



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MENILLA MARIA ALVES DE MELO

**Peptídeos aniônicos presentes na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*:
Avaliação Estrutural e Atividade Biológica**

NATAL-RN

2016

MENILLA MARIA ALVES DE MELO

**Peptídeos aniônicos presentes na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*:
Avaliação Estrutural e Atividade Biológica**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas
Fernandes Pedrosa

NATAL-RN

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Melo, Menilla Maria Alves de.

Peptídeos aniônicos presentes na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*: avaliação estrutural e atividade biológica / Menilla Maria Alves de Melo. - Natal, 2016.
96f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. *Tityus stigmurus* (Escorpião) - TanP - Dissertação. 2. Dicroísmo circular - Dissertação. 3. Dinâmica molecular - Dissertação. 4. Atividade quelante - Dissertação. I. Pedrosa, Matheus de Freitas Fernandes. II. Título.

MENILLA MARIA ALVES DE MELO

**Peptídeos aniônicos presentes na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*:
Avaliação Estrutural e Atividade Biológica.**

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa
Presidente – UFRN



Prof. Dr. Norberto de Kássio Vieira Monteiro
Examinador Externo – UERN



Prof. Dr. Adriana Ferreira Uchôa
Examinador Interno – UFRN

Natal, 29 de Julho de 2016.

Agradecimentos

Li certa vez que a origem da palavra ‘obrigado’ como forma de agradecimento vem do latim *obligatus*, particípio do verbo *obligare*, ligar, amarrar. É a forma abreviada da expressão ‘fico-lhe obrigado’, ou seja, ‘fico-lhe ligado pelo favor que me fez’. Assim cria-se uma espécie de elo de ligação, mesmo que momentâneo, com quem lhe prestou determinado favor. Já a gratidão vem do latim *gratia*, que significa literalmente graça, ou *gratus*, que se traduz como agradável. Significa reconhecimento agradável por tudo quanto se recebe ou lhe é reconhecido. A seguir, meu “Muito obrigada” e “gratidão”:

Inicialmente agradeço a Deus, por me guiar até aqui. Por me despertar ‘sonhos’ e me permitir realizá-los. Por aumentar a minha fé todos os dias, principalmente naqueles mais difíceis. Na verdade agradeço ao céu inteiro (rs), pois a cada momento de desespero não dei descanso a ninguém ‘aí de cima’!

Ele (Deus), me abençoou com uma família maravilhosa. Que mesmo, muitas vezes, não entendendo o que eu faço (como assim ‘veneno de escorpião?’) me apoiou sempre e entenderam minha ausência. Compraram essa minha ideia de mestrado e disseram: “Vá! Estamos sempre aqui!” Nada se mantém erguido por muito tempo sem pilares. Eu tenho alguns que me sustentam, me elevam, me acalmam: Dona Marta, Melina, Mylane, Júlia, Diocílio, Márcio e Eloy. Obrigada por acreditarem em mim e que ia dar certo, principalmente quando eu tinha certeza que não daria. Amo vocês, família!

Professor Matheus, lhe agradeço pela oportunidade e pela confiança. Por abrir as portas do seu laboratório e me ajudar a construir esse trabalho. Pelas palavras de incentivo e tranquilidade quando eu entrava desesperada na sala do senhor porque as coisas não estavam dando certo. Nunca imaginei que diria isso: muito obrigada pelo presente de grego (é assim que chamo meu peptídeo trabalhoso, rs), graças a ele e ao senhor cresci e evolui como profissional e pessoa.

Prof. Adriana Uchoa e Prof. Norberto Monteiro, obrigada por aceitarem o convite para compor a minha banca. Tenho certeza que as contribuições serão ricas e auxiliaram a moldar esse trabalho da melhor forma.

Prof. Euzébio Guimarães e Prof. Daniel Pontes, obrigada por absolutamente TUDO! Por terem acolhido a mim e ao meu “peptídeo trabalhoso” e terem feito contribuições significativas (lê-se, salvadoras) para este trabalho. Obrigada por terem me recebido todas as vezes que precisei tirar dúvidas, discutir resultados, etc.

A todos do laboratório de Biologia Molecular I do Butantan, muito obrigada pela acolhida e pelos ensinamentos diários, em especial ao Dr. Eneas. Precisava apenas de um pesquisador que me ajudasse na técnica de CD, e ganhei um colaborador, um professor e um grande amigo. Alineska e noivo da Alineska, obrigada por não deixarem faltar nitrogênio para os experimentos.

Continuando a minha lista, obrigada a Bethinha, Diego, Andréia, Karol e Verônica! Por toda a ajuda nos experimentos (e nas inúmeras repetições deles), na escrita do artigo e Dissertação, na troca de ideias, pelos conselhos e tamanha parceria. Vocês foram essenciais para este trabalho e tenho um carinho enorme por cada um.

À toda equipe veneno e do TECBIOFAR, obrigada! Pelo dia a dia, pelos momentos alegres compartilhados e os difíceis também. Cada um, a sua maneira, me cativou e me ensinou bastante. Mas em especial agradeço à Alessandra. Posso dizer, sem medo de errar, que ela foi a melhor surpresa desse mestrado. Dividiu comigo todos os momentos, experimentos, amizade, alegria e tristeza durante esses 2 anos! Obrigada por tudo o que você me ensinou e pela amizade!

Aos meus amigos da vida! Chegar até aqui é maravilhoso e poder dividir isso com vocês é melhor ainda! Obrigada pela torcida, ajuda e compreensão de sempre! Mas alguns nomes preciso destacar, elas dividiram esse peso comigo desde a etapa da seleção: Alice Lima, Jéssica Rangel, Karlinha, Ilanna Dantas, Ana Vanessa, Ilanna Gurgel, Allanny, Paula e Mayara! Vocês deixaram o peso bem mais leve!

Às agências de fomento CAPES (Toxinologia 063/2010) e CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho, obrigada.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, cruzaram meu caminho nessa caminhada: Muito obrigada! Deu certo! Viva!

Menilla Alves

"Se quer ir rápido, vá sozinho.

Se quer ir longe, vá em grupo."

(Provérbio africano)

*"A adversidade desperta em nós capacidades que,
em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas."*

(Horácio)

Resumo

Venenos de escorpiões constituem uma rica fonte de peptídeos, que podem ser classificados como peptídeos com ligações dissulfeto e peptídeos sem ligações dissulfeto. Peptídeos aniônicos correspondem aos componentes sem ligações dissulfeto mais abundante na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* (espécie prevalente no nordeste brasileiro), sendo ricos em resíduos de ácidos aspártico e glutâmico. Esta abordagem apresenta, pela primeira vez, a caracterização estrutural e a avaliação da atividade biológica de um peptídeo aniônico presente na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*, denominado TanP. A estrutura tridimensional do TanP foi predita por modelagem computacional e refinada por simulações de dinâmica molecular, sendo a estrutura secundária obtida por dicroísmo circular, e estabilidade estrutural avaliada em diferentes meios, pH, temperatura e presença de íons cobre. Além disso, utilizou-se a espectroscopia UV-visível para avaliar a atividade quelante de TanP na presença de cobre. As atividades antimicrobiana, citotóxica, imunomoduladora e antioxidante também foram avaliadas. As análises de CD indicaram uma predominância de conformação randômica em meio aquoso, bem como mudanças estruturais dependentes de pH e temperatura. Os íons cobre, ao se ligarem ao peptídeo, modificaram a estrutura do mesmo. Tais dados corroboraram com o que foi demonstrado na dinâmica molecular. A razão molar de ligação (TanP:cobre) na dinâmica molecular foi 1:5, enquanto no ensaio de reatividade observou-se razões de 1:7 e 1:3, a depender da concentração de TanP na solução. TanP não induziu citotoxicidade para as células normais e cancerígenas testadas, e apresentou capacidade de inibir, *in vitro*, a liberação de óxido nítrico por macrófagos estimulados por LPS. Desta forma, os resultados sugerem que TanP é um peptídeo promissor para aplicação terapêutica como um agente quelante, bem como agente imunomodulador e antioxidante.

Palavras-chave: TanP, dicroísmo circular, dinâmica molecular, atividade quelante, atividade antioxidante, atividade imunomoduladora.

Abstract

Scorpion venoms are a rich source of peptides, which may be classified as disulfide-bridged or non-disulfide-bridged peptides. Among them, there are anionic peptides, rich in aspartic and glutamic acid residues. Despite being the most abundant component in the venom gland of *Tityus stigmurus* (the prevalent scorpion species in Northeast Brazil), they are poorly characterized in the literature. This work presents, for the first time, structural characterization and biological activity assays of an anionic peptide from the venom of the scorpion *T. stigmurus*, named TanP. The three-dimensional structure of TanP was obtained by computational modeling and refined by molecular dynamic (MD) simulations. Furthermore, we have performed circular dichroism (CD) analysis to predict TanP secondary structure, and UV-visible spectroscopy to evaluate its chelating activity. CD indicated predominance of random coil conformation in aqueous medium, as well as changes in structure depending on pH and temperature. TanP has chelating activity on copper ions, which modified the peptide's secondary structure. These results were corroborated by MD data. The molar ratio of binding (TanP:copper) depends on the concentration of peptide. TanP was not cytotoxic to normal or cancer cell lines, and showed an ability to inhibit the *in vitro* release of nitric oxide by LPS-stimulated macrophages. In this way, the results suggest TanP is a promising peptide for therapeutic application as a chelating, immunomodulatory and antioxidant agent.

