo com maiores concentrações de magnésio. A atividade enzimática do veneno, na presença de cátions monovalentes (Na^+ , Li^+ e K^+), foi estimulada ou inalterada em altas concentrações (50 mM). Com isso, pode-se dizer que a presença de cátions como Na^+ nos tampões de amostra podem contribuir positivamente para a atividade enzimática. Por conta disto, optamos por adicionar cloreto de sódio (50 mM) em todas as soluções.

4.1.5 - Influência da temperatura na atividade enzimática

Além do pH e da presença de sais no tampão, verificou-se a influência da temperatura na velocidade de hidrólise das peptidases do veneno de *T. serrulatus*. Foram testadas temperaturas entre 24°C e 42°C, em intervalos de 5°C (Figura 08), em espectrofluorímetro como descrito anteriormente.

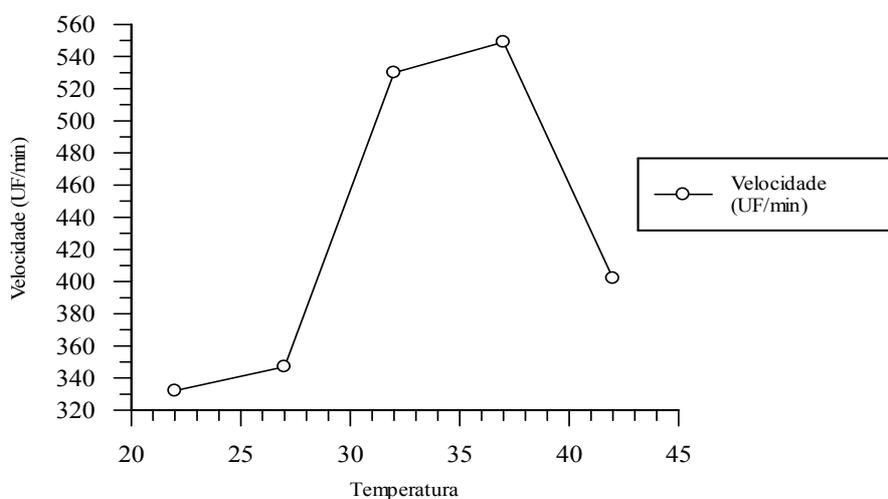


Figura 08. Gráfico representando os valores obtidos de velocidade média do VTs de acordo com a variação da temperatura. Os valores testados foram de 24°C até 42°C, em intervalos de 5°C. O veneno foi

pré-incubado com tampão no aparelho nas temperaturas descritas, sendo o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp adicionado em seguida. Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%.

O gráfico anterior mostra que a atividade peptidásica do veneno do escorpião amarelo é mais ativa na faixa de temperatura fisiológica entre 32-37°C, perdendo significativamente sua atividade abaixo de 27°C. Este resultado indica que a(s) enzima(s) presente(s) neste veneno pode(m) estar ativa(s) durante o envenenamento humano. Curiosamente, as proteases apresentam atividade catalítica até temperatura de 42°C.

Em resumo, após os ensaios relatados acima, os testes enzimáticos passaram a ser realizados em tampão Tris básico 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8 a 37°C. É importante salientar a importância de tais caracterizações, pois as metalopeptidases, assim como as outras peptidases, são moléculas proteicas que dependem destes parâmetros para manter sua estrutura e atividade e, com base nisso, foram utilizados para buscarmos um possível substrato natural para esta(s) metaloprotease(s).

4.1.6- Atividade sobre peptídeos biologicamente ativos: Incubação com peptídeos e análise HPLC

Na tentativa de definirmos um possível substrato consumido durante o envenenamento, os peptídeos biologicamente ativos (angiotensina, bradicinina, neurotensina e dinorfina 1-13) foram incubados primeiramente com o veneno total (5 µg), porém, apenas a dinorfina 1-13 foi hidrolisada pelo VTs (Figura 9). Os picos de hidrólise foram coletados manualmente, secos em sistema de speed vac e analisados pela Central Analítica IQ-USP para a determinação de seus pontos de hidrólise. O resultado da análise dos pontos de clivagem está demonstrado na Figura 9.

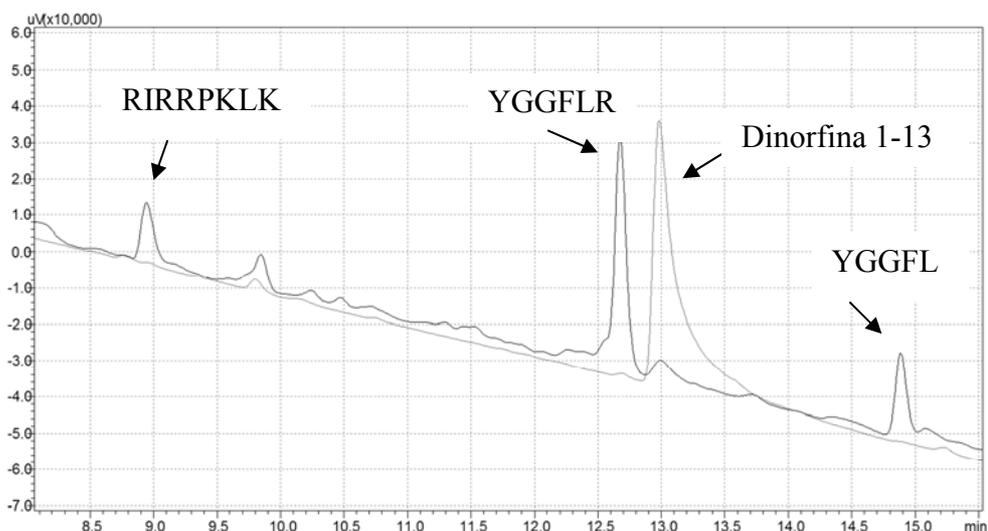


Figura 09. Perfil cromatográfico em coluna C-18 pós-incubação da dinorfina 1-13 (31 μ M) com 5 μ g do veneno total de *Tityus serrulatus* por 4 horas em tampão Tris básico 50 mM NaCl 50 mM, pH 8 a 37°C, sendo que o controle está representado pela cor cinza e o incubado com o veneno em preto. Após observar clivagem da dinorfina (clivagem total), os três picos gerados como produtos foram analisados por espectrometria de massas. Os parâmetros da corrida foram gradiente de 2,5% B/min (10-60%/40mins), sob fluxo de 1mL/min.

Como é possível observar na Figura 09, a clivagem na dinorfina 1-13 (Y¹G²G³F⁴L⁵R⁶R⁷I⁸R⁹P¹⁰K¹¹L¹²K¹³) resultou em três picos majoritários na análise por HPLC: O mais hidrofílico seria RIRPKLK; o mais hidrofóbico, o pentapeptídeo conhecido como leu-encefalina (YGGFL); e uma fração peptídica próxima a dinorfina correspondente a YGGFLR. Portanto, os pontos de clivagem são entre os resíduos Leu⁵-Arg⁶ e entre Arg⁶-Arg⁷ (YGGFL//R//RIPKLK).

4.1.7 - Fracionamentos do veneno total: Purificação parcial da(s) metalopeptidase(s) do VTs (Etapas Iniciais)

Uma vez que estamos estudando a atividade peptidásica do veneno bruto do *T. serrulatus*, as frações demonstradas a seguir não foram submetidas à análise por espectrometria de massas. Futuramente, no próximo projeto, pretendemos realizar a purificação efetiva das metalopeptidases do VTs e analisar mais aprofundadamente as especificidades primárias das mesmas para a hidrólise de substratos, bem como a determinação correta do ponto de clivagem e determinações de K_m e K_{cat}.

Para verificarmos se apenas a antarease é a molécula responsável pela atividade metalopeptidásica no VTs, iniciamos a primeira etapa de purificação, que foi a separação das moléculas por diferenças de massas moleculares. Para isso, foi utilizado o método de filtração por membranas de corte molecular. Foram obtidas três frações principais: fração G, contendo moléculas maiores que 30 kDa; a fração M, comportando moléculas de massas moleculares entre 10-30 kDa; fração P, composta por peptídeos menores que 10 kDa (utilizada para a busca de moduladores de proteases). Os teores proteicos das frações foram: P (<10 kDa, 1,6 µg/µL), M (10-30 kDa, 12,4 µg/µL) e G (>30 kDa, 15,4 µg/µL). É importante ressaltar que a dosagem da fração P foi apenas uma estimativa, uma vez que o método utilizado se aplica melhor para proteínas. A fim de visualizar a purificação, foi realizado um gel SDS-PAGE 12,5%, representado na Figura 10, a seguir.

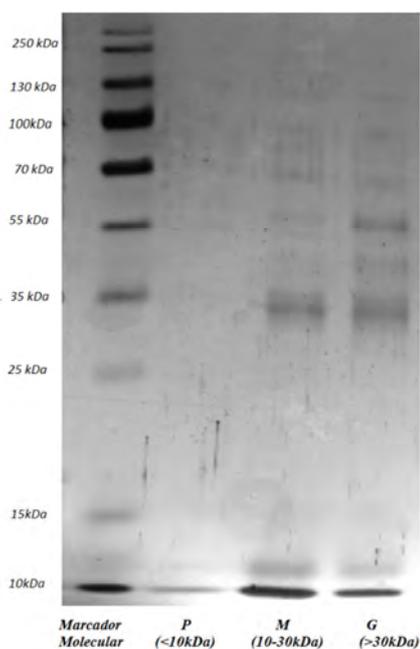


Figura 10. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 12,5%, das frações P (<10 kDa), M (10-30 kDa) e G (>30kDa), obtidas por fracionamento do VTs por membranas de corte molecular

A Figura 10 indica que a técnica de corte molecular é efetiva, contudo não muito precisa. Como é possível observar, a fração P não apresentou bandas acima de 10 kDa. Por outro lado, a fração M apresentou bandas fracas acima de 30 kDa, porém em menor intensidade quando comparados com a fração G.

Para a seleção das frações com atividade proteolítica foi realizado um teste de atividade enzimática com as amostras denominadas P/M/G e os resultados podem ser observados na Tabela 04 sobre o substrato pré selecionado Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 μ M). Os experimentos foram realizados triplicatas.

Tabela 04. Teste de atividade específica (UF/min/ μ g) com as frações obtidas por fracionamento do VTs por membranas de corte molecular. Ensaio realizado em fluorímetro utilizando o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp (5 μ M).

Fração	Atividade específica (UF/min/μg)
G (> 30kDa)	317 \pm 12
M (10-30kDa)	134 \pm 2
P (< 10kDa)	S/A*

S/A – Sem atividade; * quantificação estimada

A Tabela 04 mostra maior atividade das frações de maior massa molecular (G) em relação às de massa intermediária (M). Os peptídeos (presentes em P) não mostraram atividade peptidásica.

4. 1.8 - Purificação da fração G (>30 kDa) por HPLC

A fração G (>30kDa) foi submetida à análise em HPLC fase-reversa C-4 (Shodex). O perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 11.

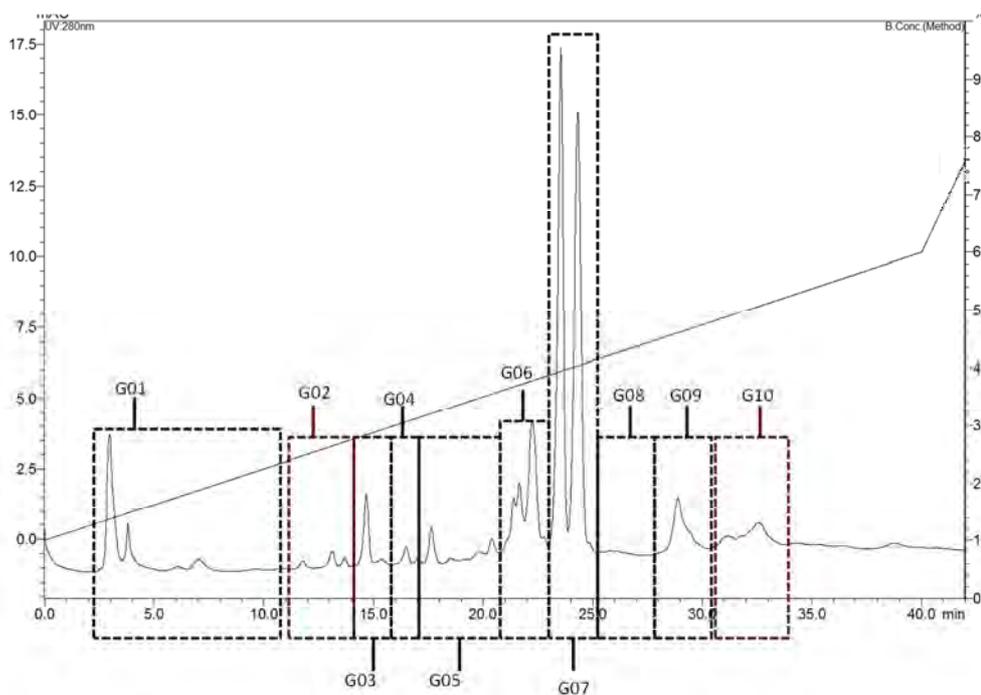


Figura 11. Perfil cromatográfico da fração G (> 30 kDa) após análise em HPLC, resultando na obtenção de 10 frações (G01-G10). Os tampões de corridas utilizados foram solução A (H₂O/0,1%TFA) e solução B (acetonitrila/tampão A 9:1). Os parâmetros da corrida foram gradiente de 1,25% B/min (Linha azul), sob fluxo de 1mL/min.

Em resultado a cromatografia de HPLC, dez subfrações (G1-G10) foram obtidas, liofilizadas e ressuspendidas em Tampão Tris básico 50mM, NaCl 50mM, pH 8,0. As subfrações foram testadas em ensaio de atividade proteolítica com o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp e apenas as subfrações G02 e G10 apresentaram atividade peptidásica. As subfrações G02 e G10 tiveram seus teores proteicos dosados pelo método de curva padrão de Albumina (BSA). As análises foram feitas em triplicata. Os resultados podem ser observados na Tabela 05.

Tabela 05. Atividade específica (UF/min/ μ g) das subfrações de G (> 30 kDa) utilizando o Abz-GGFLRRV-EDDnp como substrato

Fração	Atividade específica (UF/μg/min)
G02	824 \pm 10
G10	226 \pm 6

Condições da reação: Tampão Tris 50mM NaCl 50mM a 37°C em espectrofluorímetro. Ensaios feitos em triplicata com desvios inferiores a 10%.

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) com as amostras G02 e G10 para verificação o perfil proteico da amostra, indicada na Figura 12.

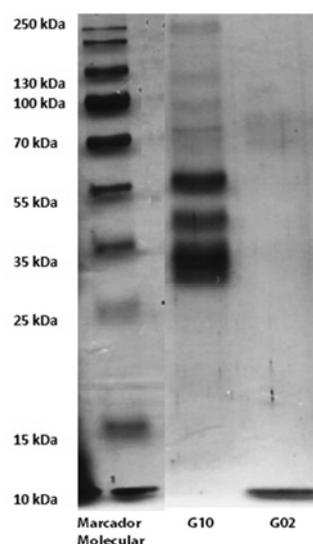


Figura 12. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 12,5% em coloração prata, das subfrações de G (> 30kDa), G10 e G02, obtidas por HPLC em fase reversa.

O gel de SDS-PAGE permitiu a visualizar que a fração G10 apresenta três bandas principais (aproximadamente 35 kDa, majoritária, 40 kDa e 55 kDa) utilizando tampão de amostra redutor, o que indica a necessidade de continuidade nas etapas de purificação desta enzima. É possível observar que G02 apresenta uma banda fraca em 70 kDa, além de fragmento secundário de 10 kDa.

Após isso, verificamos a capacidade da fração G e suas subfrações G02 e G10 em clivar a dinorfina 1-13, visto que já havíamos determinado que somente este substrato é hidrolisado pelo veneno total de *Tityus serrulatus* dentre os examinados neste trabalho. O resultado pode ser observado na Tabela 06.

Tabela 06. Taxa de consumo da dinorfina 1-13 (31 μ M) pelo veneno total, a fração G e suas subfrações G02 e G10 em RP-HPLC em coluna C-18 após 5 horas de incubação.

Amostra	Taxa de consumo (%)
	em 5 horas
Dinorfina (Controle Negativo)	0
Veneno Total + dinorfina (Controle Positivo)	95,4
Fração G + dinorfina	95
G02 + dinorfina	34
G10 + dinorfina	100

O valor de taxa de consumo(%) em 5 horas foi calculado utilizando o valor da área do pico da dinorfina em HPLC como 0% em comparação com as áreas da dinorfina consumida (na presença de VTs, G, G02 e G10). Perfil cromatográfico em coluna C-18 pós incubação da dinorfina 1-13 (31 μ M) com 5 μ g do veneno total de *Tityus serrulatus*. Os parâmetros da corrida foram gradiente de 2,5% B/min (10-60%/40mins), sob fluxo de 1mL/min.

O resultado indica que tanto a fração G quanto suas subfrações (G10 e G02) apresentam atividade proteolítica, podendo significar a presença de mais de uma metalopeptidase com atividade degradadora de dinorfina 1-13.

Parte II: Estudo de componentes peptídicos

4.2 – Busca de peptídeos moduladores de atividade peptidásica de oligopeptidases recombinantes.

4.2.1- Obtenção e caracterização das frações do veneno de *T. serrulatus* utilizando membrana de corte molecular e HPLC

Como visto anteriormente, a fração de baixa massa molecular obtida por membrana de corte molecular de 10 kDa (Fração P, < 10kDa) não apresenta atividade peptidásica e, portanto, é composta exclusivamente de peptídeos (Figura 10).

Para o estudo dos componentes peptídicos do VTs, a Fração P foi submetida a cromatografia fase-reversa, em sistema de HPLC com coluna C-18. O gradiente inicial utilizado foi de 10-60% de solvente B em 40 min. Assim, a velocidade de troca de B/min foi de 1,25 %B/min. O gráfico a seguir (Figura 13) mostra o perfil em 214 nm obtido (injeção de 100 µL de material).

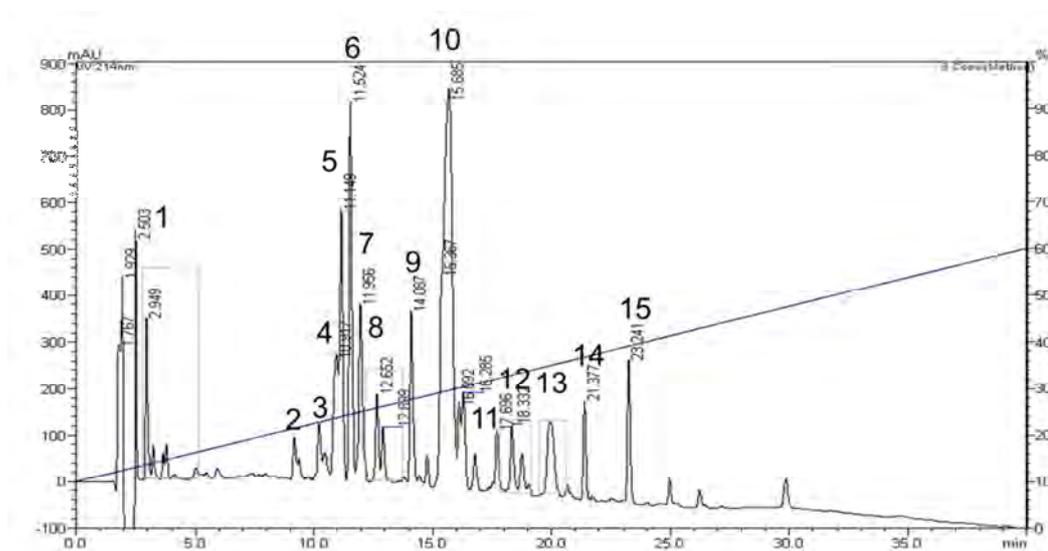


Figura 13. Perfil Cromatográfico da fração P (> 10 kDa) em RP-HPLC. A Figura mostra a obtenção de 15 frações (P01-P15), os quais foram coletados e liofilizados para análises posteriores.