Keywords: TanP, Anionic peptide; Circular dichroism; molecular dynamics; chelating activity, immunomodulatory activity, antioxidant activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura secundária do TanP em diferentes meios calculada por deconvolução dos espectros CD. Os dados são expressos como a média $\pm$ do percentual de estrutura secundária obtido nos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL

Tabela 2- Estrutura secundária do TanP em diferentes pH calculada por deconvolução dos espectros CD. Os dados são expressos como a média $\pm$ do percentual de estrutura secundária obtido nos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL

Tabela 3 – Estrutura secundária do TanP, em TFE 50% e pH 3,0, em função do aumento de temperatura, calculado pela deconvolução dos espectros de CD (190 a 260 nm). Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP do percentual de estrutura secundária obtida pelos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

Tabela 4 – Estrutura secundária do TanP, em TFE 50% e pH 3,0, antes e após o tratamento térmico (2 a 98 °C) a um comprimento de onda fixo de 222 nm. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SD da porcentagem de estrutura secundária obtida através dos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

Tabela 5 – Estrutura secundária do TanP em função de concentrações crescentes de íons Cu^{2+} calculado por deconvolução dos espectros de CD. Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP do percentual de estrutura secundária obtida pelos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição geográfica das espécies de importância médica do gênero <i>Tityus</i> no Brasil.....	21
Figura 2- Escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	22
Figura 3- Escorpião <i>Tityus bahiensis</i>	22
Figura 4- Escorpião <i>Tityus obscurus</i>	23
Figura 5- Escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	24
Figura 6- Morfologia de <i>Tityus stigmurus</i>	26
Figura 7- Sequência do peptídeo aniônico do <i>T. stigmurus</i> obtida a partir da tradução do cDNA TSTI0012C utilizando programa ORF-Finder.....	49
Figura 8- Alinhamento do TanP com peptídeos aniônicos de escorpiões.....	50
Figura 9- Dendograma entre TanP e demais peptídeos aniônicos de diversas espécies de escorpião.....	52
Figura 10 – Modelo tridimensional do TanP obtidos pelo AIDA.....	53
Figura 11 – Modelos tridimensionais do TanP obtidos pelo Robetta.....	54
Figura 12- Modelo tridimensional do TanP com metais Cu^{2+} complexados após refinamento por DM.....	55
Figura 13- Pontos de Quelação dos metais bivalentes no TanP detectados pela análise de distância em função do tempo.....	56
Figura 14- RMSD em função do tempo para TanP.....	59
Figura 15- RMSF por resíduo de aminoácido.....	60
Figura 16- Raio de Giro do TanP em função do tempo.....	61

Figura 17- Espectros de dicroísmo circular do TanP em água, Tampão fosfato 200 mM, SDS 20 mM e TFE 20 a 70%.....	62
Figura 18- Espectros do TanP em TFE 50% (v/v), obtidos por CD, submetido a diferentes condições de pH (3,0 – 9,0).....	64
Figura 19- Espectros do TanP em TFE 50% (v/v), obtidos por CD, submetido a diferentes condições de pH (3,0 – 9,0) nos comprimentos de onda 208, 217 e 222nm.....	65
Figura 20 – Espectros do TanP em TFE 50% (v/v) e pH 3, obtidos por CD, submetido a temperaturas diferentes (5 a 95 °C).....	66
Figura 21 – Avaliação do perfil estrutural do TanP em TFE 50% (v/v) e pH 3, submetido ao aquecimento e arrefecimento (2 – 98 ° C) em comprimento de onda fixo de 222 nm. Dados obtidos por CD.....	68
Figura 22 - Espectros de CD do perfil estrutural do TanP) e suas mudanças, devido adição de íons Cu^{2+}	69
Figura 23 - Acompanhamento Uv-Vis da reação entre TanP (2,11 μM) e diferentes concentrações de Cu^{2+}	72
Figura 24- Variação da absorbância do TanP (2,11 μM) em função da concentração de Cu^{2+}	73
Figura 25 - Acompanhamento Uv-Vis da reação entre TanP (23,6 μM) e diferentes concentrações de Cu^{2+}	74
Figura 26- Variação da absorbância do TanP (23,6 μM) em função da variação da concentração de Cu^{2+}	74

Figura 27- Efeito do TanP relacionado à proliferação de células em cultura.....	78
Figura 28 – Níveis de NO no sobrenadante de células RAW. As células foram incubadas com diferentes concentrações de TanP (5, 15, 30 or 50 μ M), na presença ou ausência de LPS, por 24 horas, e a concentração de nitrito foi determinada pelo método de Griess.....	80
Figura 29 - Atividade de Sequestro do radical Livre DPPH.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDA	<i>Ab Initio Domain Assembly Server</i>
Abs	Absorbância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Asp	Ácido aspártico
ASRL	Atividade de Sequestro de radicais livres
BLAST	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
BLASTp	<i>Basic Local Alignment Tool Protein</i>
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
DM	Dinâmica Molecular
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DPPH	1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido Bis(2- aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético)
EST	Expressed Sequence Tags
Glu	Ácido Glutâmico
IL-2	Interleucina-2
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MDCK	Células de rim canino
MHB	Caldo Mueller Hinton
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NADPH	Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Óxido nítrico
ORF	<i>Open reading frames</i>
PAM	Peptídeo antimicrobiano
TanP	Peptídeo Aniônico do <i>Tityus stigmurus</i>
PDB	Banco de dados de proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSPDs	Peptídeos sem ligações de sulfeto
RAW	Células de macrófagos murinos
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TanP	do inglês, <i>Tityus stigmurus</i> anionic peptides
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol
TistH	Hipotensina do escorpião <i>Tityus stigmurus</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
786	Linhagens de células de carcinoma renal

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Cu	Cobre
Fe	Ferro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
COO-	Carboxilato
kDa	Quilodalton
μg	Micrograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
OH	Hidroxila
μl	Microlitro
μs	Microsegundos
V	Volume
x g	Força gravitacional
Ω	Ômega
Å	Ångström
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO•	Radical Hidroxila

Fe^{2+}	Ferro (II)
Cu^{2+}	Cobre (II)
K	Kelvin
Bar	Unidade de pressão
μs	Microssegundos
ns	nanossegundos
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cobre di-hidratado
$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cobre hexa-hidratado
h	Horas

SUMÁRIO

1.0 Introdução	18
2.0 Fundamentação Teórica	20
2.1 Escorpiões	20
2.2 Escorpiões do gênero <i>Tityus</i> de importância médica no Brasil	20
2.3 <i>Tityus stigmurus</i>	25
2.4 Peptídeos sem Ligações Dissulfeto presentes na peçonha de <i>T. stigmurus</i>	28
2.5 Peptídeos Aniônicos	29
2.6 Agentes quelantes e uso terapêutico	33
3.0 Objetivos	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4.0 Material e Métodos	39
4.1 Obtenção do Peptídeo Sintético	39
4.2 Caracterização Estrutural	39
4.2.1 Análise por Bioinformática	39
4.2.2 Busca por sequências homólogas	39
4.2.3 Inferências Filogenéticas	40
4.2.4 Modelagem Molecular <i>ab initio</i>	40
4.2.5 Refinamento do modelo por Dinâmica Molecular	40

4.2.6 Dicroísmo Circular (CD – circular dichroism)	41
4.2.6.1 Estabilidade Estrutural em função do pH	42
4.2.6.2 Estabilidade estrutural em função da Temperatura	42
4.2.6.3 Ligação de Metais	43
4.3 Atividades Biológicas avaliadas <i>in vitro</i>	43
4.3.1 Ensaio de Reatividade do TanP com Cobre (II)	43
4.3.2 Triagem de atividade antimicrobiana	44
4.3.2.1 Micro-organismos	44
4.3.2.2 Preparo do inoculo	45
4.3.2.3 Avaliação do potencial antimicrobiano	45
4.3.3 Ensaio de Proliferação celular (Ensaio do MTT)	45
4.3.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO) em meio de cultura celular pelo método de Griess	47
4.3.5 Atividade de Sequestro de radicais livres (ASRL)	47
4.4 Análise Estatística	48
5.0 Resultados e Discussão	49
5.1 Análise de Bioinformática	49
5.2 Análise Filogenética	51
5.3 Modelagem <i>ab initio</i> e dinâmica molecular	53
5.4 Solubilização do peptídeo sintético	61
5.5 Estrutura secundária do TanP predita por espectrometria CD	61
5.5.1 Avaliação da estabilidade estrutural do TanP em função da	63

variação de pH por espectrometria CD

5.5.2 Avaliação da estabilidade estrutural do TanP em função da Temperatura por espectrometria CD 66

5.5.3 Análise da estrutura do TanP na presença de Cu^{2+} utilizando a técnica de CD 68

5.6 Reatividade do TanP com Cu^{2+} 71

5.7 Potencial antimicrobiano 75

5.8 Proliferação celular 76

5.9 Efeito do TanP na liberação de NO 78

5.10 Sequestro de Radical DPPH 79

6.0 Conclusões 81

Referências 83

1.0 INTRODUÇÃO

A peçonha dos escorpiões é uma fonte rica de moléculas bioativas (HARRISON et al., 2014) que exibem uma vasta variedade de atividades farmacológicas e funções bioquímicas, podendo ser classificadas em peptídeos com ligações de dissulfeto e peptídeos sem ligações dissulfeto (PSPDs) (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005).

Os PSPDs são moléculas, em sua maioria, de baixo peso molecular (1-4 kDa), apresentando uma diversidade de sequências primárias (ALMAAYTAH et al., 2012). Os peptídeos aniônicos de escorpiões correspondem a PSPDs ricos em resíduos de ácido aspártico (Asp) e/ou glutâmico (Glu) em sua sequência primária, estando presente nas famílias Buthidae e não-Buthidae. (HE et al., 2013).

Uma análise transcriptômica da peçonha do escorpião *T. stigmurus*, principal espécie do nordeste brasileiro, realizada por nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA et al., 2012) identificou a presença de um diversificado repertório de moléculas que estão tendo sua atividade biológica elucidada ao longo dos estudos, como peptídeos com atividade hipotensora (MACHADO et al., 2015), antimicrobiana (MELO et al., 2015), peptídeos atuantes em canais iônicos (ALMEIDA et al., 2013), lectinas, metaloproteínases e peptídeos aniônicos. Dentre as sequências codificadas, 27,72% são transcritos de peptídeos aniônicos, sendo este o grupo mais abundante na peçonha (ALMEIDA et al., 2012).

Embora não se saiba a função dos peptídeos aniônicos na peçonha de escorpiões (SUNAGAR et al., 2013), autores sugerem que estas moléculas possam atuar equilibrando o pH da peçonha (MA et al., 2009), como sinergistas de outros peptídeos (ZENG et al., 2004), ou apresentar atividade antimicrobiana (ALVARENGA et al., 2012). Peptídeos aniônicos presentes em outras espécies de animais vertebrados e invertebrados possuem atividade elucidada, demonstrando ação antimicrobiana, imunomoduladora e quelante de metais (SILVA et al., 2009).

Agentes quelantes podem ser usados na terapia de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Wilson (RODRIGUEZ-CASTRO; HEVIA-URRUTIA; STURNIOLO, 2015), tratamento de câncer (YU et al., 2012), tratamento de β -talassemia (CRISPONI et al., 2015), doença fibrótica, doenças inflamatória e

autoimune (BREWER, 2005). Além disso, restabelecem os níveis fisiológicos de metaloproteinases de matriz de membrana, uma vez que a sua atividade irregular repercute em condições como câncer e artrite debilitante (NANJARAJ URS et al., 2015). Nesse contexto peptídeos quelantes de metais têm sido alvo de novas pesquisas devido o seu potencial terapêutico.

Neste trabalho foi realizada a caracterização estrutural do peptídeo aniônico presente na peçonha do escorpião *T. stigmurus*, denominado de TanP, bem como foi avaliada sua provável atividade biológica e papel na peçonha. Trata-se de um trabalho pioneiro, uma vez que ainda não há descrito na literatura estudos de caracterização de peptídeos aniônicos da peçonha de escorpiões.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Escorpiões

O escorpião é um artrópode peçonhento, pertencente ao Filo *Arthropoda* (arthro: articuladas/ podos: pés), classe *Arachnida* (por terem oito pernas) e ordem *Scorpiones* (PETRICEVICH, 2010). São considerados predadores terrestres e sobreviveram com sucesso ao longo de milhões de anos com poucas alterações em sua morfologia (D'SUZE et al., 2009).

Estes animais são adaptados para sobreviver em uma grande variedade de habitat incluindo florestas tropicais, savanas, florestas temperadas, cavernas e até mesmo montanhas cobertas de neve (LEEMING, 2003; PLESSIS; ELGAR; PLESSIS, 2008). Distribuem-se pela superfície terrestre e habitam quase todos os continentes, com exceção da Antártida e áreas polares (CARMO, 2011; LOURENÇO, 1988). São animais de hábitos noturnos e, durante o dia, escondem-se sob cascas de árvores, pedras e dentro de domicílios, principalmente em sapatos e podem sobreviver por vários meses sem alimento e água (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Existem aproximadamente 1900 espécies de escorpiões descritos mundialmente, sendo cerca de 30 destas potencialmente perigosas para humanos (ALBUQUERQUE et al., 2013). As espécies de escorpiões que apresentam importância médica pertencem à família *Buthidae* e são representados pelos gêneros *Androctonus*, *Buthus*, *Mesobuthus*, *Buthotus*, *Parabuthus*, e *Leirus*, os quais podem ser encontrados no norte da África, Oriente Médio e Índia. *Centruroides spp* estão localizados no sudoeste do Estados Unidos, México e América Central, enquanto *Tityus spp* são encontradas na América Central, América do Sul e Caribe (PETRICEVICH, 2010).

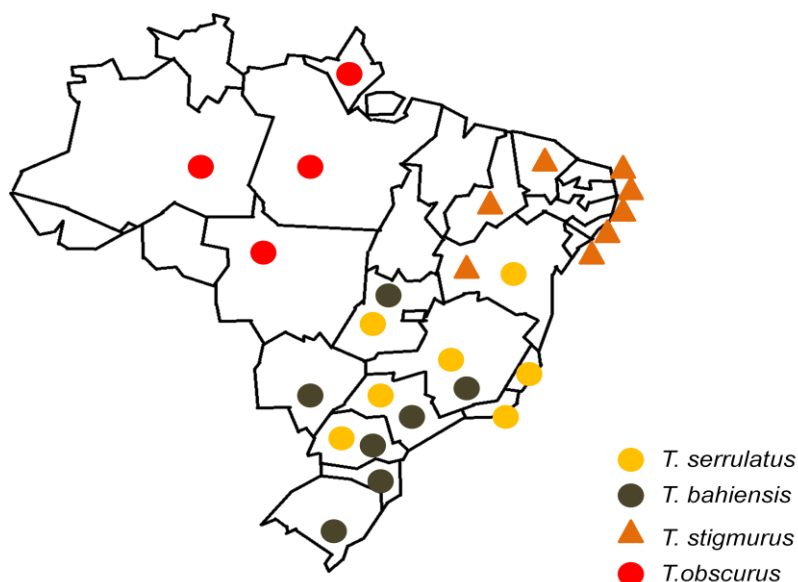
2.2 Escorpiões do gênero *Tityus* de importância médica no Brasil

O escorpionismo é considerado um problema de saúde pública em diferentes regiões do mundo (PETRICEVICH, 2010). O gênero *Tityus* é exclusivamente neotropical com cerca de mais de 170 espécies conhecidas (BORGES et al., 2010), sendo pelo menos vinte espécies de importância médica em toda a América do Sul e

Caribe (BORGES; MIRANDA; PASCALE, 2012; DEHESA-DÁVILA; POSSANI, 1994).

No Brasil, as espécies pertencentes aos gêneros *Tityus* estão envolvidos na maioria dos acidentes escorpionicos (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008), sendo elas: *T. serrulatus* (LUTZ et al., 1922), *T. bahiensis* (PERTY, 1834), *T. obscurus* (GERVAIS, 1843) e *T. stigmurus* (THOREL, 1876), distribuindo-se por todo o território nacional (Figura 1). As peçonhas destas espécies são suficientemente potentes para causar acidentes fatais, principalmente em crianças e idosos (BORGES et al., 2008).

Figura 1- Distribuição geográfica dos escorpiões de importância médica no Brasil



Fonte: autoria própria.

O gênero *Tityus* é caracterizado por apresentar espécies que variam de 25 mm a 110 mm de comprimento; a coloração do animal varia de amarelado a avermelhado, podendo alguns se apresentar enegrecidos; podem possuir manchas negras distribuídas de diferentes maneiras e apresentam corpo com granulação bem marcada (ALMEIDA, 2010).

O *T. serrulatus* (Figura 2), comumente conhecido como escorpião amarelo, é o principal agente etiológico dos acidentes escorpionicos no Brasil, sendo prevalente nos casos de maior gravidade, bem como em casos fatais (PORTO et al., 2010). Está amplamente distribuído pelo Brasil, atingindo os estados de São Paulo, Minas

Gerais, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Paraná e Rio de Janeiro (VENANCIO et al., 2013).

Figura 02- Escorpião *Tityus serrulatus*



Fonte: Disponível em <http://www.dddrin.com.br/wp-content/uploads/2014/06/Escorpiao-amarelo.jpg>.

O *T. bahiensis* (Figura 3) possui corpo e cauda de coloração marrom escuro, por vezes avermelhada, e as pernas são marrom alaranjadas com manchas em marrom-escuro (LOURENÇO, 2002). Encontra-se distribuído nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (PORTO et al., 2010). Foi demonstrado que o veneno desta espécie apresenta algumas características diferentes dos demais escorpiões, incluindo propriedades convulsivas (NENCIONI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, o envenenamento moderado por *T. bahiensis* pode alterar o desempenho reprodutivo materno e o desenvolvimento fetal (DORCE; DORCE; NENCIONI, 2014).

Figura 03- Escorpião *Tityus bahiensis*



Fonte: Disponível em http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/escop_tityus_bahiensis.jpg.

T. obscurus (Figura 4) é amplamente distribuída na Amazônia brasileira, podendo ainda ser encontrado em Mato Grosso, Pará e Amapá, tendo sido uma das espécies mais importantes responsáveis por picadas de escorpião nestas áreas (PARDAL *et al.*, 2014). Possuem uma coloração escura, enegrecida quando adulto, porém quando jovens têm uma cor amarelada (LOURENÇO, 2006). Um estudo realizado para comparar as características clínicas e demográficas dos acidentes por *T. obscurus* em áreas distintas do estado do Pará, mostrou diferença nas manifestações clínicas das vítimas dos acidentes escorpiônicos, sugerindo uma variação da toxicidade resultante da diversidade do veneno de *T. obscurus*, o qual pode mudar de acordo com a área (PARDAL *et al.*, 2014).

Figura 04- Escorpião *Tityus obscurus*



Fonte: Disponível em <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgvYUAD/relatorioescorpionismo?part=2>.

O escorpião *T. stigmurus* (Figura 5) é também conhecido como escorpião amarelo do nordeste (LIRA-DA-SILVA; MONTEIRO DE AMORIM; KOBLEBR BRAZIL, 2000), uma vez que apresenta similaridade morfológica ao *T. serrulatus*, como o tronco amarelo-escuro. Porém apresenta um triângulo negro no cefalotórax, uma faixa escura longitudinal mediana e manchas laterais escuras (PORTO *et al.*, 2010). Está distribuído na região Nordeste, estando presente no estado da Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe, sendo o principal responsável por acidentes escorpiônicos desta região, sobretudo em crianças (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Figura 05- Escorpião *Tityus stigmurus*



Fonte: disponível em <http://scorpiones.pl/gallery/T.stigmurus/Tityus%20stigmurus%20-%20mlody%20by%20Obli.jpg>.

Em muitos casos, os venenos dos escorpiões são letais para vertebrados, devido ação, principalmente, de toxinas que atuam em canais iônicos voltagem-dependentes, como os canais de sódio e potássio, além de possuírem, também em sua peçonha, mediadores inflamatórios que provocam efeitos sistêmicos nas vítimas como a insuficiência cardiorrespiratória, que é frequentemente associada com casos graves, particularmente após o envenenamento por espécies pertencentes ao gênero *Tityus* (BORGES et al., 2008).

O ensaio de letalidade injetando, via intraperitoneal, o veneno de escorpiões em camundongos determinou que a peçonha de *T. stigmurus* possui maior toxicidade ($DL_{50} = 0,773$ mg/Kg) quando comparada a de *T. bahiensis* ($DL_{50} = 1,062$ mg/Kg), *T. serrulatus* ($DL_{50} = 1,160$ mg/Kg) e *T. obscurus* ($DL_{50} = 12,136$ mg/kg) (NISHIKAWA et al., 1994).

2.3 *Tityus stigmurus*

Em áreas urbanas do nordeste brasileiro, *T. stigmurus* é uma das principais espécies de escorpião de importância médica (ALBUQUERQUE et al., 2013), sendo responsável por centenas de acidentes graves por ano (BARROS et al., 2014; BATISTA et al., 2007). Ocorrem no cerrado e caatinga nordestinos, como também podem ser encontrados em ambientes antrópicos e em Fernando de Noronha (ALMEIDA, 2010).