Após a obtenção das 15 frações, as mesmas foram secas em sistema de speed Vac e ressuspensas em 50 µL de tampão PBS, pH 7,4 e submetidas à testes enzimáticos utilizando o substrato fluorescente QFS (7-MCA-4-ac-PLGpLys-(2,4-dinitrophenyl),

10 μM) e as peptidases recombinantes neurolisina (EP24.16) e thimet oligopeptidase (EP24.15). Para um *screening* de atividade, foram utilizados 10 μL das soluções dos 15 picos e as medidas de seus potenciais inibitórios foram realizadas em duplicata. A Tabela 07, a seguir, mostra a porcentagem de redução das atividades da neurolisina e da thimet oligopeptidases sobre o substrato QFS obtidas com as 15 frações.

É importante ressaltar que as frações foram selecionadas por reduzirem a atividade hidrolítica das duas oligopeptidases sobre o QFS, não sendo possível, neste momento, determinar se os peptídeos que compõem cada uma das 15 subfrações são inibidores ou substratos destas peptidases.

Tabela 07. Porcentagem de redução da hidrólise do QFS pelas oligopeptidases neurolisina e thimet oligopeptidase pelos picos de HPLC da fração P (<10kDa) do veneno de *Tityus serrulatus*.

Pico	Neurolisina	Thimet oligopeptidase
P1	NA	N.A.
P2	N.A.	N.A.
P3	N.A.	N.A.
P4	15	35
P5	N.A.	N.A.
P6	50	40
P7	25	22
P8	N.A.	N.A.
P9	N.A.	N.A.
P10	N.A.	N.A.
P11	74	22
P12	72	55
P13	82	88
P14	38	17
P15	11	55

N.A. = Hidrólise de QFS não é afetada.

Os picos que apresentaram redução satisfatória da atividade de uma ou ambas as peptidases sobre o substrato fluorescente foram repurificados em sistema de HPLC C-18. Inicialmente, foram feitos perfis analíticos com 5 µL de cada pico e, após, foram injetados os 95 µL restantes para coleta manual. Cada fração foi cromatografada em

gradientes diferentes objetivando uma melhor separação de seus componentes. Os perfis que são apresentados a seguir são referentes à injeção de 95 μ L.

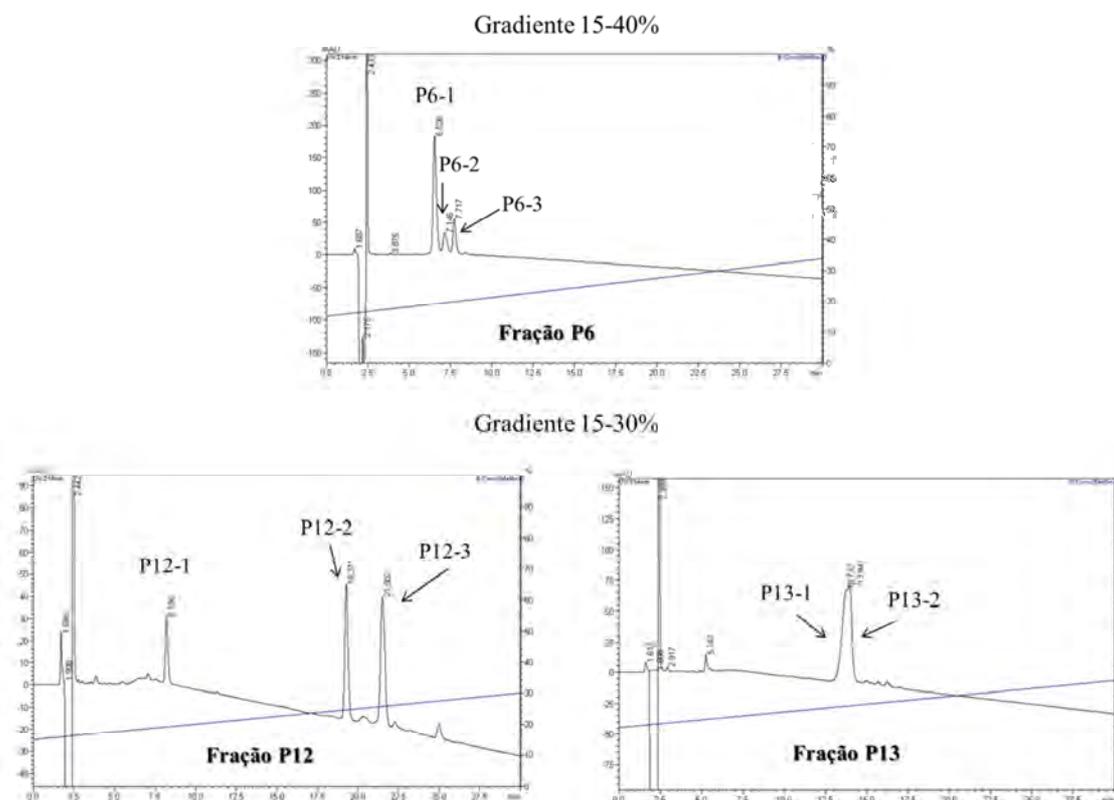


Figura 14. Perfil cromatográfico das frações de P (<10kDa) do veneno de *Tityus serrulatus* em RP-HPLC. As amostras foram separadas com diferentes gradientes de tampão B, sendo de 15-40% (0,6 %B/min) para a fração 6 e 15-30% (0,375%B/min), utilizado para as frações P12 e P13 dependendo da especificidade de cada amostra. As frações foram coletadas e liofilizadas.

Após a nova purificação dos componentes peptídicos contidos nas frações P6, P12 e P13, as amostras denominadas P6-1, P6-2 e P6-3 (provenientes da amostra P6); P12-1, P12-2 e P12-3 (provenientes da amostra 12) e P13-1 e P13-2 (provenientes da amostra 13) foram ressuspensas em 50 μ L de H₂O milli-Q e foram utilizados 2 μ L nos testes fluorimétricos. A Figura 15 mostra os resultados obtidos na incubação com a thimet oligopeptidase.

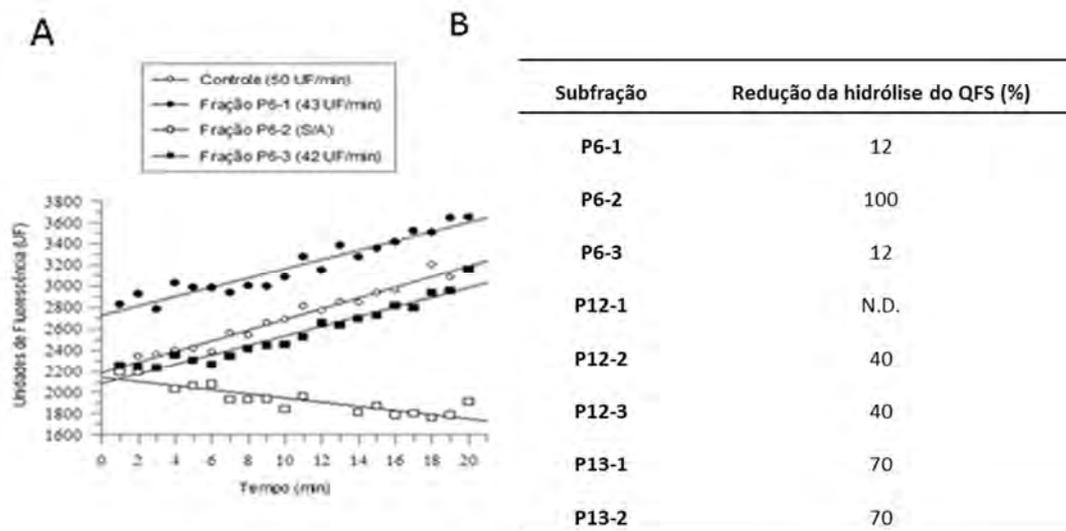


Figura 15. Ensaio de atividade de thimet oligopeptidase com peptídeos da fração P. (A) Gráfico esquemático obtido com os fragmentos de P6; (B) Resultados, em porcentagem, de inibição obtida com as frações que possuíam mais de um pico no HPLC. N/D= atividade “inibitória” não detectada.

Como é possível observar, dos picos da fração P6 somente a amostra P6-2 foi capaz de reduzir a atividade da thimet oligopeptidase sobre o QFS em 100%. Com relação à amostra 12, tanto a fração denominada P12-2 e P12-3 apresentaram cerca de 40% de redução da hidrólise do substrato fluorescente da atividade da EP24.15. Em contrapartida, a P12-1 não apresenta potencial inibitório. As amostras P13-1 e P13-2 foram capazes de reduzir cerca de 70% da atividade da EP24.15.

A partir destes resultados, as amostras P6-2, P13-1 e P13-2 sobre a thimet oligopeptidase foram selecionadas para análise em espectrometria de massas no do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química (Campinas, SP).

4.2.2 - Análise das Sequências Primárias dos Peptídeos de Interesse

A análise no banco de dados Expert Protein Analysis System utilizando a ferramenta BLAST permitiu uma visão ampla sobre quais peptídeos já descritos na literatura (ou homólogos) estariam presentes nestes picos selecionados. Os resultados estão expressos na Tabela 08.

Tabela 08. Resultados do software Mascot de P13-1e P13-2. Análise em ExPASy Proteomics Server utilizando a ferramenta BLAST.

Fração	Sequência MS/MS	Resultado BLAST	Referência
P13-1	AEPAAPAAAAEPEP	Fragmento PAPE	Rates et al., 2008
	AEIDFSGIPEDIKQIKET	Fragmento TsHpt _[1-19] (Hipotensina)	Verano-Braga et al., 2010
P13-2	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA	TsHpt (Hipotensina)	Verano-Braga et al., 2010

Em contrapartida, para a amostra P6-2 não foi possível encontrar peptídeos similares pelos softwares de banco de dados (PepSeq e Mascot), necessitando de um sequenciamento *de novo*. Após determinadas as sequências, adotou-se a estratégia de buscar na literatura manualmente sequências similares. O resultado pode ser observado na Tabela 09.

Tabela 09. Resultados da análise do sequenciamento *de novo* para P6-2. Dados obtidos no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química (Campinas – SP).

Fração	Sequência MS/MS	Resultado de sequências similares	Referência
P6-2	KEXLG (X=Ile/Leu)	Porção do pró peptídeo de β -KTx de <i>Tityus spp.</i>	Batista et al., 2004
	YLPT	Proctolina sem arginina	Lange e Orchard, 2006*
	FTR	FMRFamida	Baratte et al., 1991*

* Sequências não descritas no VTs, mas encontradas em insetos.

Por apresentarem similaridade com moléculas já descritas e por apresentarem número restrito de aminoácidos, compatível ao descrito para as oligopeptidases, os

peptídeos indicados nas Tabelas 08 e 09 foram sintetizados. É importante ressaltar que a sequência KEXLG foi sintetizada tanto com isoleucina como com leucina em X.

Em primeiro lugar, verificamos se os peptídeos eram substrato para a neurolisina e thimet oligopeptidase realizando assim um ensaio de clivagem em HPLC, o qual pode ser observado na tabela a seguir.

Tabela 10. Taxa de clivagem relativa (%) dos peptídeos sintéticos obtidos a partir da fração de baixo peso do veneno de *Tityus serrulatus*.

	EP 24.15	EP 24.16
Bradicinina	100	100
KEILG	<0.01	<0.01
KELLG	<0.01	<0.01
YLPT	<0.01	<0.01
FTR	<0.01	<0.01
PAPE	<0.01	<0.01
TsHpt _[1-19]	<0.01	<0.01

Condições da reação: tampão fosfato 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4, sendo para EP24.15 foi feita a adição 1% de mercaptoetanol no tampão. Os peptídeos foram incubados com as oligopeptidases durante 4 horas e analisados em cromatografia de fase reversa em coluna C-18.

Os resultados indicam que os peptídeos sintéticos do veneno de *T. serrulatus* não são clivados pela neurolisina ou pela thimet oligopeptidase e, portanto, finalmente, foi possível conferir o termo “inibidores da thimet oligopeptidase” para estas sequências.

O próximo passo foi determinar o mecanismo de inibição e a constante de inibição (K_i) dos peptídeos para as enzimas neurolisina, thimet oligopeptidase e ECA (EC3.4.15.1). A Tabela 11 mostra os resultados obtidos

Tabela 11. Mecanismos de inibição e constante de inibição (Ki) obtidos pela inibição das oligopeptidases EP24.15, EP24.16 e ECA por peptídeos sintéticos obtidos do veneno de *Tityus serrulatus*.

	Mecanismo de inibição	Ki (μM) EP24.15	Mecanismo de inibição	Ki (μM) EP24.16	Ki (μM) ECA
	EP24.15		EP24.16		
KEILG	acompetitivo	16	Não inibe		
KELLG	competitivo	84	Não inibe		
YLPT	competitivo	74	Competitivo	36	Inibição não observada
FTR	competitivo	36	Competitivo	120	
PAPE	competitivo	58	Competitivo	77	
TsHpt _[1-19]	Inibição não observada				

A Tabela 11 mostra que os peptídeos agem, em sua maioria, por mecanismo competitivo, com exceção de KEILG, o qual mostrou uma inibição incompetitiva com a EP24.15. Além disso, KELLG e KEILG mostraram-se inibidores específicos para a thimet oligopeptidase, uma vez que não inibiram suas similares neurolisina e ECA. Nas concentrações testadas, a hipotensina (TsHpt_[1-19]) não foi capaz de inibir nenhuma das peptidases e nenhum dos peptídeos foi capaz de bloquear a atividade de ECA.

4.2.3 – Determinação da sequência correta de KEXLG presente no VTs

A fim de se identificar a sequência correta do peptídeo presente em VTs, um experimento de diferenciação foi realizado utilizando os peptídeos sintéticos KEILG e KELLG. Através da cromatografia em fase reversa, observou-se que os perfis dos peptídeos KELLG e KEILG apresentavam tempos de retenção diferentes, variando cerca de um minuto. Para a determinação da sequência presente no veneno, foram comparados os perfis de KELLG e KEILG, a fração P original e um “mix peptídico”

contendo 40 µg de peptídeo sintetizado (KELLG e KEILG) e 20 µL da fração P. Os perfis obtidos foram comparados e analisados, como mostra a Figura 16.

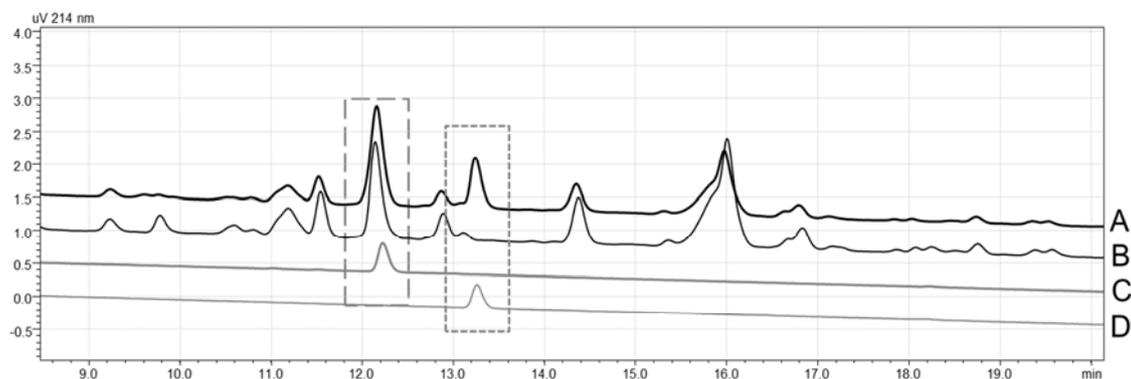


Figura 16. Perfis cromatográficos obtidos em RT-HPLC : (A) 20 µL da fração P (<10kDa) do veneno de *Tityus serrulatus* contendo 40 µM de KEILG e 40 µM de KELLG; (B) 20 µL da fração P original ; (C) 20 µM de KEILG; (D) 20 µM de KELLG. O gradiente utilizado foi de 1,25% B/min com absorção UV a 214 nm.

Através da observação do aumento do pico proporcional correspondente ao peptídeo KEILG no “mix peptídico”, foi constatado que a sequência componente do veneno do *T. serrulatus* corresponde ao peptídeo KEILG.

5. Discussão

Acidentes ocasionados por animais peçonhentos são relevantes para a saúde pública, considerando que, anualmente, são registrados mais de 100 mil acidentes e aproximadamente 200 óbitos no Brasil. Os casos de escorpionismo, em especial, vêm aumentando gradativamente, representando 30% dos envenenamentos por animais em 2007, superando casos de ofidismo. Os principais fatores para o aumento da incidência estão atrelados à biologia dos escorpiões, especialmente por conta da forma de reprodução e proliferação das espécies no caso do *T. serrulatus*, do comportamento e da alimentação, permitindo fácil adaptação em ambientes urbanos e favorecendo a ocorrência dos acidentes (Ministério da Saúde, 2009). Em adição, devido à grande potência de seu veneno, o escorpião *Tityus serrulatus* é uma das espécies de maior importância epidemiológica no Brasil (Soares et al., 2002).

A observação do quadro clínico de escorpionismo provocado em acidentes causados por *Tityus serrulatus* auxiliou na seleção de moléculas que seriam possíveis alvos onde o veneno deste animal poderia estar atuando. Devido ao quadro clínico apresentado pelas vítimas de escorpionismo, sabe-se que o alvo principal das toxinas é o sistema nervoso central (Freire-Maia; Campos, 1989; Teixeira et al., 1998). Com isso, a maioria das informações sobre os componentes deste veneno referem-se às moléculas atuantes em canais iônicos, principalmente aos inibidores de canais de potássio (Zhijian, 2005; Cologna et al., 2009).

Assim, a motivação deste trabalho foi estudar componentes proteolíticos e peptídicos por meio de ensaios bioquímicos *in vitro*, tentando atribuir, ainda, prováveis efeitos dessas moléculas no envenenamento. Para tal, enzimas com restrição para interação com pequenas moléculas foram selecionadas a fim de se estudar os peptídeos presentes no veneno. Em adição, esta abordagem foi utilizada com base na seletividade das oligopeptidases por pequenas moléculas (Gomes-Ruth, 2008; Rioli et al., 1998) associada ao fato de que a maior porcentagem dos componentes de venenos de artrópodes é de peptídeos (Alvarenga et al., 2012; Rates et al., 2008).

As peptidases presentes no veneno também foram exploradas neste trabalho, pois, em serpentes, são responsáveis por efeitos locais, no caso das metalopeptidases, ou sistêmicos, no caso das serinopeptidases (Kuniyoshi et al., 2012). Contudo,

diferentemente dos venenos ofídicos, os venenos escorpiônicos não apresentam grande diversidade/quantidade de peptidases e nem função tão evidente no envenenamento (Almeida et al., 2012; Alvarenga et al., 2012; Morgenstern et al., 2011) sendo, portanto, pouco exploradas até o momento.

Componentes proteolíticos

Para o veneno de escorpiões, poucos estudos relatam a presença de peptidases. Por exemplo, no caso do VTs, a única metalopeptidase descrita, denominada antarease, foi purificada por Fletcher e colaboradores em 2010, porém neste artigo não foram atribuídas propriedades bioquímicas para esta enzima, nem abordadas a possível existência de outros compostos proteolíticos, além de não hipotetizadas possíveis relações com o envenenamento.

Com isso, a primeira etapa para o estudo dos componentes proteolíticos foi a constatação da atividade enzimática no veneno através do uso de uma biblioteca de substrato fluorescentes. Esses substratos, denominados de FRETs, apresentam no amino grupo N-terminal do peptídeo o radical fluorescente ácido *orto*-aminobenzoico (Abz) e no grupo carboxila terminal o grupo apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp), permitindo assim o monitoramento direto da velocidade de hidrólise dos substratos em espectrofluorímetro (Chagas et al., 1995). Através do experimento de identificação de atividade proteolítica do VTs, foi possível estabelecer que somente duas sequências, Abz-GGFLRRV-EDDnp e Abz-KLRFSKW-EDDnp foram clivadas, sendo que Abz-GGFLRRV-EDDnp foi selecionado como substrato ideal neste estudo, pois o mesmo foi clivado com maior valor de atividade específica pelo VTs. O ponto de clivagem de Abz-GGFLRRV-EDDnp também foi estimado pelo uso de uma biblioteca de FRETs contendo sequências diversificadas de aminoácidos, onde foi constatada hidrólise entre leucina e arginina (Abz-GGFL//RRV-EDDnp). Porém, como o estudo foi realizado com o veneno total, não exclui a possibilidade de esse substrato apresentar outro ponto de clivagem, entre R-R ou R-EDDnp. Esta hipótese baseia-se nos pontos de clivagem obtidos com a dinorfina 1-13 e será avaliada futuramente com as peptidases em suas formas homogêneas.