O primeiro estudo sobre acidentes com escorpiões no Nordeste, que reporta um relato de oito crianças envenenadas por *Tityus stigmurus* no Estado de Pernambuco, data do início da década de 1980 (PORTO et al., 2010).

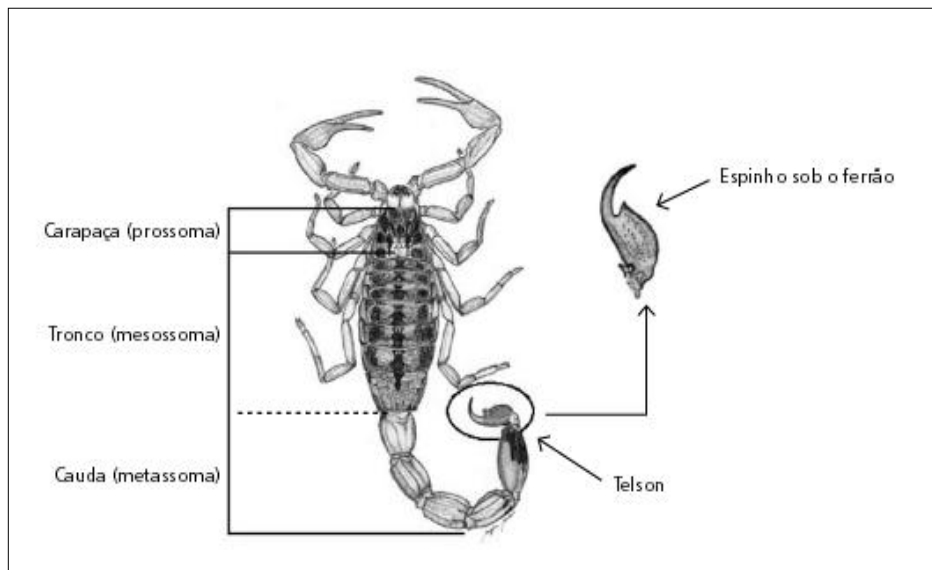
Estudo epidemiológico realizado em Pernambuco apresentou que no período de 2006 a 2010 foram notificados aproximadamente 10 mil casos de acidentes por animais peçonhentos (serpentes, aranhas, escorpiões, abelhas), sendo cerca de 6 mil casos causados por *T. stigmurus*, e destes, 3 casos fatais (ALBUQUERQUE et al., 2013).

No estado do Ceará, dados do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) de Fortaleza, retrataram que do total de acidente por escorpionismo, no período de 2003 a 2004, 19,57% dos casos foram atribuídos a *T. stigmurus* (ALVES et al., 2007). Já no Rio Grande do Norte o número de acidentes por escorpiões aumentou de 1.317 casos no ano de 2000 para 3.344 casos em 2013, sendo notificados aproximadamente 30 mil casos durante o período citado (BRASIL, 2015).

Relatou-se baixo percentual de escorpionismo relacionado a acidentes de trabalho no estado do Rio Grande do Norte, caracterizando este tipo de acontecimento como um agravo domiciliar ou peridomiciliar, o que pode ser atribuído às condições propícias de proliferação encontradas nesses ambientes, como frechas em portas e janelas, bem como acúmulo de entulhos (BARBOSA, 2014).

Os escorpiões *T. stigmurus* possuem coloração que varia de amarelo claro ao amarelo escuro e o comprimento total de 55 a 65 mm. Com relação a suas características morfológicas apresentam uma carapaça (prossoma), o cefalotórax, contendo um par de quelíceras, um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de pernas. O abdômen (opistossoma) é dividido entre o tronco (mesossoma) e a cauda (metassoma) (Figura 6). A região do prossoma possui um triângulo na porção anterior aos olhos medianos. O mesossoma apresenta uma listra negra central. O metassoma apresenta granulação fraca. O télson constitui de uma vesícula elíptica e bem proeminente. Os machos possuem segmentos metassomais mais largos e fêmur-tarsi do pedipalpo levemente mais longo que as fêmeas (ALMEIDA, 2010).

Figura 6- Morfologia de *Tityus stigmurus*.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009.

As populações sexuais de *T. stigmurus* são altamente restritas geograficamente, enquanto as populações assexuadas (partogenéticas) são mais dispersas, fazendo com que esta espécie se distribua por áreas urbanas em vários estados do Brasil.

Com relação aos sintomas apresentados após acidente escorpiônico, em um estudo de abordagem clínica do envenenamento por *T. stigmurus* no estado da Bahia observou-se que o acidente se caracteriza por manifestações locais como dor, dormência, edema, eritema e parestesia; e gerais como cefaleia, vômitos e sudorese. Sendo o mais prevalente a dor local (LIRA-DA-SILVA; MONTEIRO DE AMORIM; KOBLEER BRAZIL, 2000).

Sobre as toxinas não enzimáticas que compõem a peçonha de *T. stigmurus*, estas podem ser divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não de ligações dissulfeto. Toxinas com ponte dissulfeto são classificadas de acordo com a afinidade por diferentes canais iônicos e são os maiores agentes responsáveis pelas manifestações tóxicas. PSPDs, como peptídeos potenciadores de bradicinina, peptídeos aniônicos e peptídeos antimicrobianos possuem diversas atividades e funções (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Uma análise proteômica da peçonha de *T. stigmurus* revelou a presença de componentes proteicos que variavam de 216,5 a 44.800 Da de massa molecular. Neste mesmo estudo quinze novos componentes da peçonha foram isolados e sequenciados: Tst-3 (atuante em canal de sódio), Tst-17 (bloqueadora de canal de potássio), Tst β KTx (idêntica a toxina bloqueadora de canal de potássio presente na peçonha de *T. serrulatus*) e um peptídeo rico em prolina de função desconhecida, além das enzimas hialuronidase e lisozima (BATISTA et al., 2007).

É sabido que os canais de potássio voltagem-dependentes atuam na resposta imune, uma vez que, *in vitro*, diminuem a ativação de células T e a hipersensibilidade do tipo retardada (PETRICEVICH, 2010). A Butantoxina foi identificada na peçonha de *T. stigmurus*, atuando como um bloqueador reversível de canal de potássio e inibindo proliferação de células T e produção de IL-2 (HOLADAY JR et al., 2000).

Outra molécula já identificada na peçonha deste escorpião foi chamada de TstKMK (ALMEIDA et al., 2013), a qual atua em canais de potássio, sendo um novo membro das toxinas BmTXK β -relacionadas.

Uma abordagem transcriptômica, realizada por nosso grupo de pesquisa, revelou o repertório molecular da glândula de veneno do escorpião *T. stigmurus*, em que 540 clones foram sequenciados e agrupados em 153 *clusters* com um ou mais marcadores de sequências expressas. Foram identificados transcritos correspondentes a uma variedade de peptídeos de interesse farmacológico, incluindo peptídeos antimicrobianos (25,19%), hipotensinas (1,11%), toxinas agindo sobre os canais de potássio (13,52%) e de sódio (1,37%), bem como cinco tipos atípicos: lectinas, metaloproteases, peptídeos aniônicos, peptídeos ricos em cisteína e peptídeos hipotéticos secretados (ALMEIDA et al., 2012).

Os estudos relacionados aos peptídeos presentes na peçonha do escorpião *T. stigmurus* são alvo do nosso grupo de pesquisa, e como demonstrado, vem esclarecendo o papel e a descoberta de novas moléculas com potencial bioquímico e farmacológico, além de elucidar ações relacionadas ao envenenamento decorrido desta espécie. Sendo assim, torna-se promissor a continuação do estudo de novas moléculas ainda não identificadas.

2.4 Peptídeos sem Ligações Dissulfeto presentes na peçonha de *T. stigmurus*

Venenos de escorpiões são fontes de peptídeos, que podem ser classificados como peptídeos com ligações dissulfeto e peptídeos sem ligações dissulfeto (PSPDs). As toxinas mais estudadas dos venenos de escorpião do gênero *Tityus* são os peptídeos com ligações dissulfeto, que apresentam três ou quatro ligações, e atuam, em sua maioria, em canais de sódio, potássio e cálcio voltagem dependentes. Porém, os PSPDs estão, cada vez mais, sendo alvo de pesquisas, uma vez apresentam atividades multifuncionais (MACHADO et al., 2016; PUCCA et al., 2016).

Os PSPDs estão em maior quantidade na peçonha dos escorpiões e possuem baixa massa molecular, apresentando entre 13 a 56 resíduos de aminoácidos em sua composição, com sequência variável, sendo a maioria catiônico. Uma variedade de atividades tem sido descritas para estes peptídeos, incluindo atividade antimicrobiana, antiviral, antimalárica, anticancerígena, imunomoduladora e hipotensora. (ORTIZ et al., 2015).

Com relação ao perfil estrutural, os PSPDs apresentam uma conformação randômica desordenada quando em soluções aquosas, e apenas quando estes peptídeos são colocados em soluções que mimetizem uma membrana como soluções aquosas de trifluoroetanol (TFE) 50-60%, os peptídeos mudam sua conformação e adotam estruturas em α -hélice (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; CAMMERS-GOODWIN et al., 1996).

Alguns PSPDs presentes na peçonha de *T. stigmurus* já tiveram sua estrutura e atividade elucidada, como é o caso da Stigmurina, um peptídeo com atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, além de demonstrar potencial citotóxico contra linhagens de células cancerígenas (MELO et al., 2015).

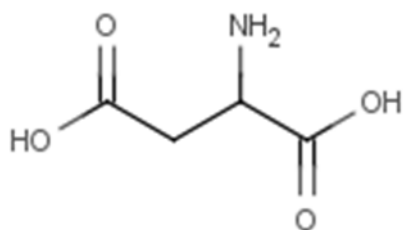
Em outro estudo recente, partindo-se da análise do cluster TSTI006C, também proveniente da análise transcriptômica da peçonha de *T. stigmurus*, foi identificado um novo peptídeo pertencente à classe de hipotensinas, chamado de Hipotensina de *Tityus stigmurus* (TistH). Tal molécula foi considerada um

pontenciador da ação hipotensora de bradicinina e induziu um efeito vasorrelaxante arterial dependente da liberação de óxido nítrico (NO) (MACHADO et al., 2015).

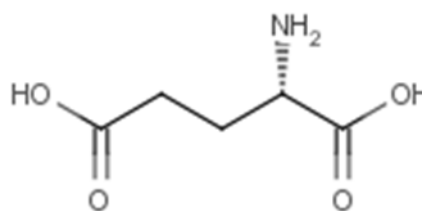
Os PSPDs correspondem a mais de 50% dos transcritos presente na peçonha de *T. stigmurus*, sendo 27,7% correspondente a peptídeos aniônicos, que apesar de ser a classe mais expressa, ainda possui função desconhecida (MA et al., 2012).

2.5 Peptídeos Aniônicos

Precusores de peptídeos aniônicos são moléculas ricas em resíduos de Glu e Asp (ALMEIDA et al., 2012; HE et al., 2013). Ambos os aminoácidos possuem dois grupos carboxilatos (COO⁻) e caráter ácido. Em pH 7,0 as cadeias laterais encontram-se dissociadas, conferindo-lhes carga negativa. São aminoácidos doadores de prótons.



Ácido aspártico



Ácido glutâmico

Fonte: Autoria própria

Estudos anteriores mostram relatos da presença de peptídeos aniônicos na peçonha de escorpiões da família Buthidae e não-Buthidae, sendo mais prevalentes na primeira (DIEGO-GARCÍA et al., 2005a; MA et al., 2009; RUIMING et al., 2010).

A partir de uma análise transcriptômica da glândula do escorpião *Centruroides tecomanus* foi identificado um cluster que codifica um possível peptídeo antimicrobiano aniônico, com sequência similar aos peptídeos aniônicos pertencentes à família de peptídeos sem ligações dissulfeto (VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2013), porém a atividade biológica deste peptídeo ainda não foi elucidada.

Uma análise filogenética realizada por Ma *et al.* (2012) com peptídeos aniônicos de duas espécies Buthidae (*Lychas mucronatus* e *Isometrus maculatus*) e uma espécie Euscorpiidae (*Scorpiops magerisonae*), demonstrou que as sequências peptídicas de ambas famílias foram intercaladas e parafiléticas entre si, sugerindo que famílias multigênicas para este tipo de peptídeo foram submetidas a eventos de duplicação de genes individuais ou múltiplos antes da divisão das linhagens. Portanto, é provável que estes peptídeos tenham sido recrutados para o proteoma do veneno dos escorpiões antes da separação dessas linhagens. No alinhamento realizado entre as sequências primárias, estas apresentaram grande diversidade. E ainda sugeriram que estes peptídeos devem estar presentes na peçonha de outras famílias de escorpião que ainda não foram examinados, como *Chaerilidae sp.*, *Iuridae sp.*, e *Vaejovidae sp.*.

Em análise transcriptômica realizada na glândula de veneno do *T. serrulatus*, as sequências de peptídeos aniônicos foram abundantes, indicando que estes componentes podem desempenhar papéis importantes na função deste órgão. Neste trabalho a percentagem de moléculas de peptídeos aniônicos foi 3%. Os peptídeos aniônicos apresentaram 18 EST (*Expressed Sequence Tags*) (ALVARENGA *et al.*, 2012).

Um outro estudo comparativo do transcriptoma da glândula de veneno do escorpião *Lychas mucronatus*, família Buthidae, de duas regiões geográficas diferentes classificou os peptídeos aniônicos encontrados como um tipo de peptídeo antimicrobiano, embora não tenham testado sua atividade. Os peptídeos aniônicos corresponderam a 12% e 6% dos peptídeos semelhantes a toxinas nos escorpiões das regiões de Hainan e Yunnan, respectivamente (RUIMING *et al.*, 2010).

Na peçonha de *T. costatus* foram identificados quatro possíveis peptídeos antimicrobianos aniônicos, cujas cargas variam de -19 a -20, porém não há estudos de caracterização destes peptídeos na literatura (DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2005b; HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Em relação ao *T. bahiensis* houve um nível elevado de expressão, com 4,9% do total das toxinas expressas como peptídeos aniônicos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

BmKa1 e BmKa2 possuem carga líquida de -12 e -13, respectivamente. São peptídeos de caráter ácido e hidrofílico, sem ligações dissulfeto identificados na peçonha do escorpião chinês *Buthus martensii* Karsch. Não possuem ancestral comum com os demais PSPDs identificados em escorpiões (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005). Baseando-se na molécula BmKa1, sugeriu-se que este peptídeo poderia ser responsável por balancear o pH da peçonha, uma vez que a maioria dos demais peptídeos são básicos; já BmKa2 poderia representar uma nova classe de peptídeos de defesa de escorpiões (ZENG et al., 2004).

D'Suze (2009) apresentou a biblioteca de cDNA da glândula do veneno do *T. discrepans*, onde a sequência mais representativa foi codificada por um peptídeo homólogo de um precursor aniônico descrito para o *T. costatus*, apresentando 1 *contig* e 16 leituras. Este peptídeo possui 75 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico bastante ácido, mostrando elevada identidade quando comparado ao peptídeo do *T. costatus*.

He et al., (2013) observaram dois *contigs* que codificam peptídeos aniônicos das bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno de *Chaerilus trysnai* e *Chaerilus tricostatus*, escorpiões da família Chaerilidae. Esta família tem um arsenal de veneno específico que é intermediário entre as famílias Buthidae e não-Buthidae. Os peptídeos aniônicos revelaram ser os mais expressos no *Chaerilus tricostatus*, coincidindo com a maior expressão de peptídeos antimicrobianos catiônicos também nesta espécie. Diante do achado, especulou-se que esse dado se relacione ao fato do peptídeo aniônico apresentar a função de equilibrar o pH do veneno do escorpião, considerando-se que a abundância de outros tipos de toxinas foram semelhantes entre *Chaerilus tricostatus* e *Chaerilus trysnai*. Então, esses dados podem fornecer evidência adicional de que os peptídeos aniônicos desempenham um papel importante para equilibrar o valor do pH do meio.

Embora menos comum, há peptídeos aniônicos dotados de ação antimicrobiana em plantas, invertebrados, anfíbios, roedores, ruminantes e humanos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Trata-se de moléculas pequenas (com peso molecular de 720 a 825 Da) e que contém resíduos de Asp (ZDYBICKA-BARABAS et al., 2012). Muitas vezes há necessidade da presença de um cofator, como o zinco, para a atividade bactericida (FALES-WILLIAMS et al., 2002).

Alguns ainda possuem um número variável de resíduos que são modificados pós-transducionalmente, seja por glicosilação e/ou fosforilação. A ligação a cátions bivalentes pode ocorrer para estabilização da estrutura ou para auxiliar a ligação do peptídeo na superfície da célula bacteriana (DASHPER; LIU; REYNOLDS, 2007).

Peptídeos aniônicos identificados em outros organismos tiveram sua atividade elucidada, como microplusina, peptídeo antimicrobiano quelante de cobre isolada da hemolinfa e ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SILVA et al., 2009), peptídeos derivados da dermicidina com ação antimicrobiana frente cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (STEFFEN et al., 2006), peptídeo antimicrobiano maxima H5 identificada no anfíbio *Bobina maxima* (LAI et al., 2002), o peptídeo antimicrobiano Kappacina presente no leite bovino, o qual tem o efeito potencializado quando complexado com íons de zinco (MALKOSKI et al., 2001).

Mais recentemente foi identificada a primeira defensina aniônica de anfíbios, *PopuDef*, purificada a partir da pele da rã arborícola *Polypedates puerensis*. Tal peptídeo apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e negativas (WEI et al., 2015).

Peptídeos aniônicos têm sido cada vez mais identificados em vertebrados, invertebrados e plantas, e tornou-se claro que estes também são uma parte integrante e importante do sistema imune inato (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Na hemolinfa da traça *Galleria mellonella* foi encontrado peptídeos aniônicos com resíduos de Glu e Asp, ausência de resíduos de cisteína, histidina, arginina ou triptofano. Estes peptídeos são moderadamente ativos contra bactérias gram-positivas e leveduras, *in vitro* (ZDYBICKA-BARABAS et al., 2012).

Alguns peptídeos aniônicos são classificados como proteínas ligantes de oxigênio, onde os primeiros componentes dessa classe foram isolados da hemolinfa de artrópodes e anelídeos, e possuem atividade antimicrobiana (MARSHALL; ARENAS, 2003).

Estudos sobre o mecanismo de ação dos peptídeos aniônicos ainda são escassos na literatura, sendo ausente qualquer estudo relacionado à caracterização e atividade biológica de peptídeos aniônicos presente na peçonha de escorpiões.

2.6 Agentes quelantes e uso terapêutico

Metais são elementos utilizados para restabelecer a homeostasia do corpo, quer por administração direta de metais essenciais (por exemplo: Ferro, Zinco, Cobre, Sódio, Potássio, Cálcio), ou por quelação dos metais em excesso ou tóxicos (por exemplo: Mercúrio, Chumbo, Cádmio). Podem também ser utilizados como veículos para a entrega de moléculas direcionadas, ou ainda para a marcação de biomoléculas em diagnósticos (FLORA; PACHAURI, 2010).

Há evidências consideráveis de que a perda da homeostasia de metais no organismo é uma característica chave de várias doenças neurodegenerativas e pode ter um papel importante na iniciação e progressão de desordens tais como Alzheimer, Parkinson e distúrbios neuromotores, (WHITE; KANNINEN; CROUCH, 2015). Nesse contexto foi sugerido que a remoção do excesso de metais por agentes quelantes poderia retardar a progressão da neurodegeneração, melhorando assim a função da cognição e do cérebro e, conseqüentemente, a qualidade de vida. Em muitas das doenças neurodegenerativas o ferro e o cobre têm sido identificados como apresentando alguma desregulação do controle homeostático cerebral (WARD; DEXTER; CRICHTON, 2012).

O cobre (Cu) é um metal essencial que atua como cofator e/ou catalisador em vários processos biológicos, como a embriogênese, crescimento, homeostasia, angiogênese (GEORGOPOULOS *et al.*, 2001 apud RIGIRACCILO *et al.*, 2015) e proliferação de células da medula óssea (BREWER, 2005). Trata-se de um componente essencial para enzimas importantes em reações do tipo redox, tais como citocromo C oxidase (cadeia de transporte de elétrons mitocondrial), superóxido dismutase (desintoxicação de espécies reativas de oxigênio) e lisil oxidase (*cross-linking* de elastina e colágeno) (ANTONIADES *et al.*, 2013).