Selecionado o substrato ideal, foi determinado que a atividade do veneno total é caracterizada pela ação de metalopeptidases por ensaio utilizando inibidores específicos.

A atividade enzimática do veneno de *Tityus serrulatus* já foi abordada em outros trabalhos. Almeida et al. (2002) realizaram estudos de atividade proteolítica no veneno dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* e, a partir de ensaios zimográficos utilizando gelatina como substrato, foi concluído que as proteases eram exclusivamente serinopeptidases, devido a uma inibição de 40% por PMSF. Em contrapartida, Fletcher e colaboradores (2010) relataram somente a presença de metalopeptidases no veneno de *Tityus serrulatus*. Esta diferença de famílias enzimáticas encontrada por Almeida (2002) e Fletcher (2010) pode ser explicada pela utilização de metodologias distintas por cada autor. Nos estudos mostrados neste presente trabalho, sempre que foi detectada a presença de uma atividade peptidásica, a mesma foi inibida pelo uso de EDTA, sem nenhuma ação do PMSF. A recente análise de transcriptoma revelou somente a presença de metalopeptidases transcritas no veneno de *Tityus* (Alvarenga et al., 2012), contribuindo para a informação que somente metalopeptidases atuam no VTs. Além disso, nosso grupo recentemente realizou a busca de atividades enzimáticas no veneno de três espécies brasileiras de *Tityus*, onde só foram constatadas atividade metalopeptidásica e hialuronidásica, não sendo detectadas atividades fosfolipásica e serinopeptidásica, mesmo realizando ensaios de atividade gelatinolítica assim como os realizados no trabalho de Almeida e colaboradores em 2002 (Venâncio et al., 2013). Em adição, o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp utilizado na busca de um substrato fluorescente, não foi hidrolisado pelo VTs e trata-se de um substrato especialmente desenhado para o estudo de serinoproteases (Chagas et al. 1995). Assim, pelos motivos citados, existem fortes indícios que o veneno do escorpião de *Tityus serrulatus* só possua metalopeptidases em sua composição.

A fim de se estabelecer condições ótimas para a atividade peptidásica, ensaios bioquímicos foram realizados. O estudo da influência de cátions monovalentes e bivalentes revelou uma influência positiva de sódio, provavelmente por colaborar com a estabilidade, e negativa de magnésio possivelmente por competição pelo zinco na região do sítio catalítico, indicando a dependência deste metal para sua atividade catalítica, assim como ocorrido com metalopeptidases dependentes de zinco. Ainda, os ensaios de pH e temperatura demonstraram que a(s) peptidase(s) presente(s) no veneno apresenta(m) atividade numa ampla faixa de variação, apresentando valores compatíveis com a fisiologia humana, como atividade em pH 7,5 e em temperatura de 35°C, fatores que pode indicar a atividade peptidásica durante o envenenamento humano. Todavia, foi

estabelecido que pH 8 e temperatura 37°C são as condições ideais para o trabalho *in vitro*, sendo utilizadas durante os experimentos subsequentes.

O próximo passo foi determinar substratos biologicamente ativos que pudessem ser clivados pela metalopeptidase. Para tal, o perfil desses peptídeos foi analisado em cromatografia de fase reversa, coluna C-18, na presença e na ausência de veneno. A escolha dos peptídeos foi baseada nos quadro hipotensivo e neurotóxico observado em pacientes envenenados pelo escorpião amarelo. Assim, peptídeos frequentemente degradados *in vitro* por venenos animais (Kuniyoshi et al., 2012) foram selecionados: peptídeos importantes para o controle de pressão arterial, como a angiotensina I (sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona) e bradicinina (Sistema Calicreína-Cinina), e os neuropeptídeos neurotensina e dinorfina 1-13. O resultado mostra que somente a dinorfina 1-13 (YGGFLRRIRPKLK) foi clivada pelo veneno de *Tityus serrulatus*, gerando três fragmentos: YGGFL (leu-encefalina), YGGFLR e RIRPKLK. Mais uma vez pudemos notar a especificidade dos peptidases do VTs para a hidrólise de seus substratos, uma vez que a neurotensina apresenta similaridade de sequência primária com a dinorfina, mas não foi clivada. Ao contrário, o substrato fluorescente Abz-GGFLRRV-EDDnp, também análogo a dinorfina 1-13, foi hidrolisado eficientemente pelo VTs.

Assim, diferentemente do esperado, a neurotensina não foi substrato para o VTs, tendo em vista que foi selecionada por ser um neuropeptídeo encontrado no SNC. Contudo, a atividade proteolítica do veneno se mostrou seletiva para a dinorfina 1-13, entre os aminoácidos Leu//Arg e Arg//Arg. Apesar da neurotensina (<ELYENKPRRPYILK, onde <E é piroglutaminil) apresentar duas argininas em sequência assim como a dinorfina 1-13, o que poderia significar hidrólise neste ponto, contudo, deve-se levar em conta também todos os aminoácidos nas posições S1 a Sn e S1' a Sn', pois também são importante para o reconhecimento do substrato pela enzima. Portanto, a ausência de clivagem da neurotensina pode ser explicada pelo reconhecimento bioquímico específico da(s) enzima(s) por seu substrato.

A dinorfina A ou dinorfina 1-13 é um neuropeptídeo opióide endógeno envolvido em processos fisiológicos como a antinociocepção e sinalização neuroendócrina, podendo também estar envolvida na proteção neuronal e oligodendritica mediada via receptores opióide. Em contrapartida, experimentos onde

foram aumentadas as doses de dinorfina 1-13 em ratos, resultaram em aumento da citotoxicidade desencadeando dor neuropática (Hauser et al., 2005).

Em comparação com os dados já publicados da antarease, um dos pontos de clivagem da dinorfina 1-13 encontrado foi entre a leucina e a arginina, no passo que a antarease clivou a VAMP-2, substrato utilizado pelos autores, entre leucina e lisina (Fletcher et al., 2010). Podemos dizer que os resultados de Fletcher e colaboradores e os apresentados neste relatório são complementares, pois arginina e a lisina são aminoácidos polares básicos, o que pode ser importante para o reconhecimento do ponto de hidrólise pela enzima. Assim, provavelmente parte da ação peptídica está sendo realizada pela antarease. Por outro lado, foi observada a clivagem entre os resíduos de arginina na sequência da dinorfina 1-13, o que é inédito para o veneno desta espécie de escorpião, o que pode sugerir a ação de mais de uma peptidase.

A liberação da leu-encefalina (YGGFL) *in vitro* pelo veneno de *Tityus serrulatus* é um resultado interessante, tendo em vista que a dinorfina 1-13 não é seu precursor natural (Hauser et al., 2005). O processamento em mamíferos para a geração de leu-encefalina natural se dá pela ação de pro hormônio convertases (PC1 e PC2) sobre a proencefalina (Salzet, 2001), entretanto neste trabalho observamos que proteases do escorpião amarelo podem gerar este pentapeptídeo.

Segundo Inyushkin (2007), experimentos *in vitro* utilizando cérebros de ratos mostraram que a injeção de leu-encefalina estimula a entrada de correntes de potássio em neurônios da região centro respiratória, promovendo uma hiperpolarização das membranas e resultando numa ação inibitória na atividade dos neurônios. Tal resultado indica que o aumento de leu-encefalina influencia a entrada de potássio em neurônios, o que se relaciona diretamente com o envenenamento causado por *Tityus serrulatus*, pois sua ação é considerada neurotóxica por afetar canais iônicos, especialmente os de potássio, como já descritos anteriormente. Contudo, a liberação da leu-encefalina por proteases do veneno juntamente com dados descritos por Inyushkin (2007) sugerem que pode também haver uma ação secundária sobre o influxo iônico em neurônios, e não somente ação de neurotoxinas que atuam diretamente nos canais.

Por conta disso, foi dado prosseguimento no estudo desta atividade no intuito de observamos se apenas a antarease era responsável pela clivagem da dinorfina ou se

outra metalopeptidase estava participando desta hidrólise. A fim de se preservar a atividade observada, o processo inicial de purificação foi pela separação de componentes pela massa molecular, utilizando membranas de corte molecular de 30 kDa e 10 kDa e sob temperatura de 4°C. Através da análise por SDS-PAGE foi demonstrado que a fração G, correspondente à amostra retida pela membrana de 30 kDa, é composta por fragmentos maiores que 30 kDa, sendo capaz de clivar o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com maior eficiência em relação a M. Com isso, a fração G foi analisada em cromatografia de fase reversa resultando em 10 frações e apenas duas frações foram capazes de hidrolisar o substrato fluorescente: G02 e G10. Em análise por SDS-PAGE 12,5%, observou-se que G02 apresenta uma banda fraca de 70 kDa, além de um fragmento secundário de 10 kDa, diferentemente de G10, onde bandas fortes em 35 kDa e bandas secundárias de 40 kDa e 55 kDa foram detectadas. A diferença de intensidade entre G02 e G10 também está expressa na atividade específica, pois G10 foi capaz de consumir mais rapidamente a dinorfina 1-13 do que a fração G02. Ainda, no passo que a subfração G10 apresentou maior atividade de clivagem de dinorfina 1-13, G02 atuou melhor sobre o substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp. Assim, embora não tenhamos purificado à homogeneidade as peptidases presentes no VTs, sabemos certamente que mais de uma molécula é responsável por esta atividade.

Outro fato a ser elucidado é que as peptidases encontradas foram surpreendentemente resistentes à liofilização e a purificação por HPLC, possuindo atividade detectável após essas etapas que podem promover a perda da estrutura terciária destas moléculas. Essa característica é interessante para a funcionalidade do veneno, pois provavelmente as peptidases são capazes de resistir a diversos sistemas fisiológicos, possibilitando a atuação tanto em insetos, na alimentação, quanto na defesa dos escorpiões, no envenenamento de predadores. Além disso, essa persistência de atividade pode significar que as peptidases também têm papel funcional no envenenamento, provavelmente muito mais significativos em insetos, e não somente atuando como produtora do “pool” peptídico, o que pode ser estimulante para futuros estudo de peptidases em venenos de escorpiões.

Componentes peptídicos

Na fisiologia, peptídeos são importantes moléculas bioativas que agem na regulação de diversos processos no organismo, atuando como hormônios, citocinas e inibidores enzimáticos. A presença de peptídeos em venenos animais pode ser devido ao processamento de moléculas precursoras por enzimas constituintes da própria peçonha. Tashima et al. (2012) demonstraram que a coleta de veneno de três serpentes do gênero *Bothrops* acompanhada por coquetel de inibidores proteolíticos modificou o peptidoma das amostras, diferenciando-se da coleta casual, ou seja, sem inibidores. Importantes peptídeos, como os BPPs, não foram encontrados nas amostras com inibidores, o que demonstra que a dinâmica do veneno é extremamente relevante para a produção de moléculas bioativas que tem efeitos significativos no envenenamento. Assim, pelos parâmetros utilizados neste trabalho, não consideramos se os peptídeos encontrados são transcritos na glândula de veneno ou se são produtos de clivagens pelas metalopeptidases do veneno, pois julgamos que sua presença no veneno sugere algum papel significativo.

Atualmente, os peptídeos de venenos animais têm ganhado maior atenção da comunidade científica, principalmente com base no potencial farmacêutico destas moléculas, dada a seletividade e especificidade de ação em processos fisiopatológicos. De acordo com estas características, apesar destas moléculas serem classificadas como toxinas, as mesmas podem ser utilizadas como drogas, ou protótipos para o desenho de novas drogas, em patologias humanas (Lewis e Garcia, 2005).

Trabalhos mostram que moléculas caracterizadas primeiramente em venenos animais apresentam similaridades estruturais e funcionais com as moléculas constitutivas de outras espécies animais, incluindo os mamíferos. As sarafotoxinas, por exemplo, são peptídeos encontrados no veneno da serpente *Atractaspis engaddensi* e similares às endotelinas humanas, onde ambas compõem uma superfamília formada por 21 peptídeos com alta similaridade estrutural e funcional. Ambas afetam a contração dos músculos cardíaco e liso em vários tecidos de espécies de vertebrados (Ducancel et al., 1993). Com isso, é possível concluir que a busca por peptídeos com potencial farmacêutico é válida, seja pela similaridade, seja pela seletividade de interação com moléculas humanas específicas.

A ação inibitória de peptídeos sobre peptidases é clássica. As peptidases participam em diversos mecanismos fisiológicos, como a digestão, crescimento, resposta imunológica, reparo tecidual e apoptose (Leung et al., 2000). Contudo, um desequilíbrio na atividade proteolítica, seja positiva ou negativa, pode desencadear patologias severas. Por exemplo, sabe-se que em tumores, as metalopeptidases, em especial MMP-2 e MMP-9, atuam na clivagem de componentes da matriz, desencadeando a angiogênese (Bauvois, 2012). Outro exemplo é o Captopril, um fármaco inibidor de enzima conversora de angiotensina I, que age no combate a hipertensão arterial, onde o seu desenvolvimento pela Squibb® teve como base a estrutura primária de um peptídeo descoberto no veneno da *Bothrops jararaca* (Smith e Vane, 2003). Por conta deste e de outros exemplos, este trabalho buscou peptídeos moduladores da atividade peptidásica na fração de baixa massa molecular do veneno de *Tityus serrulatus*.

Para o estudo de novos peptídeos foram utilizadas oligopeptidases como ferramenta para captura de pequenas moléculas. Como já descrito na introdução, as oligopeptidases são enzimas que interagem apenas com pequenas moléculas, ou oligopeptídeos, sendo uma estratégia biotecnológica de seleção de novos peptídeos. Pelos resultados apresentados, é possível dizer que a técnica foi bem sucedida, tendo em vista que foram determinadas ao menos cinco sequências peptídicas ainda não descritas no veneno de *Tityus serrulatus*.

A secreção das oligopeptidases EP 24.15 e EP 24.16 é ainda obscura. Acredita-se que estas enzimas são encontradas somente intracelularmente, participando no processamento de neuropeptídios e de modelagem de peptídeos expressos para MHC de classe I (Portaro et al., 1999) principalmente pelo fato de não apresentarem peptídeo sinal, responsável pelo transporte via canais secretores comuns. Contudo, como visto na introdução, estudos recentes mostram a secreção de EP 24.15 mediada por cálcio, sendo observada em ensaios celulares (Cunha et al., 2009; Russo et al., 2009). Apesar disso, considerando que as oligopeptidases são principalmente intracelulares, é difícil estabelecer relação entre os efeitos do envenenamento relacionados com as oligopeptidases e, portanto, neste presente trabalho, foram utilizadas como ferramentas de seleção de novos peptídeos.

A fração P proveniente da separação por membrana de corte molecular, comportando peptídeos menores que 10 kDa, apresentou 15 subfrações quando analisada em HPLC, sendo que ao menos três (P6, P12 e P13) inibiram mais de 40% da atividade de EP24.15 e EP24.16. As subfrações foram reanalisadas em corridas lentas, de acordo com a propriedade individual, e seus picos foram coletados e submetidos a novo ensaio enzimático. Curiosamente, P6-2 demonstrou inibição mais potente (100%), seguido pelas frações P13-1 e P13-2, com cerca de 70% de inibição de thimet oligopeptidase. Por este motivo, essas três frações foram submetidas para análises em espectrometria de massas.

Os resultados demonstraram a presença de um pentapeptídeo ($K^1E^2X^3X^4G^5$, onde X= isoleucina ou leucina) em P6-2, cuja sequência trazia resíduos não identificáveis, pois esta metodologia não é capaz de diferenciar aminoácidos de mesma massa, como a leucina e a isoleucina (113 Da). A busca por moléculas semelhantes em banco de dados nos levou ao conhecimento que esta sequência é similar à região do própeptídeo de uma toxina ativa em canal de potássio (β -KTx) já descrita em venenos de várias espécies do gênero *Tityus* (Tabela 12). A região do própeptídeo é considerada responsável pela inativação da uma proteína ou peptídeo a que está acoplado, prevenindo de uma ativação precoce (Alberts, 2002). Desta forma, a presença do fragmento KEXLG sugere um diferente processamento deste própeptídeo, além de possivelmente significar que este é um precursor de ao menos duas moléculas ativas, e não somente de β -KTx. Com a comparação das sequências, foi possível concluir que o quarto resíduo é conservado em todas as espécies, sendo então $K^1E^2X^3L^4G^5$, como mostrado na Tabela 12. Com isso, foram sintetizados os dois possíveis peptídeos: $K^1E^2I^3L^4G^5$ e $K^1E^2L^3L^4G^5$. A análise dos peptídeos RP-HPLC com o perfil do pool peptídico permitiu a conclusão de que KEILG é o fragmento presente no VTs. Além disso, foi demonstrado ser um inibidor de EP24.15 mais eficiente que KEILG, apresentando $K_i=16 \mu M$. Diferentemente do esperado, tanto KELLG como KEILG se mostraram específicos para a thimet oligopeptidase, uma vez que não foram capazes de inibir a atividade da homóloga neurolisina.

Tabela 12. Presença do peptídeo KEILG e seu similares em região de pró peptídeo no veneno de escorpiões do gênero *Tityus*.

Espécie	Sequência	Fonte
<i>Tityus discrepans</i>	GKG <u>KEVLG</u> KIKNKLVE	Diego-Garcia et al., 2007
<i>Tityus trivittatus</i>	GKG <u>KEVLG</u> KIKDKLIE	Diego-Garcia et al., 2007
<i>Tityus serrulatus</i>	GKG <u>KEILG</u> KIKEKLIEA	Rates et al., 2010
<i>Tityus cambridgei</i>	EKG <u>KEILG</u> KI...	Batista et al., 2004

Ainda em relação à fração P6-2, os peptídeos YLPT (tirosina-leucina-prolina-treonina) e FTR (fenilalanina-tirosina-arginina) mostraram semelhança com neuropeptídeos encontrados em insetos. É importante ressaltar que outros peptídeos foram encontrados, porém estes foram selecionados por atenderem melhor a proposta do presente trabalho.

A sequência YLPT é correspondente à proctolina com a ausência de uma arginina no N-terminal (des-Arg proctolina). Vale ressaltar que a proctolina tem sido alvo de vários estudos e apenas descrita em insetos, sendo inédita a descrição de sua presença em venenos animais. A proctolina foi o primeiro neuropeptídeo descrito e isolado de insetos, sendo amplamente estudada devido ao potencial como protótipo de inseticidas graças a sua atividade miotrópica (Lange e Orchard, 2006). Estudos de farmacodinâmica em besouros tenébrio (*Tenebrio molitor*) demonstraram que altas doses de proctolina (5-10 μ M) promovem paralisação imediata em músculos ligados ao sistema nervoso autonômico, sendo caracterizada por ausência de atividade muscular por horas, não envolvendo o coração (Slama et al., 1993).

A significância de cada aminoácido para os efeitos causados pela proctolina já foi estudada. Muitos autores acreditam que a arginina seja essencial para uma maior efetividade da atividade miotrópica, provavelmente por que a interação mais intensa com os receptores necessita de dois aminoácidos polares no N-terminal (Konopinska e Rosinski, 1999). Ainda segundo Konopinska e Rosinski, (1999), em estudos utilizando ratos, a proctolina é capaz de se ligar a receptores opióides promovendo hipertensão significativa e atividade antinocioceptiva, porém quando alterado o primeiro resíduo, essas atividades não são observadas. Apesar disto, foi demonstrado que a ausência de

Arg¹ pode facilitar a ligação da proctolina em seus receptores: um estudo de ligação da proctolina em receptores localizados em nas membranas de ovidutos de gafanhotos (*Locusta migratoria*) demonstrou potencialização de ligação específica proctolina-receptor quando previamente incubada com YLPT, sendo mais eficiente que met-enkefalina, met-enkefalina-RF e leu-enkefalina em certas doses (Puirox et al., 1992).