No organismo o Cu existe em ambos os estados de oxidação, Cu oxidado (II) e Cu reduzido (I). As propriedades químicas que tornam o Cu biologicamente útil também podem potencialmente ocasionar efeitos tóxicos, isto é, estresse oxidativo induzido pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), além da manifestação de duas desordens hereditárias, a doença de Wilson e doença de Menkes (GUPTE; MUMPER, 2009).

O estresse oxidativo gerado por elevados níveis de Cu está correlacionado com o aparecimento de câncer, sendo o Cu um fator de prognóstico útil e um marcador da capacidade de resposta à terapia (RIGIRACCILO et al., 2015).

Estudos mostraram que, enquanto as concentrações de zinco, ferro e selênio estavam significativamente mais baixas em pacientes com câncer, os níveis de cobre foram quase sempre elevados em comparação com amostras de tecido normal (KUO *et al.*, 2002 apud GUPTE; MUMPER, 2009).

Agentes quelantes de cobre têm demonstrado ação para inibir a angiogenese *in vivo* e *in vitro*, inclusive, diversos estudos em animais utilizam agentes quelantes de cobre como agente antiangiogênico (GUPTE; MUMPER, 2009). Os íons de Ferro (Fe) também participam de importantes eventos fisiológicos, como o transporte de oxigênio, metabolismo celular e desenvolvimento e diferenciação celular (TUSSING-HUMPHREYS et al., 2012), porém também podem atuar como catalisadores, que aumentam a geração de radicais livres e subsequentemente iniciam as reações de oxidação em cadeia (YOUSR; HOWELL, 2015).

Devido ao fato das células possuírem metais de transição, ocorre geração de um potente radical oxidante, hidroxila (HO•), em seu interior. No organismo humano, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu e Fe. Assim, concentrações elevadas destes metais essenciais podem ser prejudiciais. A reação do Fe^{2+} com o H_2O_2 (reação de Fenton) está representada de maneira simplificada a seguir (HUSAIN *et al.*, 1987 apud BARREIROS; DAVID, 2006):



Este grupo hidroxilo tem a capacidade de remover um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos polinsaturados da membrana celular que, por sua vez, promove a peroxidação lipídica, resultando na acumulação de hidroperóxidos que destroem a estrutura e função da membrana (KOURY; DONANGELO, 2003).

A palavra “quelação” tem sua origem da palavra grega *chele*, que significa garra de uma lagosta, a qual descreve o conceito de apego ou segurando com um aperto forte. Sendo assim a terapia por quelação é uma importante ferramenta para modificar as concentrações de metais no corpo (FLORA; PACHAURI, 2010).

Os agentes quelantes são compostos inorgânicos ou orgânicos capazes de se ligarem a íons metálicos de modo a formar complexos estruturais em forma de anel denominados “quelatos”. Agentes quelantes possuem átomos ligantes que podem formar ambas as ligações covalentes ou uma covalente e uma coordenada ou duas ligações coordenadas. Os principais átomos que funcionam como ligantes são enxofre (S), nitrogênio (N) e oxigênio (O) (FLORA; PACHAURI, 2010).

A terapia de quelação é uma importante estratégia empregada para eliminar os metais pesados tóxicos do organismo. Além disso, agentes quelantes são vitais para restaurar os níveis fisiológicos de metaloenzimas, particularmente, as metaloproteinases de matriz, uma vez que sua atividade desregulada reflete em condições tais como câncer e artrite debilitante (GONG *et al.*, 2014; SHIAN *et al.*, 2003 apud NANJARAJ URS *et al.*, 2015).

Agentes quelantes também são utilizados para o tratamento de pacientes com β -talassemia que necessitam de transfusão sanguínea (CRISPONI *et al.*, 2015), Doença de Wilson, caracterizada pelo excesso de Cu (RODRIGUEZ-CASTRO; HEVIA-URRUTIA; STURNIOLO, 2015), tratamento de câncer (YU *et al.*, 2012), doença fibrótica e doenças inflamatórias e autoimunes (BREWER, 2005), fazendo com que moléculas quelantes destes metais sejam alvo de novas pesquisas.

Algumas drogas já são utilizadas para o tratamento da Doença de Wilson, como a D-penicilamina e Trientina, porém os efeitos adversos são frequentes diante do seu uso. A nefrotoxicidade é um dos principais efeitos nocivos da terapia com D-penicilamina, sendo muitas vezes precedida pela proteinúria. Além do alto custo, a Trientina é responsável por agravar sintomas neurológicos nos pacientes em uso (RODRIGUEZ-CASTRO; HEVIA-URRUTIA; STURNIOLO, 2015).

Em certos envenenamentos por serpentes comumente se observa a ocorrência de manifestações locais como hemorragia, evoluindo muitas vezes para necrose, as quais são induzidas por metaloproteínas. Em estudo recente, Nanjaraj *et al.* (2015) avaliaram três agentes quelantes de zinco com relação a ação de inibir atividades proteolítica, hemorrágica e miotóxica da peçonha da serpente *Echis carinatus*, a fim de utilizá-los na prática clínica como alternativa de primeiros

socorros em particular para os danos do tecido local, inibindo a atuação de metaloproteínas presente na peçonha.

A sequência de aminoácidos bem como o grau de hidrólise dos peptídeos interfere no desempenho da atividade quelante dos mesmos (YOUSR; HOWELL, 2015), e a constante de estabilidade do complexo depende da estrutura atômica dos metais quelados (FLORA; PACHAURI, 2010). A proporção de complexação varia de acordo com o pH, pois a maioria dos agentes quelantes são instáveis a pH baixo, ao passo que em pH mais elevado os metais tendem a formar hidróxidos insolúveis, que são menos acessíveis a agentes quelantes. Esta característica torna-se significativa em condições patológicas que levam a acidose ou alcalose (FLORA; PACHAURI, 2010).

EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), EGTA (ácido Bis(2- aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético) e o-fenantrolina são quelantes de metais divalentes não-específicos, e são muito eficazes na neutralização da atividade de metaloproteínas *in vitro*. No entanto, a sua ligação não específica a íons de metais bivalentes fisiologicamente vitais, especialmente cálcio, coloca um obstáculo ao seu uso farmacológico (PEREANEZ *et al.*, 2013 apud NANJARAJ *et al.* 2015).

É importante enfatizar que nas doenças neurodegenerativas há um acúmulo local, e não sistêmico, de íons metálicos, de modo que o agente quelante deve se ligar seletivamente e remover o excesso de metal de uma região específica do cérebro. Estudos anteriores mostraram que o tamanho molecular, assim como hidrofobicidade eram importantes para determinar se o agente quelante iria atravessar a barreira hemato-encefálica (WARD; DEXTER; CRICHTON, 2012).

Um dos principais problemas dos agentes quelantes em uso é o direcionamento específico dessas moléculas para determinadas regiões, e a ligação a nanopartículas é a principal alternativa de veículo para tais moléculas atravessarem a barreira hemato-encefálica (HSU *et al.*, 2006 apud WARD *et al.*, 2012).

A microplusina é um peptídeo aniônico encontrado na hemolinfa e ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Por espectrometria de massas verificou-se que este peptídeo é um quelante de Fe^{2+} e Cu^{2+} nas razões

molares de 1:3 e 1:1, respectivamente. Além disso, estudos sobre o mecanismo de ação da microplusina contra a bactéria gram-positiva *Micrococcus luteus* mostraram que a capacidade quelante de cobre do peptídeo está intimamente relacionada à sua atividade antimicrobiana. Supõe-se que ao ligar o Cu^{2+} do meio, a microplusina diminua a disponibilidade deste metal para os micro-organismos (SILVA et al., 2009). Até o presente momento, não há descrito na literatura estudos de caracterização estrutural, bem como avaliação da atividade biológica de peptídeos aniônicos presentes na peçonha de escorpiões. Desta forma este é um trabalho pioneiro.

Embora exista na atualidade uma variedade de agentes quelantes que podem ser usados no tratamento de enfermidades derivadas do acúmulo de metais, ainda não há um agente ideal. Desta forma, torna-se essencial a realização de estudos para descoberta de novas moléculas com ação quelante e com potencial uso na terapêutica.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi caracterizar estruturalmente e avaliar possíveis atividades biológicas de um novo peptídeo aniônico presente na peçonha do escorpião *T. stigmurus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter a sequência de aminoácidos a partir na análise do cluster TSTI0012C e adquirir o peptídeo sintético;
- Buscar sequências homólogas ao TanP, bem como inferências filogenéticas;
- Sugerir a estrutura tridimensional de TanP por meio de Modelagem Molecular e refinar o modelo obtido por Dinâmica Molecular;
- Avaliar a estrutura secundária do TanP, por dicroísmo circular;
- Identificar o potencial quelante do TanP com metais bivalentes, por espectroscopia UV-visível;
- Avaliar potencial biológico de TanP através de ensaios que estimem as propriedades: antimicrobiana, citotóxica, antioxidante e imunomoduladora;

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do peptídeo sintético

O peptídeo sintético (TanP) liofilizado foi obtido comercialmente da empresa particular *GenOne Biotechnologies* (Rio de Janeiro, Brasil), com a pureza de, no mínimo, 90% e foi mantido a temperatura -20 °C até o momento do uso. A massa e a pureza foram analisadas, respectivamente, por espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta performance, ambas realizadas pelo fabricante.

4.2 Caracterização Estrutural

4.2.1 Análise por Bioinformática

A sequência primária do TanP foi obtida a partir do transcriptoma da peçonha do escorpião *T. stigmurus* (Cluster TSTIOO12C) (ALMEIDA et al., 2012), utilizando a ferramenta *ORF-Finder* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.cgi). A presença de peptídeo sinal foi predita com o programa *SignalP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN et al., 2011). A região de clivagem do pró-peptídeo foi avaliada utilizando o *ProP 1.0 server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>) e a massa molar e o ponto isoelétrico teórico deste peptídeo foram obtidos com o programa *compute pI/Mw* (http://web.expasy.org/compute_pi/).