Assim, é possível dizer que a des-arg proctolina encontrada neste trabalho pode ter função fisiológica em insetos, sendo por ação direta ou por aumentar afinidade da proctolina por seus receptores específicos. De qualquer maneira, a presença deste peptídeo no veneno de *Tityus serrulatus* indica relação a sua alimentação, tendo em vista que a dieta de escorpiões incluem insetos, em especial, baratas, onde uma molécula símile a proctolina agiria na imobilização das presas, facilitando a predação.

Em paralelo, novas funções podem estar atreladas ao peptídeo YLPT, pois este foi capaz de inibir *in vitro* as oligopeptidases EP24.15 e EP24.16, com constante de inibição de 74 µM e 36 µM, respectivamente.

Finalizando as sequências determinadas na subfração P6-2, foi encontrado o tripeptídeo FTR. Esta sequência mostra similaridade entre o fragmento N-terminal do neuropeptídeo de invertebrados FTRFamida (**Phe-Thr-Arg-Phe-NH₂**), o qual foi descrito primeiramente em poliquetas *Nereis diversicolor*, sendo um peptídeo semelhante à FMRFamida (Barrate et al., 1991). Os neuropeptídeos de insetos FMRFamida e símiles são conhecidos principalmente pela atividade cardio-estimulatória, modulando ainda contração muscular e atuando como um sinalizador antagonista opioide. Em mamíferos, também foi observada atividade estimulatória cardiovascular, além de inibir a liberação de insulina e somatostatina e participar de processos relacionados ao sistema nervoso (Roszer e Banfalvi, 2012).

Estipular semelhanças entre efeitos atrelados a FMRFamida e ao peptídeo encontrado devem ser executadas com cautela, pois a variação do segundo resíduo (Met ao invés de Thr) e a presença de outra fenilalanina na posição 4 podem interferir significativamente nos efeitos. Diferentemente do ocorrido com o caso da proctolina/des-arg proctolina, até o momento não existe um estudo abordando a importância de cada aminoácido nos efeitos observados pelo FMRFamida. Contudo, a interação do FTR com oligopeptidases indica atividade ainda não descrita, a qual deve ser

posteriormente explorada por meio de ensaios *in vivo* utilizando insetos, verificando assim uma possível relação deste tripeptídeo com sistema nervoso de artrópodes.

A análise dos peptídeos presentes nas subfrações P13-1 e P13-2 pelo software Mascot revelou a presença de sequências maiores que puderam ser submetidas a busca pela ferramenta BLAST.

Apesar de não ter sido efetiva como inibidor de oligopeptidases, o achado das hipotensinas com esta metodologia foi interessante para o trabalho. A hipotensina de sequência AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA apresentou 100% de similaridade com aquela descrita na análise peptidômica do veneno de *T. serrulatus* pelo grupo de trabalho de Adriano Pimenta (Verano-Braga et al., 2008). Focando na funcionalidade, é provável que esta ação seja importante para que a presa possa sofrer com os efeitos da queda de pressão, como observado no quadro clínico de envenenamento, segundo Chippaux e Goyfroon (2008), onde a vítima apresenta um quadro de hipotensão. Analisando os principais animais predados pelo escorpião amarelo, como insetos e pequenas lagartixas, é possível deduzir que os efeitos da hipotensina podem ser muito mais expressivos nesses seres do que em seres humanos, principalmente devido ao tamanho reduzido do corpo. A alteração no bombeamento sanguíneo e/ou de hemolinfa pode favorecer a predação por *T. serrulatus*.

Além da hipotensina denominada como TsHpt I, também foi selecionada a Hipotensina_[1-19] – AEIDFSGIPEDIKQIKET – ainda inédita na literatura. Ou seja, segundo as análises feitas em BLAST, este é um fragmento N-terminal de uma das TsHpt, porém até o presente momento, esta sequência exata não havia sido encontrada e, portanto, não há publicações relacionadas a esta. A TsHpt_[1-19] foi selecionada para ser sintetizada por apresentar número reduzido de aminoácidos, compatível para interação com as oligopeptidases. Além disso, o fragmento 1-19 é inédito, o que indica que testes de atividade biológica são necessários para a confirmação da ação hipotensiva, sendo previstos na continuidade deste trabalho.

Em adição ao novo fragmento de Hipotensina 1-19, também foi observada a presença do peptídeo AEPAAPAAAEEPEP na fração P13-1, que é idêntica a descrita pela análise peptidômica realizada por Rates *et al* (2008). Os autores relatam a existência de uma família de fragmentos PAPE, onde a sequência tetrapeptídica Pro-

Ala-Pro-Glu (PAPE) se repete em *tandem*. Esses peptídeos foram primeiramente descritos por Batista et al. (2007), sendo também encontrados no proteoma de *T. stigmurus*, testados em ensaios de eletrofisiologia e não demonstrando atividade sobre canais iônicos e, por conta disto, são considerados como peptídeos não tóxicos. Contudo, é curioso pensar que a presença destes peptídeos é constante em ao menos duas espécies de *Tityus*, e que são os componentes do veneno expressos mais abundantes no veneno de *Tityus serrulatus*, superando as neurotoxinas de canais de sódio (Alvarenga et al., 2012), possam ser “não tóxicos”. Ainda, o fragmento PAPE demonstrou potencial como inibidor da EP24.16 ($K_i=77 \mu\text{M}$) e EP24.15 ($K_i=58 \mu\text{M}$), sugerindo que esta família de peptídeos possua um papel no envenenamento muito mais significativo do que se é considerado atualmente. Esses componentes podem apresentar atividades importantes, seja atuando em insetos, principal alvo, ou seja para sua defesa, observado no envenenamento humano. Com isso, nosso grupo futuramente investigará a atividade do fragmento encontrado em processos de inflamação em leucócitos de ratos e realizará ensaios de atividade sobre sistemas fisiológicos de insetos (grilos).

6. Conclusões

A partir dos resultados e análises feitos ao longo do trabalho, é possível concluir que:

-Foi observada somente atividade de metalopeptidases sobre os substratos testados (Abz-GGLFRRV-EDDnp e dinorfina 1-13), onde a melhor atividade detectada foi em pH básico, a 37°C, sendo modulada positivamente por cátions monovalentes, em especial o sódio, e negativamente por magnésio;

-Este trabalho evidenciou a atividade de pelo menos duas metalopeptidases no veneno de *Tityus serrulatus*, uma vez que foram semi purificadas duas subfrações (G02 e G10) que agem de maneira diferente nos substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp e dinorfina 1-13;

-As oligopeptidases foram utilizadas como ferramentas para a seleção de novos peptídeos, sendo uma técnica bem sucedida, pois cinco novos peptídeos foram selecionados. Os resultados referentes aos mecanismos e constante de inibição podem ser úteis para estudos bioquímicos de EP24.15 e EP24.16, em especial KELLG e KEILG por serem capazes de diferenciar as oligopeptidases, o que é inédito na literatura.

-Utilizando técnicas de purificação e *screening* de atividade das oligopeptidases, foram purificados e encontrados peptídeos já descritos no veneno de *Tityus serrulatus*, como os fragmentos PAPE, a hipotensina_[1-19] e a hipotensina íntegra, além de peptídeos conhecidos porém não descritos no veneno do escorpião amarelo, como KEILG, YLPT e FTR;

-Como observado no estudo de diferenciação dos pentapeptídeos KELLG e KEILG, pode-se dizer que a posição e presença dos aminoácidos são criticamente importantes para suas ações, considerando principalmente a divergência do mecanismo de inibição pela troca de aminoácidos;

- Os peptídeos YLPT e FTR são similares a neuropeptídeos de insetos ligados a atividade muscular, sendo que a presença destas duas novas moléculas indica uma possível participação na alimentação dos escorpiões amarelos;

Perspectivas futuras

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho geraram novas questões referentes aos componentes do VTs. Para o projeto de Doutorado, será abordado somente o estudo de atividade peptidásica do veneno, sendo que esta tese de Mestrado será subsídio para se determinar novos substratos e metodologias.

A partir disso, testaremos diferentes peptídeos biologicamente ativos como substrato para as peptidases do VTs, podendo revelar possíveis novas classes catalíticas presentes ou confirmar a presença de somente metalopeptidases, como demonstrado nesse trabalho e indicado pela análise transcriptômica de *Tityus serrulatus*.

A metodologia de purificação das metalopeptidases será alterada, uma vez que a técnica empregada neste trabalho não foi capaz de obter as enzimas puras. Após a purificação plena, as amostras serão sequenciadas por espectrometria de massas. Tendo suas estruturas caracterizadas, novos ensaios bioquímicos serão realizados (como K_m e K_{cat}) através de análises cinéticas, a fim de se determinar as especificidades primárias das peptidases. Por fim, ensaios *in vivo* deverão ser realizados com a finalidade de testar o efeito das peptidases purificadas *in vitro*.

7. Artigos Gerados

Neste tópico estão descritos breves resumos de dois artigos publicados, utilizando dados gerados e apresentados nesta tese.

7.1 – Anexo I: **Carvalho DC**, Duzzi B, Kuniyoshi AK, Fioramonte M, Gozzo FC, Melo RL, Tambourgi DV, Rioli V, Portaro FC. **Insights into scorpion venom peptides: Alternative processing of β -KTx propeptide from *Tityus serrulatus* venom results in a new naturally occurring thimet oligopeptidase inhibitor**. Peptides. 2013 feb; 40(1) 30–33. doi: 10.1016/j.peptides.2012.11.019.

Os dados referentes aos estudos com os pentapeptídeos KEILG e KELLG, inibidores específicos de EP24.15 selecionados a partir do veneno de *Tityus serrulatus*, foram utilizados para a confecção desta *short communication*. O artigo descreve a purificação, sequenciamento e síntese dos pentapeptídeos, bem como o método utilizado para a distinção dos mesmos, a fim de se determinar a sequência correta presente no VTs. Os mecanismos e constantes de inibições sobre as oligopeptidases EP24.15 e EP24.16 também estão descritos.

7.2- Anexo II: Venancio EJ, Portaro FC, Kuniyoshi AK, **Carvalho DC**, Pidde-Queiroz G, Tambourgi DV. **Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralization potential of therapeutical antivenoms**. Toxicon. 2013 Mar 15. pii: S0041-0101(13)00082-2. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.02.012. [Epub ahead of print]

A descoberta da atividade degradadora de dinorfina1-13 e liberadora de outro peptídeo biologicamente ativo (leu-encefalina), descrita nesta presente tese, contribuiu com o projeto de pós-doutoramento do Dr. Emerson Jose Venancio, sob supervisão da Dra. Denise Tambourgi. Neste trabalho, foi verificado que os venenos dos escorpiões *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus* também apresentam a atividade liberadora de leu-encefalina por metalopeptidases e que os soros comerciais produzidos pelo Instituto Butantan (soros antiescorpiônico e antiaracnido) são capazes de bloquear apenas parcialmente esta atividade, mesmo quando utilizados em altas doses. Nesta publicação, os experimentos realizados não puderam detectar atividade de serinopeptidases e fosfolipases, sendo que a atividade enzimática se baseia principalmente por ação de hialuronidases e metalopeptidases.

8. Referências Bibliográficas

1. Acker GR, Molineaux C, Orłowski M. Synaptosomal membrane-bound form of endopeptidase-24.15 generates Leu-enkephalin from dynorphin1-8, alpha- and beta-neoendorphin, and Met-enkephalin from Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8. *J Neurochem.* 1987 Jan;48(1):284-92.
2. Araujo MC, Melo RI, Del Nery E, Alves MF, Juliano MA, Casarini DE, Juliano L, et al. Internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme. *J Hypertens.* 1999 Maio;17(5):665-72.
3. Atherton E, Sheppard RC. *Solid phase peptide synthesis: a practical approach.* Oxford: Information Press Ltd, 1989
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula.* 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
5. Almeida FM, Pimenta AM, De Figueiredo SG, Santoro MM, Martin-Eauclaire MF, Diniz CR et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon.* 2002 Jul;40(7):1041-5.
6. Almeida DD, Scortecci KC, Kobashi LS, Agnez-Lima LF, Medeiros SRB, Silva-Junior A, et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC genomics.* 2012 Jan;13:362.
7. Alvarenga ER, Mendes TM, Magalhães BF, Siqueira FF, Dantas AE, Barroca TM, Horta CC, Kalapothakis E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics.* 2012;02(04):210–20;

8. Batista CVF, del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, Wanke E, et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2004 Apr 15;803(1):55–66.
9. Batista CV, Román-González SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gómez-Lagunas F, Possani LD. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007 Jul-Aug;146(1-2):147-57.
10. Baratte B, Gras-Masse H, Ricart G, Bulet P, Dhainaut-Courtois N. Isolation and characterization of authentic Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ and the novel Phe-Thr-Arg-Phe-NH₂ peptide from *Nereis diversicolor*. *Eur J Biochem*. 1991 Jun 15;198(3):627-33.
11. Barrett AJ, Rawlings ND. 'Species' of peptidases. *Biol Chem*. Nov;388(11):1151-7. 2007. Pág 387.
12. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):29-36.
13. Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. 1997 Jun;35(6):821-35.
14. Bertazzi DT. Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento. Tese de mestrado. FCFRP- USP, Ribeirão Preto 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-02122008-163136/publico/Tese.pdf>
15. Berti DA, Morano C, Russo LC, Castro LM, Cunha FM, Zhang X, et al. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human

- embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 2009 May 22;284(21):14105-16. doi: 10.1074/jbc.M807916200.
16. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 1993 Sep 27;331(1-2):134-40.
 17. Bortoluzzi LR, Querol MVM, Querol E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul. *BrasilBiota Neotrop.* 7 (2007), pp. 357–359.
 18. Brazil TK, Lira-da-Silva RM, Porto TJ, Amorim AM, Silva TF. Escorpiões de importância médica do estado da Bahia, Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*; 2009 cited 2011 Dec 16];79(1):38–42.
 19. Cândido DM. 1999. Escorpiões. Em: Joly CA, Bicudo CEM. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 25-34. Disponível: <http://www.biota.org.br/pdf/v5cap03.pdf>
 20. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 2000 Apr;26(1):13-25
 21. Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon.* 2007 Feb;49(2):124-41.
 22. Cao ZY, Mi ZM, Cheng GF, Shen WQ, Xiao X, Liu XM, Liang XT, et al. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensi* Karch. *J Pept Res.* 2004 Jul;64(1):33-41.
 23. Chagas JR, Juliano L, Prado ES. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal Biochem.* 1991 Feb 1;192(2):419-25.

24. Chippaux, J.P.; Goyffon, M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 2008 Aug;107(2):71-9.
25. Cologna CT, Marcussi S, Giglio JR, Soares AM, Arantes EC. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein and peptide letters.* 2009 Jan;16(8):920–32.
26. Cunha FM, Berti DA, Ferreira ZS, Klitzke CF, Markus RP, Ferro ES. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *J Biol Chem.* 2008 Sep 5;283(36):24448-59. doi: 10.1074/jbc.M801252200.
27. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):4135-44.
28. Diego-García E, Schwartz EF, D'Suze G, González S a R, Batista CVF, García BI, et al. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of “orphan” components. *Peptides.* 2007 Jan;28(1):31–7.
29. Ducancel F, Matre V, Dupont C, Lajeunesse E, Wollberg Z, Bdolah A, et al. A. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization. *J Biol Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3052-5.
30. Eder J, Fersht AR. Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol Microbiol.* 1995 May;16(4):609-14.
31. Fletcher PL, Fletcher MD, Weninger K, Anderson TE, Martin BM. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10):7405-16. doi: 10.1074/jbc.M109.028365.

32. Freire-Maia L, Campos JA. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: Ownby, C. L. & Odell, G. V. Natural Toxins. Oxford. Pergamon Press, 1989. p. 139-159
33. Fontenele-Neto JD, Massarelli EE, Gurgel Garrido PA, Beaudet A, Ferro ES. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. *J Comp Neurol.* 2001 Oct 1;438(4):399-410.
34. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde. 2001 2ª ed. – Brasília. 120p. Disponível em: http://www.ivb.rj.gov.br/palestras/manu_peconhentos.pdf
35. Gomis-Rüth FX. Structure and mechanism of metallo-carboxypeptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2008 Sep-Oct;43(5):319-45. doi: 10.1080/10409230802376375 .
36. Gwee MC, Nirathanan S, Khoo HE, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Cheah LS. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002 Sep;29(9):795-801.
37. Hauser KF, Aldrich JV, Anderson KJ, Bakalkin G, Christie M, Hall ED, et al. Pathobiology of dynorphins in trauma and disease. *Front Biosci* 2005;10:216–35.
38. Inyushkin AN. Effects of leucine-enkephalin on potassium currents in neurons in the rat respiratory center in vitro. *Neurosci Behav Physiol.* 2007 Sep;37(7):739-46.
39. Jan LY, Jan YN. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annual review of neuroscience.* 1997 Jan;20(Hille 1992):91–123.
40. Konopińska D, Rosiński G. Proctolin, an insect neuropeptide. *J. Pept. Sci.*, 1999, 5, 533-546.

41. Kuniyoshi AK, Rocha M, Cajado Carvalho D, Juliano MA, Juliano Neto L, Tambourgi DV, et al. Angiotensin-degrading serine peptidase: A new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology . 2011 Nov 10;59(1):124–31.
42. Lange AB, Orchard I. Proctolin in insects. In: *The handbook of biologically active peptides*. Elsevier Publishers, 2006 New York. pp. 177–181.
43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5
44. Leung D, Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem*. 2000 Feb 10;43(3):305-41.
45. Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews. Drug discovery*. 2003;2(10):790–802.
46. Lira-Da-Silva RM, Amorim AM, Carvalho FM, Brazil TK. Acidentes por escorpiões na cidade de Salvador, Bahia, Brasil (1982 – 2000). *Gaz. méd. Bahia* 2009;79 (Supl.1):43-49
47. Lourenço W R, Cloudsley-Thompson JL. Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae). *The Journal of Arachnology*. v. 27, p. 154-158. 1999.
48. Matos IMD, Rocha A, Leite R. Lung Oedema induced by *Tityus serrulatus* venom in the rat scorpion. *Science*. 1997;118(2):143–8.
49. Morgenstern D, Rohde BH, King GF, Tal T, Sher D, Zlotkin E: The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon* 2011, 57:695–703.

50. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde. Brasília; 2009.
51. Nelson DL, Cox M. Lehninger – Princípios De Bioquímica. 3Ed. São Paulo: Sarvier, 2002
52. Neurath H. Proteolytic enzymes, past and future. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 Sep 28;96(20):10962–3.
53. Nicklin MJ, Barrett AJ. Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cystatin. *Biochem J.* 1984 Oct 1;223(1):245-53.
54. Oliveira Js, Campos Ja, Costa Dm. Acidentes por animais peçonhentos na infância. *J. Pediatr (Rio de J)* 1999; 75 Suppl 2:S251-8
55. Pimenta AMC, De Lima ME. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society.* 2005 Nov 11(11):670–6.
56. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem.* 1999 Sep;264(2):287-300.
57. Portaro FC, Gomes MD, Cabrera A, Fernandes BL, Silva CL, Ferro ES, et al. Thimet oligopeptidase and the stability of MHC class I epitopes in macrophage cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Feb 24;255(3):596-601.
58. Puiroux J, Pedelaborde A, Loughton GB. Characterization of proctolin binding sites on locust oviduct membranes *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 22, Issue 8, December 1992, Pages 859–865

59. Quinton L, Gilles N, Smargiasso N, Kiehne A, De Pauw E. An unusual family of glycosylated peptides isolated from *Dendroaspis angusticeps* venom and characterized by combination of collision induced and electron transfer dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2011 Nov;22(11):1891–7.
60. Rates B, Ferraz KKF, Borges MH, Richardson M, De Lima ME, Pimenta AMC. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2008 Oct ;52(5):611–8.
61. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40, D343-D350
62. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*. 1993 Feb 15;290 (Pt 1):205-18.
63. Ray K, Hines CS, Coll-Rodriguez J, Rodgers DW. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *The Journal of biological chemistry*. 2004 May 7;279(19):20480–9.
64. Rioli V, Kato A, Portaro FC, Cury GK, te Kaat K, Vincent B, Checler F, et al. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 8;250(1):5-11.
65. Röszer T, Bánfalvi G. FMRFamide-related peptides: anti-opiate transmitters acting in apoptosis. *Peptides*. 2012 Mar;34(1):177-85.
66. Rupert EE, Fox R, Barnes RD. *Zoologia dos Invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva*. 2005. 7ª ed. São Paulo: Ed. Roca Ltda. Pg 579

67. Russo LC, Goñi CN, Castro LM, Asega AF, Camargo ACM, Trujillo C, et al. Interaction with calmodulin is important for the secretion of thimet oligopeptidase following stimulation. *The FEBS journal*. 2009 Aug ;276(16):4358–71.
68. Salzet M. Neuroimmunology of opioids from invertebrates to human. *Neuroendocrinology letters*. 2001 Dec;22(6):467–74.
69. Sandoval MR, Lebrun I. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathologic studies. *Brain Res Bull*. 2003 Dec 15;62(2):165-72.
70. Scholtz G, Kamenz C. The book lungs of Scorpiones and Tetrapulmonata (Chelicerata, Arachnida): evidence for homology and a single terrestrialisation event of a common arachnid ancestor. *Zoology (Jena, Germany)*. 2006 Jan;109(1):2–13.
71. Slama K, Konopińska D, Sobótka W. Effects of proctolin on autonomic physiological functions in insects. *Eur. J. Entomol.*, 1993, 90, 23-25.
72. Shrimpton CN. Soluble Metalloendopeptidases and Neuroendocrine Signaling. *Endocrine Reviews*. 2002 Oct 1;23(5):647–64.
73. Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocr Rev*. 2002 Oct;23(5):647-64.
74. Smith CG, Vane JR. The Discovery of Captopril. *The FASEB Journal*. 2003;17:788-789
75. Soares MRM, Azevedo CS, Maria M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Rev. da Soc. Bras. de Méd.Trop. Uberaba MG – Brasil*, 35(4):359-363. 2002.
76. Suzuki M, Morita T, Iwamoto T. Diversity of Cl(-) channels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* . 2006 Jan ;63(1):12–24.