4.2.2 Busca por sequências homólogas

A procura por sequências homólogas à sequência do TanP foi realizada utilizando a plataforma online BLAST-NCBI (ALTSCHUL; LIPMAN, 1990), no modo Blastp. Para tanto, o programa foi executado nos parâmetros padrões. Foi realizado um alinhamento global entre o TanP e as sequências obtidas na busca BLAST utilizando o programa MAFFT (KATO et al., 2002), e a partir do alinhamento foi identificada a assinatura das sequências. Buscando identificar sequências com uma homologia distante foi utilizado o PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) e como entrada para a procura, além da sequência do peptídeo, foi utilizada também a assinatura: [FDL]-D-[AL]-[LF]-[DE]-[DE]-[LM]-D-[DN]-[LA]-D-[LD]-[DE]-x(0,4)-D-[LFY]-[LFY]-D-L-[ED]-P-A-D-[LFR]-[VIMG]-[LV]-[LI]-D-M-[WFL]-A-[ND]-[MLV]-[MLI]-[DEN]-[SND]-[QSN]-D.

4.2.3 Inferências Filogenéticas

A inferência filogenética foi realizada utilizando a ferramenta MEGA6 (TAMURA, 2013). Nesta etapa foi utilizado o método de Máxima Verossimilhança (do inglês, Maximum Likelihood – ML) e o modelo LG (FELSENSTEIN, 1992), com o modelo de taxa de variação permitido para sítios evolutivamente invariáveis (+I, 16,8851% dos sítios). O método ML é especialmente preciso para construção de filogenias moleculares (GUINDON; GASCUEL, 2003) e baseia-se em modelos evolutivos de substituição de nucleotídeos ou aminoácidos.

A análise envolveu 16 sequências de peptídeos aniônicos de diferentes escorpiões, e todos os sítios do alinhamento, os quais possuíam *gaps* ou *missing data* foram eliminados da análise. A árvore consenso foi obtida a partir de 1000 replicatas de bootstrap (HILLIS; BULL, 1993). As árvores iniciais utilizadas para busca por heurística foram obtidas automaticamente por meio da aplicação dos algoritmos Neighbor-Join e BioNJ. A topologia da árvore foi exportada no formato Newick e então visualizada no programa FigTree v.1.4.2 (RAMBOUT, 2012).

4.2.4 Modelagem Molecular *ab initio*

A estrutura tridimensional do TanP foi predita por modelagem *ab initio*, a qual se baseia em uma análise conformacional que depende do ambiente estrutural e é guiada por uma função de energia, partindo da estrutura primária da proteína (SANTOS FILHO; BICCA DE ALENCASTRO, 2003). No presente trabalho, a sequência no formato FASTA do peptídeo maduro foi submetida ao programa AIDA (<http://ffas.burnham.org/AIDA/>) (XU et al., 2014) e servidor Robetta (<http://rosetta.bakerlab.org/>).

Os modelos gerados foram validados utilizando o Programa *MolProbity* (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Os arquivos PDB foram visualizados utilizando software *USFC Chimera* versão 1.10. O melhor modelo gerado foi submetido ao refinamento, por dinâmica molecular.

4.2.5 Refinamento do modelo por Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando o programa GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005). O modelo tridimensional do peptídeo, obtido por *ab initio*, foi simulado juntamente com 10 íons cobre (Cu^{2+}), em

uma caixa cúbica virtual de dimensões de volume 125 nm^3 , para neutralizar a carga total do sistema e obter as condições de 1 bar e 310 K. A topologia da proteína foi criada com o programa *pdb2gmx* e escolhido o campo de força CHARMM27 (LINDAHL et al., 2010). O modelo de água empregado foi o TIP3P (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). As interações de longa distância foram truncadas em $10 \text{ \AA}$ e as forças eletrostáticas, além do raio de corte, foram tratadas com o PME (Particle Mesh Ewald) (DARDEN et al., 1999). A energia do sistema foi minimizada com o algoritmo *steepest descent* seguido do algoritmo de gradientes conjugados. As posições das moléculas de solvente e íons foram equilibradas com simulações de $0,8 \text{ }\mu\text{s}$ primeiro a volume constante e seguida de simulação NPT de tempo suficiente para trazer a pressão do sistema para 1 bar. As duas etapas mencionadas foram realizadas com a proteína restringida para evitar artefatos na estrutura. Após o sistema estar equilibrado, foram realizadas simulações com a proteína não contida para permitir a acomodação dos íons Cu^{2+} e refinamento da estrutura estimada por *ab initio*. O Desvio da Raiz Média Quadrática (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*), Flutuação da Raiz Média Quadrática (RMSF, do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) e raio de giro do peptídeo foram calculados para avaliar a estabilidade estrutural do modelo. O sistema foi considerado em equilíbrio quando o valor de *RMSD* estabilizasse, não havendo assim mudanças significativas na estrutura.

A aproximação dos íons Cu^{2+} aos sítios de ligação foi avaliada pelas distâncias dos íons às porções aniônicas do peptídeo, no caso específico, carbonos carboxílicos de Asp, Glu e porção C-terminal. Foi considerado que um processo de quelação ocorrera pela persistência da interação de determinados íons a partir do momento da aproximação efetiva.

4.2.6 Dicroísmo Circular (CD – *circular dichroism*)

Para a avaliação da estrutura secundária do TanP, os espectros de CD foram medidos utilizando-se um espectropolarímetro JASCO J-810 (Jasco, Japão) pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan. Os experimentos ocorreram à temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mantida através de um sistema do tipo Peltier e utilizou-se uma cubeta de quartzo com $0,1 \text{ cm}$ de caminho óptico. Os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm ,

velocidade de $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, em intervalos de $0,1 \text{ nm}$, com 5 leituras acumuladas para se obter uma média entre os espectros.

As análises foram realizadas com o peptídeo na concentração de $0,3 \text{ mg/mL}$, num volume final na cubeta de $150 \text{ }\mu\text{L}$. O comportamento estrutural do TanP foi avaliado nos seguintes meios: água ultrapura, 2, 2, 2-Trifluoroethanol (TFE) 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70% (v/v), Tampão Fosfato de Potássio 200 mM pH 7,4 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 mM .

Todos os espectros de CD foram corrigidos pela subtração do branco, e em seguida suavizados utilizando o programa *Spectra Analysis*. Os resultados dos espectros foram apresentados graficamente em função do comprimento de onda como elipticidade molar por resíduo $[\theta]$ em $\text{degree} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. O perfil percentual do tipo de estrutura secundária (α -hélice, β -folha ou randômica) do TanP foi feito a partir dos espectros de UV-distante usando uma média dos resultados encontrados nos algoritmos SELCON3, CONTIN e CDSSTR, pela plataforma online *Dicroweb* (WALLACE; LEES; ORRY, 2003; WHITMORE; WALLACE, 2004).

4.2.6.1 Estabilidade Estrutural em Função do pH

O TanP teve o perfil estrutural avaliado de acordo com a variação do pH do meio, para tanto utilizou-se um sistema tamponante de ácido cítrico $0,1 \text{ M}$ e fosfato de sódio $0,2 \text{ M}$ (pH 3,0 - 7,4) e tampão de ácido bórico $0,2 \text{ M}$ e borato de sódio $0,05 \text{ M}$ (pH 8,0 - 9,0) (RUSSELL et al., 2012). Nesta análise o volume final da cubeta foi $150 \text{ }\mu\text{L}$, estando o peptídeo na concentração de $0,3 \text{ mg/mL}$ e mantida a concentração de 50% TFE. Os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm. As demais condições de geração dos espectros, bem como tratamento de dados e obtenção dos percentuais de estrutura secundária, se deram como descrito no item anterior.

4.2.6.2 Estabilidade Estrutural em Função da Temperatura

Para o comportamento estrutural do TanP em função da variação de temperatura, inicialmente, a amostra foi submetida a um aumento de temperatura ($2 - 98 \text{ }^\circ\text{C}$) seguido de resfriamento até a temperatura inicial do experimento, com os espectros coletados no comprimento de onda fixo de 222 nm . Destaca-se que foram

coletados espectros com varredura de 190 a 260 nm antes e após o processo de aquecimento e arrefecimento da amostra.

Um segundo experimento foi realizado, também em comprimento de onda fixo de 222 nm. Nesta situação a amostra foi aquecida (2 – 98 °C) seguido de resfriamento até a temperatura inicial, e a cada 5 °C foram coletados espectros com varredura de 190 a 260 nm, sendo a primeira coleta em 5 °C e a última em 95 °C.

Para ambas as situações, o volume final da cubeta foi 300 µL, a concentração do TanP foi 0,3 mg/mL, sendo mantida a concentração de 50% TFE e pH 3,0 do meio.

As demais condições de geração dos espectros, bem como tratamento de dados e obtenção dos percentuais de estrutura secundária se deram como descrito anteriormente.

4.2.6.3 Ligação de Metais

Na tentativa de avaliar a mudança conformacional do TanP em virtude de sua ligação a metais bivalentes, realizou-se um ensaio de CD mediante titulações seriadas e crescentes de solução do sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à solução aquosa inicial de TanP (0,3 mg/mL).

Soluções estoques de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram preparadas, de modo que microvolumes destas soluções fossem adicionados à cubeta variando a concentração de íons Cu^{2+} de 0 µM a 372,7 µM. A medida que eram adicionados volumes de solução $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a concentração do peptídeo era ajustada com adição de pequenos volumes de uma solução de TanP (0,6 mg/mL – 103,08 µM), de modo que ao final houve uma mínima variação da concentração do peptídeo, sendo esta de 51,89 µM a 56,96 µM.

As demais condições de geração dos espectros, bem como tratamento de dados e obtenção dos percentuais de estrutura secundária se deram como descrito anteriormente.

4.3 Atividades Biológicas avaliadas *in vitro*

4.3.1 Ensaio de Reatividade do TanP com Cobre (II)

Uma vez que o TanP é rico em carboxilatos (COO^-) provenientes dos Asp e Glu que compõem sua sequência primária, imaginou-se que tais grupamentos seriam prováveis sítios de interação do peptídeo com metais bivalentes. Desta forma, para elucidar uma possível atividade quelante de metais, realizou-se um ensaio de reatividade do TanP com íons Cu^{2+} .

O experimento foi realizado no Laboratório de Química de Coordenação e Polímeros (LQCPol) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Foi preparada uma solução estoque aquosa do TanP 2 mg/mL (343,6 μM). Para um primeiro experimento, diluiu-se a solução do peptídeo 343,6 μM para 2,11 μM , sendo esta adicionada à cubeta de quartzo de 1 mL. Duas soluções de $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com concentrações de 333,2 e $1,68 \times 10^4$ μM foram preparadas. Em seguida foram adicionados microlitros das soluções de $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diretamente à cubeta, de modo a variar a concentração de íons Cu^{2+} de 0 μM a 198,4 μM .