77. Tan NH, Ponnudurai G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol C*. 1992 Oct;103(2):299-302.
78. Tashima AK, Zelanis A, Kitano ES, Ianzer D, Melo RL, Rioli V, et al. Peptidomics of three Bothrops snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Nov;11(11):1245-62. doi: 10.1074/mcp.M112.019331.
79. Teixeira C.E, Bento, A.C, Lopes-Martins, R.A, Teixeira, S.A, Von Eickestedt, V, Muscará, M.N, et al. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitreergic nerve fibres. *Br. J. Pharmacol.* 123 (1998), pp. 435–442
80. Torres JB, Marques MGB, Martini RKE, Borges CVA. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Rev. Saúde Pública*; 2002 36(5):631-3.
81. Tyler-McMahon BM, Boules M, Richelson E. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regulatory peptides*. 2000 Sep 25;93(1-3):125–36.
82. Verano-Braga T, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE, et al. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Jul 4; 371(3):515–20.
83. Verano-Braga T, Figueiredo-Rezende F, Melo MN, Lautner RQ, Gomes ERM, Mata-Machado LT, et al. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. *Toxicon*. 2010 Dec 15;56(7):1162–71.

84. Wang H, Ehnert C, Brenner GJ, Woolf, CJ. Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol Chem*. 2006 Jan;387(1):11-4.
85. Wu XS, Jian XC, Yin B, He ZJ. Development of the research on the application of chlorotoxin in imaging diagnostics and targeted therapies for tumors. *Chin J Cancer* 2010;29(6):626–30.
86. Yamakage M, Namiki A. Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Canadian journal of anesthesia*. 2002 Feb;49(2):151–64.
87. Zhijian C, Yun X, Chao D, Shunyi Z, Shijin Y, Yingliang W, et al. Cloning and characterization of a novel calcium channel toxin-like gene BmCa1 from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch. *Peptides*. 2006 Jun;27(6):1235–40.

ANEXO I



Short communication

Insights into scorpion venom peptides: Alternative processing of β -KTx propeptide from *Tityus serrulatus* venom results in a new naturally occurring thimet oligopeptidase inhibitor

Daniela Cajado Carvalho^{a,1}, Bruno Duzzi^{b,1}, Alexandre Kazuo Kuniyoshi^a, Mariana Fioramonte^c, Fábio Cesar Gozzo^c, Robson L. Melo^b, Denise Vilarinho Tambourgi^a, Vanessa Rioli^b, Fernanda Calheta Portaro^{a,*}

^a Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

^b Special Laboratory of Applied Toxinology, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil

^c Chemistry Institute, State University of Campinas, 13083-970, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2012

Received in revised form

30 November 2012

Accepted 30 November 2012

Available online 8 December 2012

ABSTRACT

Most functions attributed to *Tityus serrulatus* venom (TsV) are related to active molecules on ion-channels; however, here we describe a new pentapeptide that was discovered through enzymatic assay selection using EP24.15. The primary structure analysis revealed the sequence KEXXG (X means Ile or Leu), similar to the sequence present in the β -KTx propeptide described from the venom of *Tityus* spp. We confirmed through HPLC analysis that KEILG is the peptide present in TsV, but that KELLG also inhibits EP24.15 although through different mechanisms.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Since 2007, scorpionism is the major cause of human envenomation by animals in Brazil, surpassing accidents with snakes and spiders [4]. Most of the critical clinical cases are attributed to *Tityus serrulatus* scorpions, result of its wide proliferation in the urban centers and in the potential of its venom to induce severe clinical manifestations, being even fatal among children and elders. *T. serrulatus* venom (TsV) contains neurotoxins capable of interacting with the nervous system via ion channels and, because of that, research studies focus on neurotoxins descriptions and their mechanisms of action. Moreover, the presence of other compounds such as hyaluronidases, peptidases and biologically active peptides in TsV are poorly explored [6].

Animal venoms are a rich source of bioactive peptides due the large number and diversity of venomous species, and it is estimated that more than 40 million toxins may exist but only 0.01% were identified [15]. Furthermore, it is known that small peptides are poorly explored because of difficulties in their isolation and characterization, and also because, frequently, small peptides are represented in very low concentrations in the venom of arthropods [14]. Fortunately, the identification of molecules using mass

spectrometry analysis is helping to characterize these neglected molecules and change the current scenario [14,15].

Through natural selection, scorpion venoms molecules were conserved to act upon certain physiological mechanisms which are shared by a great variety of organisms, including human beings. Therefore, it is probable that compounds like scorpion venom peptides can be prototypes for the development of new drugs. For example, the chlorotoxin (CTX) from the scorpion *Leiurus quinquestriatus* was first described as a chloride toxin [8], but nowadays it has been shown to be effective against the human glioma brain tumor via inhibition of the MMP-2, an important metallopeptidase over-expressed by tumor cells [22]. This fact suggests that novelties are still to be discovered, including new functions for already known molecules.

Thimet oligopeptidase (EP24.15) belongs to the M3 family metallopeptidase [13] and was first described as a neuropeptide-degrading enzyme present in the soluble fraction of brain homogenates [12]. The EP24.15 does not have a clear primary specificity to cleave substrates, with the ability to accommodate different amino acid residues at subsites S4 to S3' [11]. In fact, EP24.15 shows substrate size restriction to peptides containing from 5 to 17 amino acids because of its catalytic center, located in a deep channel [17]. These features of EP24.15 were decisive in successfully describing two new peptides: the human hemopressin [19] and a potent inhibitor of ACE in the venom of *Bothrops jararacussu* [20]. Considering the property of EP24.15 to select small molecules and its presence in the nervous system, where the TsV

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3726 7222; fax: +55 11 3726 7222.

E-mail address: fcvportaro@butantan.gov.br (F.C. Portaro).

¹ These authors contributed equally to this research study.

mainly acts, the objective of this study was to find in TsV new bioactive peptides selected by interaction with EP24.15 activity *in vitro*.

2. Material and methods

2.1. Peptide Pool preparation and initial fractionation

The lyophilized TsV, provided by Butantan Institute, São Paulo, Brazil, was suspended in sodium acetate pH 4.0 and immediately fractionated at 4 °C using a 10 kDa molecular weight cut off membrane (Millipore), in order to prevent proteolytic cleavage of peptides by the crude venom. The filtrated solution (Peptide Pool) was subjected to reverse phase HPLC (Prominence, Shimadzu), using a Shim-pack VP-ODS C-18 column (4.6 × 150 mm); 0.1% TFA in water (solvent A), and acetonitrile plus solvent A (9:1) as solvent B. The chromatography was performed at a flow rate of 1 mL/min and detected by ultraviolet absorption (214 nm). The peaks were collected manually, dried and subjected to enzymatic assays.

2.2. EP24.15 enzymatic activity screening

The recombinant EP24.15 was obtained as described [18]. The peptidase assay was conducted in a 50 mM phosphate and 20 mM NaCl 7.4 pH buffer containing β-mercaptoethanol (1 mM) and the substrate QFS (10 μM), in a final volume of 100 μL. The reactions occurred at 37 °C and were initiated by the addition of EP24.15 (7.5 ng), being monitored (λ_{EM} 420 nm and λ_{EX} 320 nm) in a spectrofluorophotometer (Victor 3™ Perkin–Elmer), as described [20]. The results were obtained in triplicate.

2.3. Peptide isolation and mass spectrometry analysis

The single peptide fraction containing inhibitory peptides was purified sequentially in the RP-HPLC system described above, but with a slower gradient (1.25% B/min), until reaching the pure peptide, and then subjected to mass spectrometric analyses. The peptide was analyzed by LC-MS/MS on a Synapt G1 mass spectrometer (Waters Co.). The peptide was resuspended in water and 2–5 μL injected onto a Symmetry C18 trapping column (180 μm × 20 mm, Waters). The sample was desalted for 15 min and the trapped peptide was then separated by elution with a water/acetonitrile 0.1% formic acid gradient through a BEH 130 – C18 column (100 μm × 100 mm, Waters), as previously described [3]. Data was acquired in data-dependent mode and the peptide dissociated by collisions with argon. The assays conditions included a flow rate of 600 nL/min, nanoflow capillary voltage of 3.5 kV, block temperature of 100 °C, and cone voltage of 100 V. The MS spectrum was analyzed manually from the ESI-MS/MS product ion mass spectra as previously described [19].

2.4. Peptide synthesis and identification of peptide in Peptide Pool

The peptides KEILG and KELLG were synthesized [1] with a purity grade greater than 95%. With the aim of determining which peptide sequence was present in the venom, it was performed a RP-HPLC analysis as described above of a peptide mixture containing 20 μL of venom Peptide Pool, with 40 μM of KEILG and 40 μM of KELLG. This mixture was compared to the original Peptide Pool profile.

2.5. Determination of the inhibition constant (K_i)

The K_i was determined using seven concentrations of QFS and two concentrations of KELLG and KEILG peptides, maintaining the same EP24.15 concentration. Controls without the peptides were

also performed. The assay was carried out as described before. In order to analyze the mechanism of inhibition for both peptides, an Eadie–Hofstee plot was constructed and, based on the type of mechanism, the K_i was calculated as described [21].

3. Results

After verifying the Peptide Pool inhibitory efficiency upon the QFS hydrolysis by EP24.15, the first step of purification using a C-18 reverse-phase was performed. Fourteen peptide peaks were obtained and submitted to peptidase screening, reaching a single one responsible for the inhibitory effect. This peak was submitted to the same purification method described before, but using a slower gradient, resulting in three new peaks, yet only one inhibited EP24.15 activity. For this reason, it was submitted to LC-MS/MS analyses, revealing the pentapeptide KEXXG (Fig. 1, panel A), where X could represent isoleucine/leucine. Two peptides were synthesized, KELLG and KEILG, to observe its performance at RP-HPLC and inhibition analyses. The retention time (%ACN) range on RP-HPLC between both peptides was around 1 min, indicating a differentiation based on hydrophobicity. After this, a Peptide Pool mixture containing both peptides as well as a control profile of Peptide Pool without treatment were prepared, as shown in Fig. 1 (panel B). We observed that KEILG was already present in the control sample, while KELLG had no match, changing the profile when compared with the Peptide Pool. Considering this, we concluded that the KEILG fragment was the sequence present in the venom. After RP-HPLC differentiation, the mechanisms and inhibition constants for both peptides upon EP24.15 activity were determined. It is worth noting that both peptides were not hydrolyzed by EP24.15 even after a long period of incubation using bradykinin as a positive control (data not shown). As shown in Fig. 2, different mechanisms of inhibition were found: while KELLG is a competitive inhibitor ($K_i = 84 \mu\text{M}$), KEILG acts through an uncompetitive mechanism ($K_i = 16 \mu\text{M}$). In addition, assays with an EP24.15 homologue, neurolysin (EC 3.4.24.16; EP24.16) were made, however, unexpectedly, this peptidase was not blocked by any of the two peptides (data not shown).

4. Discussion

Recently, the study of small peptides has gained importance through the scientific community and, in this context, our aim was to study bioactive peptides from TsV. Animal venoms peptides have a natural stability and a high selectivity, being preserved during evolution, which may suggest a functional importance in the venom. In addition, the pharmacologic potential of these molecules has attracted the attention of pharmaceutical industries to the development of new drugs, as previously occurred with other venom molecules [10].

Due to the obtainment methodology used here, we successfully purified a peptide of only five residues ($\text{K}^1\text{E}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{G}^5$, whereas X = Leu/Ile). However, we faced a challenge due to the mass spectrometry technique employed here that could not determine the correct amino acid at the indicated positions, since Leu and Ile are indistinguishable because both are characterized by a 113 Da mass in the MS/MS spectrum.

During our data analysis we noticed a similarity between $\text{K}^1\text{E}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{G}^5$ and the propeptide regions of potassium channel toxins (β-KTx) described for *Tityus* species. All known sequences had a Leucine in the P4 position, showing to be a conserved residue among species. On the other hand, the residue in the P3 position was reported as Valine, in the GKGKEVLGKIK fragment [9] and also as Isoleucine, in the EKGKEILGKI fragment for *T. cambridgei* [2]. It is important to note that these results were obtained based on Edman

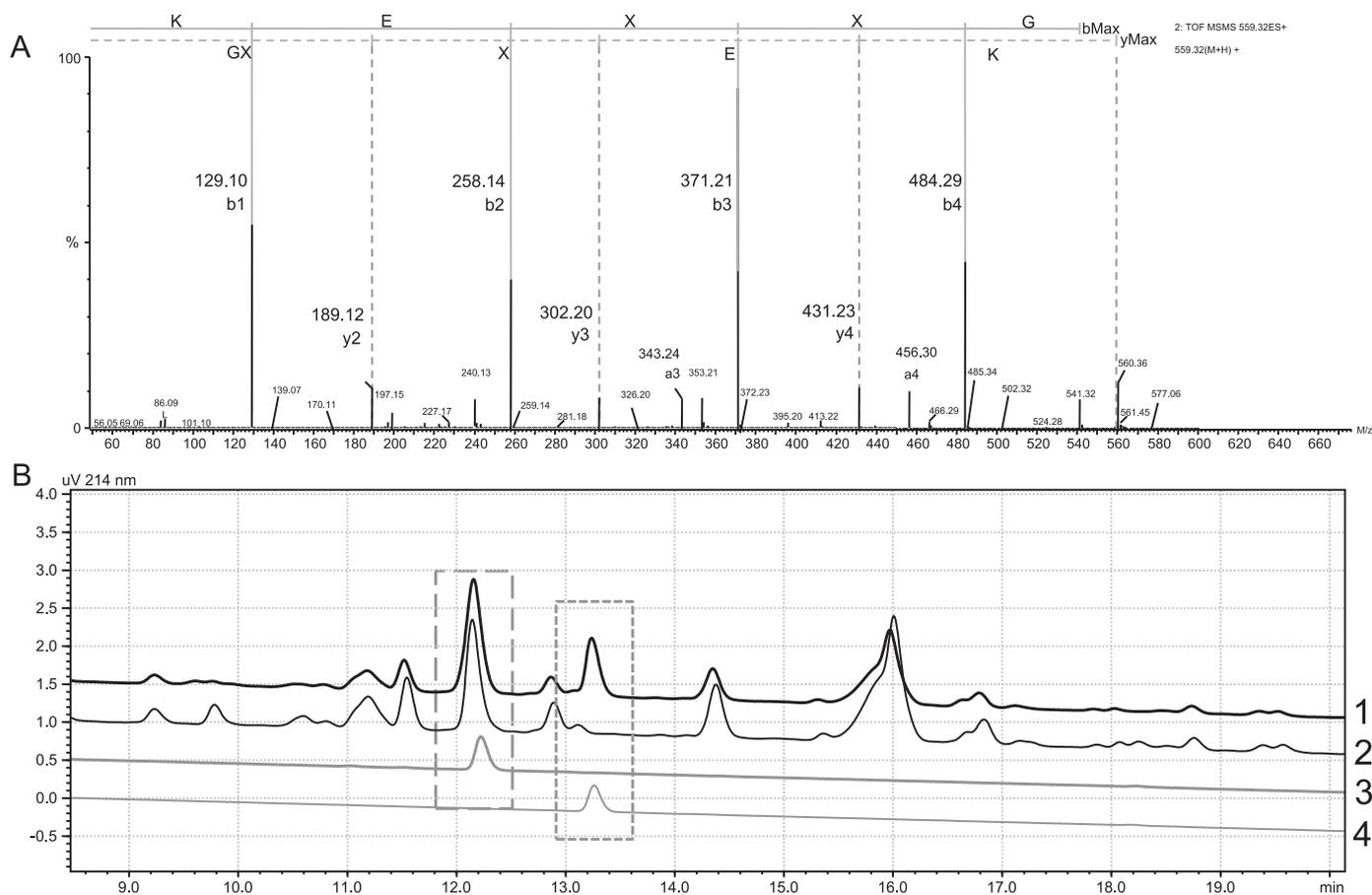


Fig. 1. (A) Representative peptide sequencing by LC–MS/MS and (B) RT–HPLC profiles: (1) 20 μ L of Peptide Pool from *T. serrulatus* venom with 40 μ M KEILG and 40 μ M KELLG; (2) 20 μ L of Peptide Pool without treatment; (3) 20 μ M KEILG; (4) 20 μ M KELLG. The analytical procedure was carried out using 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A), and acetonitrile and solvent A (9:1) as solvent B. The separations were performed at a flow rate of 1 mL/min using a Shim-pack VP-ODS C-18 column (4.6 \times 150 mm) with a gradient of 1.25% B/min, and elution was followed by ultraviolet absorption (214 nm).

sequencing or by mRNA level. Regarding TsV, there is a description, by homology level, of the peptide GKGKEILGKIKE (β -KTx propeptide fragment) using mass spectrometric analysis [16].

After the peptides identification assay in HPLC, we concluded that KEILG was present in the venom, which corresponds to the reported sequence of the β -KTx propeptide from TsV [16]. In

general, the proposed propeptide function is to prevent activity of the mature molecule, however other physiological functions are not well characterized. Therewith, we show here that a fraction of the β -KTx propeptide is present on the venom and have an important activity in vitro. Considering it, we suggest that β -KTx propeptide is a precursor of bioactive molecules not only for β -KTx

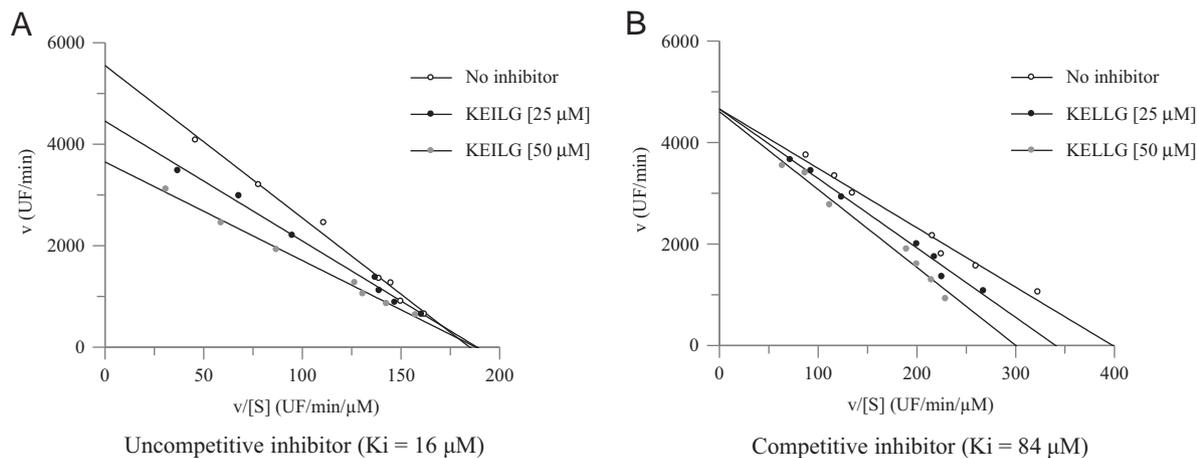


Fig. 2. Eadie–Hofstee plot for Thimet oligopeptidase (EP24.15) in the presence of peptides KEILG (A) and KELLG (B). The graph indicates that KELLG is a competitive inhibitor, while KEILG is an uncompetitive inhibitor. The inhibition constants (K_i) were determined using four concentrations of the substrate QFS (4 μ M, 6 μ M, 8 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M and 40 μ M), and a variation of KELLG and KEILG peptides concentration (25 μ M and 50 μ M), maintaining the same quantity of thimet oligopeptidase (7.5 ng) and a control experiment (without the peptides). The experiments were made in triplicate.

but also for the small peptide KEILG. It is important to emphasize that KEILG is certainly a new naturally occurring peptide of TsV and not a degradation product of β -KTx propeptide, since the TsV has a low peptidase activity [6] and, moreover, we took preventive measures to avoid degradation of the peptides in the venom, as previously described here in Section 2.1.

The determinations of the inhibition mechanisms of synthetic peptides upon EP24.15 show different interactions, as well distinct K_i values. The interference of KEILG in enzyme–substrate complex could be a result of the isoleucine amino acid affinity to the enzyme after conformational changes in the oligopeptidase during its binding with the substrate, which is consistent with the observations that simple amino acid substitutions can change the scissile bond on substrates [5] or get resistance to its hydrolyses [11], specifically for EP24.15. The same hypothesis could explain the KELLG inhibition mechanism, which only binds in the free peptidase, leading us to believe that the amino acid in position P3 is crucial to determine the interaction of this sequence with EP24.15. In addition, none of the two peptides could inhibit EP24.16 (data not show). We found this result to be very exciting, since they are members of clan MA, sharing substrates and inhibitors and, until now, no natural peptide described had differentiated EP24.15 and EP24.16 [7,11,19].

5. Conclusion

In summary, the discovery of this peptide suggests a different processing mechanism for the β -KTx, since KEILG is a portion of its propeptide and shows in vitro activity, emphasizing the importance of the study of arthropods venom small peptides. In addition, we described a new naturally occurring peptide from TsV, KEILG, capable of reducing EP24.15 activity in vitro, which may be an important tool in further biochemical studies since it is capable of differentiate the oligopeptidases EP24.15 and EP24.16. The possible KEILG activity in vivo is under investigation in our laboratories.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Dr. Emer S. Ferro for critical reading this manuscript. This study was supported by FAPESP, INCTTOX and CNPQ.

References

- [1] Atherton E, Sheppard RC. Solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford: Information Press Ltd.; 1989.
- [2] Batista CV, del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, Wanke E, et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci 2004;803(1):55–66.
- [3] Berti DA, Morano C, Russo LC, Castro LM, Cunha FM, Zhang X, et al. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem 2009;284(21):14105–16.
- [4] Bortoluzzi LR, Querol MVM, Querol E. Notes on the occurrence of *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) in the Western areas of Rio Grande do Sul, Brazil. Biota Neotrop 2007;7:357–9.
- [5] Camargo AC, Gomes MD, Reichl AP, Ferro ES, Jacchieri S, Hirata IY, et al. Structural features that make oligopeptides susceptible substrates for hydrolysis by recombinant thimet oligopeptidase. Biochem J 1997;324(Pt 2):517–22.
- [6] Cologna CT, Marcussi S, Giglio JR, Soares AM, Arantes EC. Tityus serrulatus scorpion venom and toxins: an overview. Protein Pept Lett 2009;16:920–32.
- [7] Dauch P, Vincent J-P, Checler F. Specific inhibition of endopeptidase 24.16 by dipeptides. Eur J Biochem 1991;202:269–76.
- [8] DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. Am J Physiol 1993;264(2 Pt 1):C361–9.
- [9] Diego-García E, Schwartz EF, D'suze G, González SA, Batista CV, García BI, et al. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of orphan components. Peptides 2007;28:31–7.
- [10] Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. Nat Rev Drug Discov 2003;10:790–802.
- [11] Oliveira V, Campos M, Melo RL, Ferro ES, Camargo AC, Juliano MA, et al. Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-peptidases. Biochemistry 2001;40(14):4417–25.
- [12] Orłowski M, Michaud C, Chu TG. A soluble metalloendopeptidase from rat brain: purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. Eur J Biochem 1983;135(1):81–8.
- [13] Pierotti A, Dong KW, Glucksman MJ, Orłowski M, Roberts JL. Molecular cloning and primary structure of rat testes metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. Biochemistry 1990;29(45):10323–9.
- [14] Pimenta AM, De Lima ME. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. J Pept Sci 2005;11:670–6.
- [15] Quinton L, Gilles N, Smargiasso N, Kiehne A, De Pauw E. An unusual family of glycosylated peptides isolated from *Dendroaspis angusticeps* venom and characterized by combination of collision induced and electron transfer dissociation. J Am Soc Mass Spectrom 2011;22(11):1891–7.
- [16] Rates B, Ferraz KK, Borges MH, Richardson M, De Lima ME, Pimenta AM. Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. Toxicon 2008;52(5):611–8.
- [17] Ray K, Hines CS, Coll-Rodríguez J, Rodgers DW. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition: regulation, and localization. J Biol Chem 2004;279(19):20480–9.
- [18] Rioli V, Kato A, Portaro FC, Cury GK, te Kaat K, Vincent B, et al. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. Biochem Biophys Res Commun 1998;250(1):5–11.
- [19] Rioli V, Gozzo FC, Heimann AS, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem 2003;7:8547–55.
- [20] Rioli V, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Klitzke CF, Ferro ES, et al. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. FEBS J 2008;275(10):2442–54.
- [21] Segel IH. Enzyme kinetics. New York: Wiley; 1975. p. 100–59.
- [22] Wu XS, Jian XC, Yin B, He ZJ. Development of the research on the application of chlorotoxin in imaging diagnostics and targeted therapies for tumors. Chin J Cancer 2010;29(6):626–30.

ANEXO II



Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms



Emerson J. Venancio^{a,b}, Fernanda C.V. Portaro^b, Alexandre K. Kuniyoshi^b, Daniela Cajado Carvalho^b, Giselle Piddé-Queiroz^b, Denise V. Tambourgi^{b,*}

^a Immunology Laboratory, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^b Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2012

Received in revised form 23 January 2013

Accepted 19 February 2013

Available online 15 March 2013

Keywords:

Scorpion venom

Tityus spp.

Metalloproteinases

Dynorphin 1-13

Leu-enkephalin

Antivenoms

ABSTRACT

Tityus scorpion stings are an important public health problem in Brazil, where the incidence of such stings exceeds the incidence of the health problems caused by other venomous animals, including snakes. In this study, we have analysed specific enzymatic activities of the venom from the Brazilian scorpions of *Tityus* genus, i.e., *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. The data presented here revealed that *Tityus* spp. venoms exhibited significant hyaluronidase activity but no phospholipase activity. All the venom samples exhibited the ability to hydrolyse Abz-FLRRV-EDDnp and dynorphin 1-13 substrates. These activities were inhibited by 1,10-phenanthroline but not by PMSF, indicating the presence of metalloproteinases in the *Tityus* spp. venoms. The venom peptidase activity on Abz-FLRRV-EDDnp and on dynorphin 1-13 was partially inhibited by therapeutic Brazilian anti-scorpion and anti-arachnidic antivenoms. Dynorphin 1-13 (YGGFLR-RIRPKLK) contains two scissile bonds between the residues Leu-Arg and Arg-Arg that are susceptible to cleavage by the *Tityus* venom metalloproteinase(s). Their cleavage releases leu-enkephalin, an important bioactive peptide. The detection of metalloproteinase(s) with specificity for both dynorphin 1-13 degradation and leu-enkephalin releasing can be important for the mechanistic understanding of hypotension and bradycardia induction in cases of scorpion stings, whereas hyaluronidases might contribute to the diffusion of the toxins present in these venoms. Furthermore, the limited inhibition of the toxic enzymatic activities by commercial antivenoms illustrates the necessity of improvements in current antivenom preparation.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Scorpionism is a major public health threat in Brazil, where scorpion-related accidents far outnumber those of other venomous animals, including snakes. Data provided by the Information System (SINAN, *Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação*) of the Brazilian Ministry of Health show that from January 2007 to December 2011, there were 235,892 cases of scorpionism in Brazil and 414 deaths. The actual number of accidents is likely underestimated, as most of these accidents are not

Abbreviations: BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; BSA, bovine serum albumin; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; EDTA, ethylene diamine tetracetic acid; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FRET, fluorescent resonance energy transfer substrate; IgG (GAH/HRP), goat anti-horse IgG labelled with horseradish peroxidase; IgG (GAH/AP), goat anti-horse IgG labelled with alkaline phosphatase; NBT, nitroblue tetrazolium; OPD, ortho-phenylenediamine; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride.

* Corresponding author.

E-mail addresses: dvtambourgi@butantan.gov.br, dvtambourgi@yahoo.com (D.V. Tambourgi).

severe and do not require antivenom (Ministério da Saúde, 2001). In recent years, there has been an increase in the number of scorpions accidents that is likely attributed to the ability of certain species to adapt to densely populated areas, resulting in uncontrolled population growth within cities (Soares et al., 2002). Furthermore, the combination of high temperatures and humidity increases the incident rate during the summer months, when scorpions become more active (Barbosa et al., 2012). Currently, approximately 70% of scorpionism cases occur within urban areas, in or around residences. Scorpion accidents occur more in individuals between 20 and 49 years of age. However, the largest proportion of deaths is observed in individuals younger than 14 years of age (Ministério da Saúde, 2001).

Symptoms resulting from scorpion stings are variable and can be grouped into three stages depending on the severity of the poisoning. In most cases, the initial envenomation is benign and reaches stage I, which is characterised by intense pain in most cases (stage Ia), as well as stirring, fever, sweating, nausea and blood pressure fluctuation (Stage Ib). Severe cases progress from Stage I to Stage II (5–10% of cases), which is characterised by sweating, vomiting, cramps, diarrhoea, hypotension, bradycardia, pulmonary obstruction and dyspnoea. The last and most dangerous stage is Stage III, which is characterised by respiratory complications such as pulmonary oedema, bronchospasm, and cyanosis and can be associated with hyperthermia, cardiac arrhythmia and myocardial ischemia (Chippaux and Goyffon, 2008). The severity of scorpion envenomation is much greater in children but varies with the scorpion species, age, and size (Amitai, 1998). The treatment of scorpion accidents involve symptomatic measures, support of vital functions, and, in severe cases, serum therapy.

The genus *Tityus* contains the largest number of scorpion species. Over 60% of scorpions found in tropical and subtropical regions belong to this genus (Ministério da Saúde, 2001). In Brazil, the three *Tityus* species *Tityus serrulatus* (yellow scorpion), *Tityus bahiensis* (brown scorpion), and *Tityus stigmurus* are the main causes of scorpionism in humans (Bucaretschi et al., 1995; Eickstedt et al., 1996).

Tityus serrulatus is the Brazilian scorpion that causes the most serious accidents, with mortality rates of approximately 1% among children and the elderly. This species is widely distributed throughout the country, reaching the states of São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Paraná and Rio de Janeiro (Ministério da Saúde, 2001). One of the factors contributing to its proliferation and distribution is the ability to reproduce by parthenogenesis (Lourenço, 2008) which complicates the control of these arachnids.

T. stigmurus is another scorpion species of clinical relevance, which is also capable of parthenogenesis and is distributed predominantly in the northeastern region of the country. Studies conducted between 1990 and 1995 in the state of Bahia, Brazil, have shown that *T. stigmurus* as the main cause of scorpionism within the region (Lira-da-Silva et al., 2000). However, due to the lack of information, the actual epidemiological impact of these incidents of scorpionism within these localities remains relatively obscure.

Unlike the species mentioned above, *T. bahiensis* exhibits crossbreeding, which requires encounters between

males and females during certain periods of the year. This scorpion can be found in the states of São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul and Santa Catarina (Porto et al., 2010).

Scorpion venom is a complex mixture of components that can be separated into an insoluble, generally non-toxic, fraction and a soluble fraction containing toxic peptides that exhibit activity on ion channels, in addition to mucopolysaccharides, nucleotides, vasoactive amines (serotonin or histamine), protease inhibitors and enzymes (Gazarian et al., 2005; Rodríguez de la Vega et al., 2010). In general, it is believed that the toxic activity of scorpion venom is predominantly attributed to the presence of peptides that disrupt Na^+ , K^+ , Ca^+ and Cl^- channels in neuronal cells (Possani et al., 2000). Recent studies have shown that apart from these peptides, several molecules that play a role in scorpion poisoning or that exhibit properties of biotechnological interest are also present in scorpion venoms (Wu et al., 2010; Zeng et al., 2012; Zhao et al., 2011).

The specific treatment for *Tityus* envenomation is the intravenous administration of heterologous antivenoms. Recently, a double-blind study evaluating the effectiveness of the serum therapy in the treatment of children who were stung by scorpions and admitted to intensive care units showed that the specific F(ab')_2 antivenom is extremely effective in reversing the symptoms of poisoning, reducing the use of sedation and of circulating levels of venom (Boyer et al., 2009). In contrast, other studies have found no significant benefit in the administration of antivenom to patients stung by scorpions (Abroug et al., 1999). There is evidence that the antivenom is ineffective in the treatment of severe cardiovascular manifestations due to the involvement of the autonomic nervous system in the aetiology of these manifestations (Amaral and Rezende, 2000).

In Brazil, the following two therapeutic scorpion antivenoms are produced by the Butantan Institute: 1) an anti-arachnidic antivenom, which is obtained by the immunisation of horses with a mixture of venoms derived from *T. serrulatus* (57%), *Phoneutria nigriventris* (21.5%) and *Loxosceles gaucho* (21.5%), and 2) an anti-scorpionic antivenom, which is obtained by the immunisation of horses with a mixture of venoms derived from *T. serrulatus* (50%) and *T. bahiensis* (50%). Based on the potential diversity of composition and toxicity of *Tityus* spp. venoms, the therapeutic antivenoms might insufficiently recognise the major components of distinct venom species occurring throughout the country. Therefore, the aim of this study was to characterise the enzymatic properties of venoms derived from *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* and to evaluate their antigenic cross-reactivity using the Brazilian antivenoms, as well as to test the ability of these antivenoms to neutralise the enzymatic activities of these venoms.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Triton X-100, Tween-20, bovine serum albumin (BSA), ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), ortho-phenylenediamine (OPD), hyaluronic acid, 1,10-phenanthroline, phenylmethanesulfonyl

fluoride (PMSF), L- α -phosphatidylcholine, dynorphin 1-13 (YGGFLRRIRPKLK) and goat anti-horse (GAH) IgG labelled with horseradish peroxidase (IgG-HRP) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Goat anti-horse (GAH) IgG labelled with alkaline phosphatase (IgG-AP), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) were purchased from Promega Corp. (Madison, WI, USA). The fluorescent resonance energy transfer (FRET) substrate Abz-F-L-R-R-V-EDDnp was synthesised and purified as previously described by Araújo et al. (2000).

2.2. Venoms

Venoms derived from *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* were provided by the Butantan Institute, SP, Brazil. Stock solutions were prepared in PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl; pH 7.2) at 1.0 mg/mL.

2.3. Hyperimmune sera

The anti-scorpionic and the anti-arachnidic antivenoms were obtained from *Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes*, Butantan Institute, SP, Brazil. The anti-scorpionic (batch n° 0905104/A) and the anti-arachnidic (batch n° 0905100/A) antivenoms contained protein concentrations of 8.87 g/dL and 11.77 g/dL, respectively. Anti-tetanus horse serum (batch n° 0907138/B; protein concentration of 8.19 g/dL), which was provided by the Butantan Institute, was used in this study as a negative control.

2.4. Electrophoresis and western blotting

Samples of *Tityus* spp. venoms (15 μ g) were solubilised in reducing or non-reducing sample buffers and were separated using 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The gels were silver stained or blotted onto nitrocellulose (Towbin et al., 1979). After transfer, the membranes were blocked with PBS containing 5% BSA and incubated with the horse antivenoms (1:5000) for 1 h at room temperature. Immunoreactive proteins were detected using GAH/IgG-AP (1:7500) in PBS/1% BSA for 1 h at room temperature. After 3 washes for 10 min each with PBS/0.05% Tween-20, blots were developed using NBT/BCIP according to the manufacturer's protocols (Promega).

2.5. ELISA

Microtitre plates were coated with 100 μ L of *Tityus* spp. venoms (10 μ g/mL; overnight at 4 °C). The plates were blocked with 5% BSA in PBS, and dilutions of the sera added. After 1 h of incubation at room temperature, the plates were washed with PBS/0.05% Tween-20 and incubated with specific anti-IgG antibodies conjugated with HRP (1:20,000) for 1 h at room temperature. The plates were washed and the reactions were developed using the OPD substrate according to the manufacturers' protocols (Sigma–Aldrich). The absorbance was measured using an ELISA reader (Multiskan spectrophotometer EX, Labsystems, Finland) at λ 492 nm. The titre was established as the highest antiserum dilution that produced an absorbance

three times greater than that produced by the negative control anti-tetanus serum.

2.6. Phospholipase A₂ activity

The phospholipase A₂ activity of *Tityus* spp. venoms was evaluated as described by Price (2007), with some modifications. Microtitre plates were coated with venom samples (30 μ g) combined with buffer (10 mM Triton X-100, 5 mM phosphatidylcholine, 10 mM CaCl₂, 0.9% NaCl, 0.03% bromothymol blue; pH 7.5) to a final volume of 200 μ L. The activities were determined by measuring the OD at λ 620 nm using a spectrophotometer (Multiskan EX, Labsystems, Finland). As positive and negative controls, venom derived from *Crotalus durissus terrificus* (10 μ g) and PBS was used, respectively. The phospholipase activity was expressed in nanomoles of HCl per minute per mg of venom (nmoles/min/mg) of three independent experiments.

2.7. Hyaluronidase activity

Hyaluronidase activity was measured as described previously by Pukrittayakamee et al. (1988), with slight modifications. Microtitre plates were coated with samples of *Tityus* spp. venoms (30 μ g), 20 μ L of the hyaluronic acid substrate (0.5 mg/mL) and acetate buffer (0.2 M sodium acetate–acetic acid, pH 6.0, containing 0.15 M NaCl) in a final volume of 100 μ L. The mixtures were incubated for 15 min at 37 °C. After incubation, 200 μ L of CTAB 2.5% in NaOH 2% was added to the samples. The absorbance was measured at λ 405 nm using a spectrophotometer (Multiskan EX, Labsystems, Finland) against a blank containing 100 μ L of acetate buffer and 200 μ L of CTAB. All of the assays were performed in duplicate. The turbidity-reducing activity was expressed as a percentage of the remaining hyaluronic acid, relative to the absorbance of the well in which venom was omitted. The results were expressed in units of turbidity reduction (UTR) per mg of venom.

2.8. Proteolytic activity

2.8.1. Fluorescent resonance energy transfer assays

The enzymatic activity of the *Tityus* spp. venoms was determined using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate peptide Abz-FLRRV-EDDnp. Venom samples (2 μ g of protein) were mixed with 5 μ M of FRET substrate, in cold phosphate-buffered saline (PBS). The pH studies were performed in 50 mM sodium citrate buffer (pH 3.0–5.3), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.2–7.5) and 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.3–10) containing 20 mM NaCl (Ribeiro-Guimarães et al., 2009). The relative inhibition was determined in parallel using 5 mM PMSF or 5 mM 1,10-phenanthroline, inhibitors of serine- or metalloproteinases, respectively. The stock solutions and the working concentrations of the synthetic inhibitors used in the characterisation of the proteolytic activities exhibited by the venom samples were assessed as described (Beynon and Bond, 2001).

The reactions were monitored by measuring hydrolysis using a fluorimeter (Victor 3™, Perkin–Elmer, MA, USA) and 96-well microtitre plates (λ_{em} 420 nm and λ_{ex} 320 nm) at

37 °C, as described previously by Araújo et al. (2000). Control samples were prepared in the presence of an equal volume of ethanol, which was also used in the inhibitor stock solutions. All the assays were performed in duplicate, and the specific proteolytic activities were expressed as units of free fluorescence of the cleaved substrates per min per µg of extract (UF/min/µg).

2.8.2. Gelatinase activity

The gelatinase activity of the *Tityus* spp. venom samples was analysed by zymography (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994). The samples of scorpion venom (30 µg) were subjected to electrophoresis under non-reducing conditions on a 10% polyacrylamide gel containing 1% gelatine. The gels were washed twice for 30 min at room temperature in 2.5% Triton X-100 and incubated overnight at 37 °C in zymography buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Brij-35; pH 8.5). The gels were stained with Coomassie blue (40% methanol, 10% acetic acid, and 0.1% Coomassie Brilliant Blue).

2.8.3. HPLC assays

Samples of *Tityus* spp. venom (2.0 µg) were incubated with dynorphin 1-13 (YGGFLRRIRPKLK – 31 µM) in PBS buffer pH 8.5 at 37 °C for 15 min. Hydrolytic products were separated using reverse-phase HPLC (Prominence, Shimadzu) at 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, as solvent A, and acetonitrile and solvent A (9:1), as solvent B. The separations were performed at a flow rate of 1 mL/min using a Shim-pack VP-ODS C-18 column (4.6 × 150 mm) and a 20–60% gradient of solvent B over 20 min. In all cases, elution was followed by the measurement of ultraviolet absorption (214 nm). The scissile bonds contained within the peptides were determined by mass spectrometric analyses. The peptide fragments were detected by scanning from 100 *m/z* to 1300 *m/z* using an Esquire 3000 Plus Ion trap Mass Spectrometer with ESI and esquire CONTROL software (Bruker Daltonics, MA, USA). Purified ¹⁸O-labelled or unlabelled oxidised W derivatives were dissolved in a mixture of 0.01% formic acid:acetonitrile (1:1) and infused into the mass spectrometer (via direct infusion pump) at a flow rate of 240 mL/h. The skimmer voltage of the capillary was 40 kV, the dry gas was maintained at 5.0 L/min, and the source temperature was maintained at 300 °C.

2.9. Serum neutralisation assays performed in vitro

The ability of the antivenoms to neutralise the proteolytic activity of the venom samples was estimated as previously described (Queiroz et al., 2008; Kuniyoshi et al., 2012). Briefly, samples of *Tityus* spp. venoms (2.0 µg) were incubated at room temperature in the presence or absence of increasing amounts of antivenoms for 30 min. After incubation, the residual proteolytic activity of the venom samples was measured as described above (Sections 2.8.1 and 2.8.3).

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Analysis of

variance, ANOVA, was performed, followed by a Bonferroni post-hoc test, to assess the statistical significance of the differences between groups.

3. Results

3.1. Electrophoretic characterisation of *Tityus* spp. venoms

Venoms samples were prepared in PBS and analysed for protein composition on SDS-PAGE under both reducing and non-reducing conditions. Fig. 1 shows that the *Tityus* spp. venoms, when analysed under non-reducing condition, present components with relative molecular masses (*Mr*) of 26–50 kDa. Under reducing conditions, we observed a change in the electrophoretic profiles, where the molecules were distributed into two major groups exhibiting either a *Mr* of 37–50 kDa or a lower *Mr*, below 19 kDa. A comparison of the electrophoretic profiles revealed that the *Tityus* spp. venoms exhibit some similarities in band profiles.

3.2. The enzymatic activities of the *Tityus* spp. venoms

To assess whether the *Tityus* spp. venoms exhibited the same biological activities, we performed specific functional assays.

The phospholipase A₂ activity of the venom samples was assessed using a colorimetric method after incubating 30-µg samples of the venoms with phosphatidylcholine, the substrate of the reaction. Under these experimental conditions, the *Tityus* spp. venoms exhibited no phospholipase activity (data not shown).

The hyaluronidase activity was measured by incubating samples of the *Tityus* spp. venoms (30 µg) with hyaluronic acid, the substrate of the reaction. Fig. 2 shows that all venoms exhibited significant hyaluronidase activity. Venom from *T. serrulatus* and *T. bahiensis* demonstrated increased activity compared to venom from *T. stigmurus*.

The proteolytic activity of the *Tityus* spp. venoms was tested using a FRET substrate, Abz-FLRRV-EDDnp. Fig. 3 shows that all of the venoms demonstrated sufficient activity to cleave this substrate, with optimal hydrolysis efficiency at pH 8.5 and 10. Under these conditions, *T. bahiensis* venom exhibited higher proteolytic activity than the *T. serrulatus* and *T. stigmurus* venoms. Furthermore, the observed proteolytic activity was completely inhibited by the metalloproteinase inhibitor, 1,10-phenanthroline but not by PMSF, an inhibitor of serine proteases (Fig. 4). However, gelatinolytic activity, as measured by zymography, was not detected in any of the three *Tityus* spp. venoms analysed in this study (data not shown).

Taking into account the amino acid sequence of the substrate Abz-FLRRV-EDDnp that was hydrolysed by the metalloproteinases present in the three *Tityus* spp., we decided to investigate the proteolytic activity of the venom samples on the biologically active peptide dynorphin 1-13 (YGGFLRRIRPKLLK) using HPLC. Table 1 shows that *T. bahiensis* venom exhibits a higher specific activity over dynorphin 1-13 (1.74 nM/min/µg) compared to *T. serrulatus* (0.67 nM/min/µg) and *T. stigmurus* (0.12 nM/min/µg)

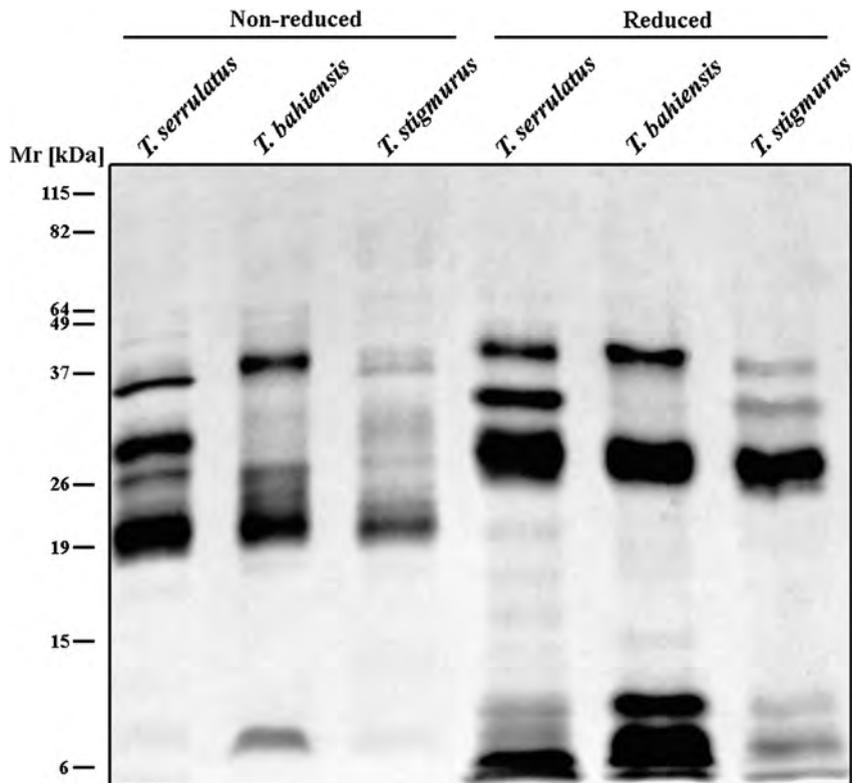


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Samples of *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* venoms (15 μ g) were analysed by SDS-PAGE (12%) in both non-reducing and reducing conditions and were subsequently silver-stained.

venoms. Moreover, mass spectrometric analysis revealed that after treatment with *Tityus* spp. venoms, dynorphin 1–13 exhibits two scissile bonds between the Leu-Arg and Arg-Arg residues, thus producing another biologically active peptide, leu-enkephalin (YGGFL).

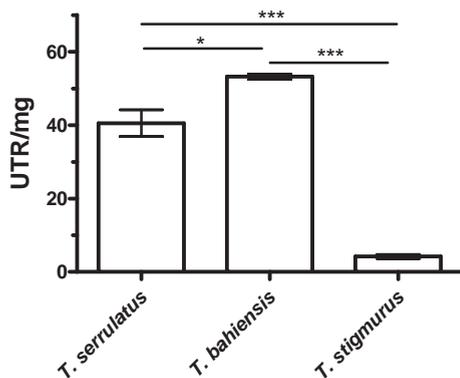


Fig. 2. The determination of hyaluronidase activity. Samples of *Tityus* spp. venoms (30 μ g) were incubated for 15 min at 37 °C in the presence of hyaluronic acid as substrate. After incubation, cetyltrimethylammonium bromide was added to develop each reaction, and the resulting absorbance was measured using a spectrophotometer at λ_{em} 405 nm. The results are representative for three independent experiments and are expressed in units of turbidity reduction (UTR) per mg of venom. * $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

3.3. Immunochemical cross-reactivity of the *Tityus* spp. venoms

Anti-scorpionic and anti-arachnidic antivenoms were tested for cross-reactivity by ELISA using the *Tityus* spp. venoms as antigens. Fig. 5A shows that both antivenoms were able to interact with components of the three *Tityus* spp. venoms, although the anti-scorpionic antivenom exhibited higher affinities for all the tested venoms than the anti-arachnidic antivenom. Moreover, the former antivenom was more efficient in interacting with components from the *T. serrulatus* and *T. bahiensis* compared to the *T. stigmurus* venom.

Using western blotting analysis (Fig. 5B), we demonstrated that both antivenoms could detect several components present in the *Tityus* spp. venoms. Nonetheless, the antigenic recognition exhibited by the anti-scorpionic antivenom was higher than that of the anti-arachnidic antivenom, confirming the data obtained in ELISA (Fig. 5A).

3.4. In vitro antivenom neutralisation assays

We next performed *in vitro* assays to determine whether the Brazilian scorpion antivenoms could neutralise the proteolytic activities exhibited by the *Tityus* spp. venoms. Fig. 6 shows that both antivenoms were able to partially inhibit the proteolytic activity of all of the venoms on the FRET substrate. However, more efficient proteolytic

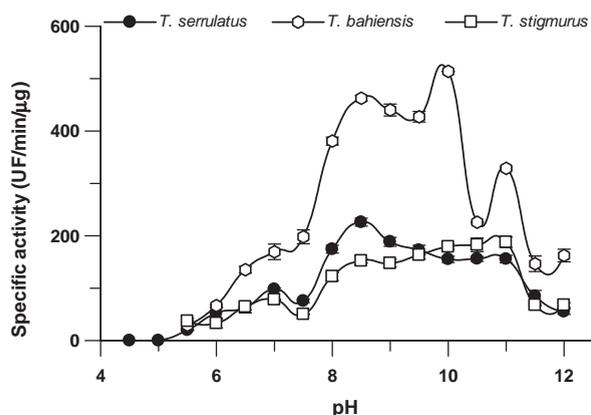


Fig. 3. The determination of proteolytic activity. Samples of *Tityus* spp. venoms (2 μ g) were incubated at 37 °C with 5 μ M of the FRET substrate, Abz-FLRRV-EDDnp, at pHs ranging from 4.5 to 12. The reactions were monitored by fluorescence (λ_{em} 420 nm and λ_{ex} 320 nm) using a spectrofluorimeter at 37 °C. The hydrolysis was expressed as units of free fluorescence per minute per μ g of venom (UF/min/ μ g). The results are representative for three independent experiments.

inhibition was observed when the protein concentration of the anti-scorpionic and the anti-arachnidic antivenoms was 140-fold higher than the concentration of the venoms used. When the scorpionic and arachnidic antivenoms were applied in only 70-fold excess, the proteolytic activity of the *Tityus* spp. venom samples was reduced to a lesser degree, and *T. serrulatus* venom demonstrated the lowest degree inhibition (~20%). The *T. bahiensis* proteolytic activity was the most inhibited by the two antivenoms at the two indicated concentrations.

The ability of the antivenoms to neutralise the *Tityus* spp. venoms proteolytic activity on dynorphin 1-13 was evaluated. Fig. 7A shows that *T. serrulatus* venom was able to neutralise the proteolytic activity by approximately 40%, but only with a 210-fold excess of the anti-scorpionic antivenom. For the *T. bahiensis* venom, both antivenoms at all of the concentrations used were able to neutralise the proteolytic activity of the venom samples to some extent. The anti-scorpionic antivenom was efficient when applied in a 210-fold excess (Fig. 7B). Both antivenoms were ineffective in neutralising the *T. stigmurus* venom; only when applied at a 210-fold excess was the anti-scorpionic antivenom slightly more effective at blocking the proteolytic activity from this venom when compared with the anti-arachnidic serum (Fig. 7C).

4. Discussion

Scorpion venom is a complex mixture of molecules, many of which play a role in its toxic effect. Studies have suggested that there are over 100,000 different toxins produced by scorpions, only a few of which have been characterised thus far (Possani et al., 1999). Improved analysis of the biological activities of *Tityus* spp. scorpion venoms is very important not only to elucidate the molecular mechanisms of their actions but also to develop new patient treatment strategies.

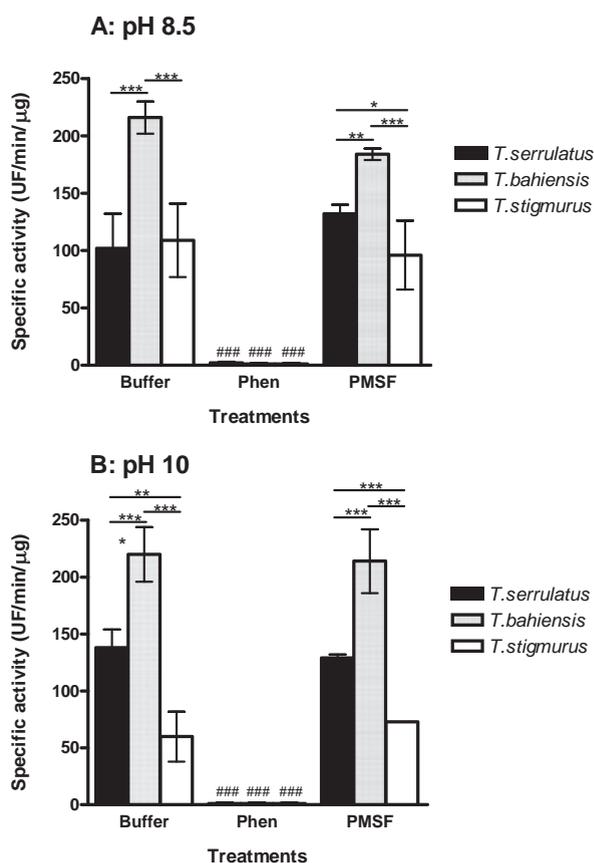


Fig. 4. The determination of the classes of proteases in *Tityus* spp. venoms. Samples of *Tityus* spp. venoms (2 μ g) were incubated at 37 °C with 5 μ M of the FRET substrate, Abz-FLRRV-EDDnp, in the presence or absence of PMSF or 1,10-phenanthroline (5 mM) at pH 8.5 (Panel A) or 10 (Panel B). The reactions were monitored by fluorescence (λ_{em} 420 nm and λ_{ex} 320 nm) using a spectrofluorimeter at 37 °C. The hydrolysis was expressed as units of free fluorescence per minute per μ g of venom (UF/min/ μ g). The results are representative for three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** and #### $P < 0.001$; # for buffer vs. phenanthroline.

Many factors including phylogeny, sex, geographic origin and season might influence the venom composition (Rodríguez de la Vega et al., 2010; De Sousa et al., 2010; Ma et al., 2012). The *Tityus* spp. venoms tested in this study exhibit variations in composition, number and intensity of protein bands, with the majority of components exhibiting a Mr between 26 and 50 kDa. In contrast, by using

Table 1

Hydrolysis of Dynorphin 1-13 (YGGFLRRIRPKLK).

Venom	Specific activity (nM/min/ μ g)	Cleavage site
<i>T. serrulatus</i>	0.67 \pm 0.04	YGGFL//R//RIRPKLK
<i>T. bahiensis</i>	1.74 \pm 0.2	
<i>T. stigmurus</i>	0.12 \pm 0.01	

Hydrolysis products were separated by HPLC in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A) and acetonitrile and solvent A (9:1) (solvent B). The separations were performed at a flow rate of 1 mL/min using a Shim-pack VP-ODS C-18 column (4.6 \times 150 mm) and a 20–60% gradient of solvent B over 20 min. The scissile bonds in the peptides were determined by mass spectrometry analyses.

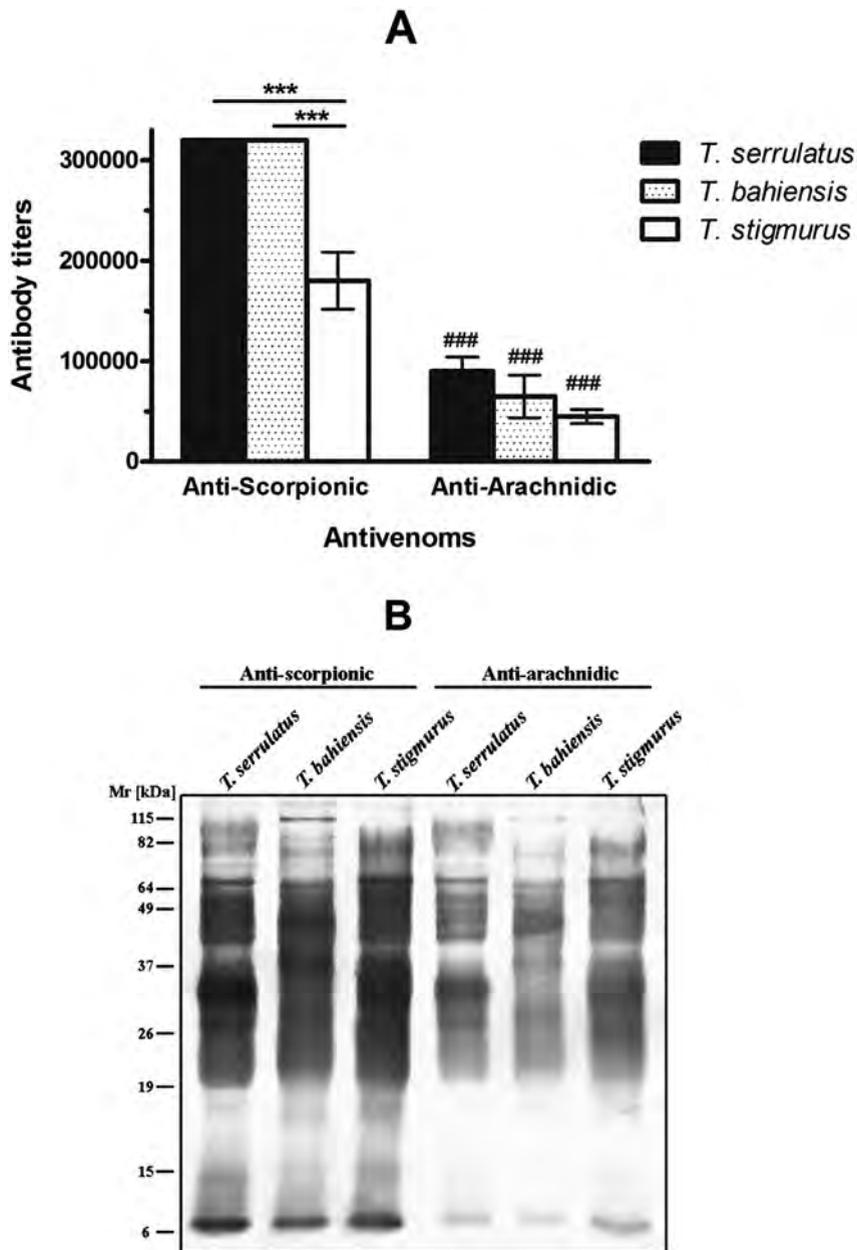


Fig. 5. The cross-reactivities of Brazilian anti-scorpionic antivenoms. **[A]** ELISA plates were coated with 1 μg /well of *Tityus* spp. venoms and incubated with different dilutions of anti-scorpionic or anti-arachnidic antivenoms, followed by GAH/IgG-HRPO diluted 1:20,000. The absorbance of the samples was measured at 492 nm. The titres were established as the highest antivenom dilution, which produces an absorbance three times greater than the negative control (the horse anti-tetanus antivenom). * and # for $P < 0.001$; #anti-scorpionic vs. anti-arachnidic treatments. **[B]** Samples (15 μg) of *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* were separated by SDS-PAGE (12% gel), electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Western blot) and incubated with the antivenoms diluted at 1:5,000, followed by GAH/IgG-AP (1:7500). The reaction was visualised using NBT and BCIP.

proteomic tools, Rodríguez de la Vega et al. (2010) have shown a high concentration of small proteins/peptides presenting Mr between 3–9 kDa in *Tityus* spp. venoms.

The anti-scorpionic and the anti-arachnidic antivenoms used for human therapy and produced by the Butantan Institute are obtained through the immunisation of horses with a pool of venoms either from *T. serrulatus* and *T. bahiensis* or from *T. serrulatus*, *Phoneutria nigriventer* and

Loxosceles gaucho for the first or second antivenoms, respectively. Both, ELISA and Western blot, analyses revealed that the antigens present in homologous and heterologous venoms are recognised by both antivenoms, although the anti-arachnidic antivenom exhibited a weaker ability to recognise the venoms' components.

The presence of group III phospholipases A_2 has been found in scorpion venoms (Valentin and Lambeau, 2000).

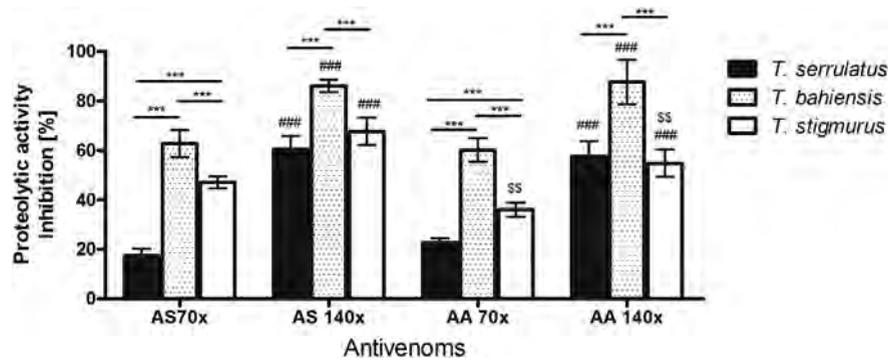


Fig. 6. The antivenom neutralisation of *Tityus* spp. venoms proteolytic activity on the FRET substrate. Samples of *Tityus* spp. venoms (2 µg) were incubated for 30 min at room temperature with 70 fold or 140 fold protein excess of the anti-scorpionic (AS) or anti-arachnidic (AA) antivenoms. The inhibition of proteolytic activity was measured using the FRET substrate Abz-FLRRV-EDDnp, as described in the **Materials and Methods** section. The results are representative of three independent experiments and are expressed as the inhibition of the proteolytic activity of the venoms (%). ^{SS} $P < 0.01$; ^{***} $P < 0.001$; # Anti-scorpionic antivenom at different concentrations and \$ is used to compare the different sera at the same dilution.

These enzymes act by catalysing the glycerophospholipid hydrolysis, which produces fatty acids. These fatty acids are involved in the generation of arachidonic acid and prostaglandins during pulmonary oedema formation, as well as in the tissue destruction attributed to the lysis of lipid membranes during the diffusion of the venom (Kanoo and Deshpande, 2008). Despite the description of phospholipases in scorpion venom, no activity was detected in the *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* venoms used in this study. Similar results were also reported by Almeida et al. (2012), who also failed to find the presence of phospholipases in *Tityus* spp. venoms using transcriptomic analysis.

Hyaluronidase is present in the venoms of many snakes, as well as in the venoms of bees, spiders and scorpions. Its activity potentiates the venom toxicity by promoting a loss of extracellular matrix integrity in the soft connective tissues surrounding blood vessels, thereby increasing the systemic diffusion of toxins (Girish and Kemparaju, 2007). A 44.8-kDa component exhibiting hyaluronidase activity was found in the venoms from *T. stigmurus*, *Tityus pachynurus* and *Tityus costatus* (Batista et al., 2007). In *T. serrulatus* venom, a 51-kDa molecule exhibiting activity on toxin spreading was also purified (Pessini et al., 2001). Here, we have confirmed the presence of hyaluronidases in the venoms from *T. stigmurus* and *T. serrulatus* and have identified, for the first time, this activity in *T. bahiensis* venom. Nonetheless, the hyaluronidase activity of the *T. stigmurus* venom was significantly lower than that exhibited by *T. serrulatus* and *T. bahiensis*. Interestingly, the *T. serrulatus* and *T. bahiensis* hyaluronidase activity was similar to those determined for some snake venoms from *Bothrops* genus (Queiroz et al., 2008).

Proteases are important venom components. These enzymes are involved in the post-translational processing of other toxic components contained within the venom, as well as in the inhibition of platelet aggregation, modulation of cytokine production, or activation of the complement system – all of which might contribute to or facilitate the diffusion of the venom via degradation of matrix proteins such as laminin and type IV collagen. Protease activity has been detected in various species of scorpion venoms

(Morgenstern et al., 2011; Seyedian et al., 2010). However, little information about their primary structure has been available. In our study, we were unable to find gelatinase activity in the venoms analysed. In an early study from Almeida et al. (2002), a gelatinase activity associated with serine proteases was observed in venoms from *T. serrulatus* and *T. bahiensis*. In addition, a gelatinase activity attributed to the presence of a metalloproteinase was recently observed in the venom of *Hemiscorpius lepturus*, a scorpion found in Iran (Seyedian et al., 2010). These discrepancies might be due to the sensitivity of the methods of measurement or to intraspecific/interspecific variations in venom composition.

A FRET substrate, a dynorphin analogue peptide, was used in our proteolytic studies. Using this fluorometric method, it was possible to demonstrate that the *Tityus* spp. venoms studied were able to hydrolyse the substrate (Abz-FLRRV-EDDnp), with optimal hydrolysis efficiency at pH 8.5 and 10. Under these conditions, venom from *T. bahiensis* demonstrated more than two times greater proteolytic activity compared to venom from *T. serrulatus* and *T. stigmurus*. Furthermore, the proteolytic activity was completely inhibited by the metalloproteinase inhibitor 1,10-phenanthroline but not by PMSF, a serine protease inhibitor.

The first metalloproteinase from the venom of *T. serrulatus* was recently identified and characterised (Fletcher et al., 2010). This enzyme, named antarease, exhibits action on the protein vesicle-associated membrane proteins 2 and 8 (VAMP2 and VAMP8), also known as synaptobrevins. Antarease has a molecular mass of 25.5 kDa. The cleavage sites in VAMP2 were identified as L//KRR//Y and those in VAMP8 as A//RK//F. The antarease VAMP2 cleavage site is similar to that of the metalloproteinase cleavage site of dynorphin 1-13 (L//RR) from *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* venoms found in this study. This result suggests that dynorphin-cleaving metalloproteinases detected in *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* venoms might be antarease-like molecules. Further studies will be performed to purify and characterise the dynorphin-cleaving metalloproteinases from *Tityus* spp. venoms.

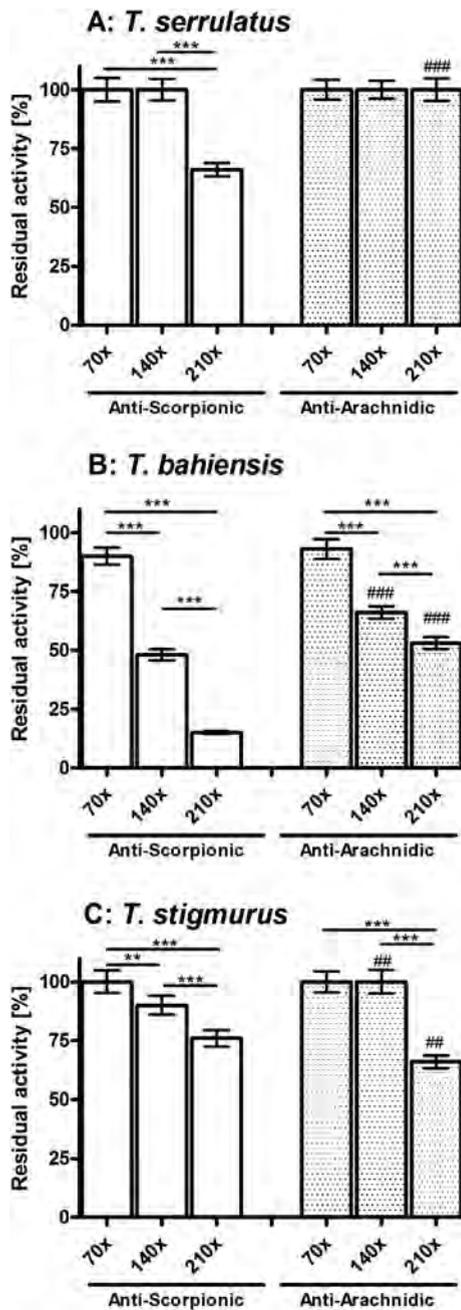


Fig. 7. The antivenom neutralisation of the proteolytic activity of the *Tityus* spp. venoms on the Dynorphin 1-13 peptide. Samples of *Tityus* spp. venom (2 µg) were incubated for 30 min at room temperature with a 70×, 140× or 210× protein excess of the anti-scorpionic or anti-arachnidic antivenoms. The dynorphin-cleaving activity is described in **Materials and Methods** section. The results are representative of three independent experiments and are expressed as residual proteolytic activity (%). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; # is used to compare different sera at the same dilution.

The dynorphin-degrading capacity of *Tityus* spp. venoms, resulting in the generation of the biologically active peptide leu-enkephalin, might be implicated in the hypotension and bradycardia symptoms (Feldman et al., 1996), as observed in patients stung by *Tityus* scorpions.

Dynorphin 1-13 is an opioid neuropeptide, which, when applied at low doses, can lead to a decrease in pain via the activation of opioid kappa-type receptors (Beyer et al., 1997) but when applied at high doses, can lead to an increase in pain and neurotoxicity via non-opioid receptors (Mika et al., 2011). Leu-enkephalin is a neuropeptide derived from the cleavage of proenkephalin by PC1 and PC2 convertases. It acts on both opioid and non-opioid receptors *in vivo* and might play an important role in the modulation of the innate immune response. Notably, the release of leu-enkephalin occurs by the cleavage of proenkephalin, not by the cleavage of dynorphin, during physiological conditions (Salzet, 2001). The release of leu-enkephalin by non-physiological mechanisms might elicit unexpected consequences.

This study also aimed to evaluate the serum neutralisation ability of the anti-scorpionic and anti-arachnidic antivenoms used in Brazil for human serum therapy on the toxic effects of *Tityus* spp. venoms. We have established and performed *in vitro* serum neutralisation assays for the proteolytic activities of *Tityus* venoms on the Abz-FLRRV-EDDnp and dynorphin 1-13 peptide substrates. Both antivenoms were able to partially inhibit the proteolytic activity of all of the venoms on the FRET substrates, with anti-scorpionic antivenom exhibiting more efficient inhibitory activity than the anti-arachnidic antivenom. However, the more efficient proteolytic inhibition was observed when the protein concentration of the two antivenoms, was 140-fold higher than the concentration of venoms used. When scorpionic and arachnidic antivenoms were used in excess of 70-fold, the proteolytic activity of *Tityus* spp. venom was reduced to a lesser degree, with *T. serrulatus* venom exhibiting the lowest extent of inhibition (~20%). *Tityus bahiensis* proteolytic activity was more efficiently inhibited by the two antivenoms at the two concentrations.

The dynorphin 1-13 proteolytic activity of *Tityus* spp. venoms was partially neutralised by the anti-scorpionic antivenom, largely at a 210-fold excess of the antivenom. Anti-arachnidic antivenom poorly neutralised the dynorphin 1-13 cleavage by the three venoms studied, even with a 210-fold excess of antivenom. Neither antivenom could efficiently neutralise the *T. stigmurus* venom. Taken together, these results show that the antivenoms exhibit low neutralising potential on the proteolytic activity, likely because of differences in a set of antigens/epitopes of metalloproteinases found in the different scorpion venoms.

In conclusion, the data presented in this study demonstrate the diversity and variation in the composition and activities of *Tityus* spp. venoms. The antivenoms used for human therapy in Brazil are insufficient for the full neutralisation of the proteolytic activities exhibited across all of the venoms, indicating that the quality of the antivenoms should be modified to more broadly neutralise the diverse components of scorpion venoms from clinically important *Tityus* species found in Brazil.

Ethical statement

This article presents experimental results performed following the standard procedures of scientific ethics.

Acknowledgements

The study was funded by CNPq, FAPESP, INCTTox and Fundação Araucária.

Conflict of interest

No.

References

- Abroug, F., ElAtrous, S., Nouira, S., Haguiga, H., Touzi, N., Bouchoucha, S., 1999. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomized controlled trial. *Lancet* 354 (9182), 906–909.
- Almeida, D.D., Scortecchi, K.C., Kobashi, L.S., Agnez-Lima, L.F., Medeiros, S.R.B., Silva-Junior, A.A., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Fernandes-Pedrosa, M.F., 2012. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC Genomics* 13, 362.
- Almeida, F.M., Pimenta, A.M., De Figueiredo, S.G., Santoro, M.M., Martin-Eauclaire, M.F., Diniz, C.R., De Lima, M.E., 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 40 (7), 1041–1045.
- Amaral, C.F., Rezende, N.A., 2000. Treatment of scorpion envenoming should include both a potent specific antivenom and support of vital functions. *Toxicon* 38 (8), 1005–1007.
- Amitai, Y., 1998. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. *Public Health Rev.* 26 (3), 257–263.
- Araújo, M.C., Melo, R.L., Cesari, M.H., Juliano, M.A., Juliano, L., Carmona, A.K., 2000. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 39 (29), 8519–8525.
- Barbosa, A.D., Magalhães, D.F., Silva, J.A., Silva, M.X., Cardoso, M. de F., Meneses, J.N., Cunha, M. da C., 2012. Caracterização dos acidentes escorpínicos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2005 a 2009. *Cad. Saúde Pública* 28 (9), 1785–1789.
- Batista, C.V., Román-González, S.A., Salas-Castillo, S.P., Zamudio, F.Z., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 146 (1–2), 147–157.
- Beyer, A., Schäfer, M., Stein, C., 1997. Antinociceptive effects of dynorphin peptides in a model of inflammatory pain. *Pain* 70 (2–3), 141–147.
- Beynon, R.J., Bond, J.S. (Eds.), 2001. *Proteolytic Enzymes: a Practical Approach*, second ed. Oxford University Press, Oxford.
- Boyer, L.V., Theodorou, A.A., Berg, R.A., Joanne Mallie, J., Chavez-Mendez, A., Walter Garcia-Ubbelohde, W., Hardiman, S., Alagon, A., 2009. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *N. Engl. J. Med.* 360 (20), 2090–2098.
- Bucarechi, F., Baracat, E.C., Nogueira, R.J., Chaves, A., Zambrone, F.A., Fonseca, M.R., Tourinho, F.S., 1995. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37 (4), 331–336.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107 (2), 71–79.
- De Sousa, L., Borges, A., Vásquez-Suárez, A., Op den Camp, H.J., Chadee-Burgos, R.I., Romero-Bellorín, M., Espinoza, J., De Sousa-Insana, L., Pino-García, O., 2010. Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males *Tityus nororientalis* (Buthidae) scorpions. *J. Venom Res.* 1, 61–70.
- Eickstedt, V.R.D., Ribeiro, L.A., Candido, D.M., Albuquerque, M.J., Jorge, M.T., 1996. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (PERTY) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo – Brazil. *J. Venom. Anim. Toxin.* 2 (2), 92–105.
- Feldman, P.D., Parveen, N., Sezen, S., 1996. Cardiovascular effects of Leu-enkephalin in the nucleus *tractus solitarius* of the rat. *Brain Res.* 709, 331–336.
- Fletcher Jr., P.L., Fletcher, M.D., Weninger, K., Anderson, T.E., Martin, B.M., 2010. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Biol. Chem.* 285 (10), 7405–7416.
- Gazarian, K.G., Gazarian, T., Hernández, R., Possani, L.D., 2005. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine* 23 (26), 3357–3368.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80 (21), 1921–1943.
- Kano, S., Deshpande, S.B., 2008. Involvement of phospholipase A2 pathway for the Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardiopulmonary reflexes elicited by phenyldiguanide. *Neurosci. Lett.* 440 (3), 242–245.
- Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G., 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* 218 (2), 325–329.
- Kuniyoshi, A.K., Rocha, M., Cajado Carvalho, D., Juliano, M.A., Juliano Neto, L., Tambourgi, D.V., Portaro, F.C., 2012. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. *Toxicon* 59 (1), 124–131.
- Laemmlis, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lira-da-Silva, R.M., Amorim, A.M., Brazil, T.K., 2000. Poisonous sting by *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) in the state of Bahia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33 (3), 239–245.
- Lourenço, W.R., 2008. Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14 (1), 19–44.
- Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., Cao, Z., 2012. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *J. Proteomic* 75, 1563–1576.
- Mika, J., Obara, I., Przewlocka, B., 2011. The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: implications of neuro-glial interaction. *Neuropeptides* 45 (4), 247–261.
- Ministério da Saúde, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, Fundação Nacional de Saúde/Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. CENEPI, Brasília.
- Morgenstern, D., Rohde, B.H., King, G.F., Tal, T., Sher, D., Zlotkin, E., 2011. The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon* 57 (5), 695–703.
- Pessini, A.C., Takao, T.T., Cavalheiro, E.C., Vichnewski, W., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39 (10), 1495–1504.
- Porto, T.J., Brazil, T.K., Lira-da-Silva, R.M., 2010. Scorpions, state of Bahia, northeastern Brazil. *Check List* 6 (2), 292–297.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepiere, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287–300.
- Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82 (9–10), 861–868.
- Price 3rd, J.A., 2007. A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (3), 441–444.
- Pukrittayakamee, S., Warrell, D.A., Desakorn, V., McMichael, A.J., White, N.J., Bunnag, D., 1988. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 26 (7), 629–637.
- Queiroz, G.P., Pessoa, L.A., Portaro, F.C., Furtado, M.F., Tambourgi, D.V., 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* 52 (8), 842–851.
- Ribeiro-Guimarães, M.L., Marengo, E.B., Tempone, A.J., Amaral, J.J., Klitzke, C.F., Silveira, E.K.X., Portaro, F.C.V., Pessolani, M.C.V., 2009. Cloning, expression and characterisation of an HtrA-like serine protease produced *in vivo* by *Mycobacterium leprae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 104 (8), 1132–1138.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2010. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56, 1155–1161.
- Salzet, M., 2001. Neuroimmunology of opioids from invertebrates to human. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 22 (6), 467–474.
- Seyedian, R., Pipelzadeh, M.H., Jalali, A., Kim, E., Lee, H., Kang, C., Cha, M., Sohn, E.T., Jung, E.S., Rahmani, A.H., Mirakabady, A.Z., 2010. Enzymatic analysis of *Hemiscorpus lepturus* scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin. *Toxicon* 56 (4), 521–525.
- Soares, M.R., Azevedo, C.S., De Maria, M., 2002. Scorpionism in Belo Horizonte, MG: a retrospective study. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35 (4), 359–363.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Valentin, E., Lambeau, G., 2000. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie* 82 (9–10), 815–831.

- Wu, X.S., Jian, X.C., Yin, B., He, Z.J., 2010. Development of the research on the application of chlorotoxin in imaging diagnostics and targeted therapies for tumors. *Chin. J. Cancer* 29 (6), 626–630.
- Zeng, X., Wang, S., Nie, Y., Zhanga, L., Luo, X., 2012. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. *Peptides* 33, 44–51.
- Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., Cao, Zhijian, 2011. SdPI, the first functionally characterized kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PLoS ONE* 6, e27548.