Para um segundo experimento, diluiu-se a solução do peptídeo de 343,6 μM para 23,6 μM . Preparou-se duas soluções de $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com concentrações de 5000 e 1000 μM . Adicionou-se microlitros das soluções de $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à solução do peptídeo (23,6 μM), variando a concentração de íons Cu^{2+} , na cubeta, de 0 a 123,0 μM . Os espectros eletrônicos foram obtidos em espectrofotômetro Agilent modelo 8453 *UV-visible Spectroscopy System*, com detector DAD.

Após obter o gráfico da absorbância em função da concentração de Cu^{2+} foi feita a extrapolação das retas. Para isso igualaram-se os valores de y de cada uma das equações das retas, obtendo-se assim o valor de x, correspondente a concentração de Cu^{2+} na amostra.

4.3.2 Triagem de atividade antimicrobiana

4.3.2.1 Micro-organismos

O potencial antimicrobiano do TanP foi avaliado contra cepas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), e gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028)

obtidas do Laboratório de Microbiologia da UFRN. As cepas microbianas foram mantidas em ágar nutriente (Himedia) a 4 °C e em miçangas a -80 °C.

4.3.2.2 Preparo do inóculo

A partir de uma cultura de 24 horas de bactérias previamente semeadas em ágar Müller Hinton e de levedura em ágar Sabouraud, obteve-se um inóculo microbiano com diluição de 1:1000 em salina estéril, correspondente a 10^5 UFC/mL.

4.3.2.3 Avaliação do potencial antimicrobiano

A presença de atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) do TanP foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados em cada poço 25 µL de caldo Müller Hinton (4 vezes concentrado), 25 µL da solução do peptídeo (343,6 µM) e 50 µL da suspensão do micro-organismo. Foram utilizados como controles a cepa microbiana (controle positivo), o peptídeo (controle do peptídeo), o solvente (controle do solvente) e meio de cultura isento de peptídeo e micro-organismo (controle de esterilidade). Após colocar todas as amostras na placa, esta foi incubada a 37 °C por 24 horas sob agitação a 160 rpm (dados da incubadora).

O crescimento dos microorganismos foi avaliado por medida de absorbância no comprimento de onda de 595 nm, utilizando o Leitor de ELISA Epochn, nos tempos de 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h. O experimento foi realizado em duplicata.

4.3.3 Ensaio de Proliferação Celular (Ensaio do MTT)

Os experimentos de proliferação celular, quantificação de óxido nítrico e sequestro de radicais livres foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – BIOPOL, na UFRN.

Para este ensaio foram utilizadas células normais: macrófagos murínicos (RAW 264.7) e células de rim canino (MDCK); e linhagens de células de carcinoma renal (786-0).

As células normais foram cultivadas anteriormente em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) e as células tumorais em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) utilizando garrafas de cultivo celular.

Para analisar a taxa de proliferação celular, as células foram tratadas em cultura com diferentes concentrações das amostras do TanP, previamente solubilizado em meio de cultura DMEM, acrescido de 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e avaliadas pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenil tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). Tal metodologia avalia a atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, resultando na produção de cristais de formazan, de coloração púrpura, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos.

Neste experimento foi utilizada uma placa estéril de 96 poços para cada tipo de linhagem celular. No primeiro dia, aproximadamente 5×10^3 células foram colocadas em cada poço de sua respectiva placa para um volume final de 100 μ L/poço de meio de cultivo suplementado com 10% de SBF. Após plaqueamento, as placas foram incubadas por 24 horas nas condições de 37 °C e 5% de CO₂. Passado o período, o meio foi removido e as células, agora aderidas, foram carenciadas com meio sem SBF e incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições.

Posteriormente, o meio foi aspirado e as células estimuladas a sair de G₀ pelo acréscimo de meio com SBF 10% na presença das amostras do TanP, cujas concentrações testadas foram 5, 15, 30 e 50 μ M, bem como na ausência de peptídeo (controle negativo). As placas foram incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições citadas anteriormente. Por fim, na ausência de luz, 100 μ L de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada por mais 4 horas. Após este período, o meio foi aspirado novamente, sendo então adicionados 100 μ L de Álcool Etilíco PA para dissolver os cristais de formazan precipitados. Os resultados foram avaliados por medida de absorbância no comprimento de onda de 570 nm, utilizando o Leitor de Elisa Epochn. O ensaio foi realizado em triplicata e a taxa de proliferação foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Proliferação celular (\%)} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle negativo}} * 100$$

Onde Abs corresponde ao valor da absorbância.

4.3.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO) em meio de cultura celular pelo método de Griess

A produção de NO por macrófagos, *in vitro*, foi determinada pelo método de Griess (GREEN et al., 1982), o qual avaliou a presença de nitrito no sobrenadante da cultura das células.

Em uma placa estéril de 24 poços foram adicionadas cerca de 3×10^5 células RAW 264.7, em meio DMEM acrescido de 10% de SBF, para um volume final de 500 μ L/poço. As placas foram incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada com ambiente interno a temperatura de 37 °C contendo 5% de CO₂. Transcorrido esse período, as células foram submetidas à etapa de carenciamento, onde o meio foi retirado e adicionado 500 μ L/poço de meio sem SBF. Após 24 horas de incubação, nas mesmas condições já citadas, o meio foi removido, e as células foram tratadas da seguinte forma: apenas na presença do agente indutor de resposta imunológica (2 μ g/mL de LPS, lipopolissacarídeo bacteriano) (controle positivo), com TanP (5, 15, 30 e 50 μ M) e LPS (2 μ g/mL), apenas TanP (5, 15, 30 e 50 μ M), e sem tratamento (controle negativo). Sendo o volume final de cada poço de 500 μ L. Para todos os casos TanP foi previamente dissolvido em meio DMEM acrescido de 10% de SBF. O LPS fora dissolvido em meio DMEM.

As placas foram incubadas por 24 horas, nas mesmas condições citadas e após esse período, foram transferidos 100 μ L do sobrenadante de cada poço para uma placa estéril de 96 poços, somado a 100 μ L do reagente de Griess (Sigma-Aldrich, Inc. FLUKA). Após 10 minutos, à temperatura ambiente, as leituras de absorbância foram realizadas em 540 nm utilizando o Leitor de Elisa Epochn. A quantidade de nitrito foi calculada a partir da equação da curva padrão de nitrito de sódio (1,25 a 20 μ M).

4.3.5 Atividade de Sequestro de radicais livres (ASRL)

A fim de avaliar o possível potencial antioxidante do TanP, uma vez que o fato de ser um agente quelante de metal de transição Cu²⁺ já pode ser um indicativo de tal atividade, foi realizado o ensaio de sequestro de radical 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante, o DPPH (cor púrpura) é reduzido formando difenil-picril-hidrazina (coloração amarela), com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (MENSOR et al., 2001).

A ASRL do TanP foi avaliada em concentrações variando de 1,05, a 50 µM. Um controle negativo foi feito utilizando etanol e DPPH (150 µM). O controle positivo consistiu numa solução padrão de ácido ascórbico 500 µg/mL e DPPH (150 µM). Como branco foi utilizado amostras do TanP acrescidas de etanol. As amostras foram colocadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 30 minutos, e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 517 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

A ASRL foi calculada a partir da seguinte equação (TORRES-FUENTES et al., 2015):

$$ASRL (\%) = \left(\frac{(\text{Abs Controle Negativo} - \text{Abs TanP})}{\text{Abs Controle Negativo}} \right) * 100$$

Onde:

Abs TanP é a absorbância do TanP + DPPH;

Abs controle Negativo é a absorbância do DPPH + Etanol;

4.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata sendo a análise estatística realizadas utilizando o ANOVA *one way* seguido do teste de Turkey com comparações múltiplas utilizando o software GraphPad Prism (EUA).

5.0 Resultados e Discussão

5.1 Análise de Bioinformática

A tradução do *cluster* TSTI0012C determinado pelo programa *ORF-Finder* e *ExPASy* resultou numa sequência de 74 resíduos de aminoácidos (Figura 7). O sítio de clivagem foi predito entre a posição 24 – 25 (TEA-YP). Não foi identificado região

de pró-peptídeo, nem domínios conservados. O peptídeo maduro contém 50 resíduos de aminoácidos, massa molar teórica de 5,815 kDa e o ponto isoelétrico de 2,75.

Trata-se de uma sequência rica em resíduos de Asp, livre de cisteínas, sem ligações dissulfeto, e com carga líquida igual a -20, caracterizando-o assim como um peptídeo aniônico.

Figura 7- Sequência do peptídeo aniônico do *T. stigmurus* obtida a partir da tradução do cDNA TSTI0012C utilizando programa ORF-Finder. Em itálico o peptídeo sinal. Em negrito e sublinhado o peptídeo maduro. Em amarelo os resíduos ácidos e em rosa os resíduos hidrofóbicos.

*MVSKSLIVLLLVSVLVSTFFTTEAY***PAS****FDDDDFDALDDLDDLDDLLDLEPADLVLL**
DMWANMMDSQDFEDFE

Fonte: Dados obtidos e analisados

O precursor do BmKa2, peptídeo aniônico identificado em *B. martensii*, é composto por um peptídeo sinal de 24 resíduos e uma sequência madura sem nenhum pró-peptídeo (ZENG; CORZO; HAHN, 2005), assim como o TanP identificado neste trabalho, porém ambos diferem na carga líquida total, uma vez que o BmKa2 possui carga de -13. Peptídeos aniônicos identificados em *T. costatus* possuem carga líquida semelhante, variando de -19 a -20 (DIEGO-GARCÍA et al., 2005b). O fato de serem escorpiões de mesmo gênero pode contribuir para semelhança dos peptídeos.

A sequência do TanP analisada no *blastp* apresentou similaridade com peptídeos aniônicos de outros escorpiões, anteriormente identificados, como mostra o alinhamento a seguir (Figura 8):

Fonte: Dados obtidos e analisados

Através do alinhamento global (Figura 8), observa-se conservação entre as sequências independente do gênero do escorpião, podendo inferir que tais peptídeos são moléculas essenciais à composição da peçonha, uma vez que suas características padrões são mantidas ao longo da evolução.

A conservação dos resíduos de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E), bem como resíduos hidrofóbicos, como Leucina (L), Alanina (A) e Tirosina (Y)

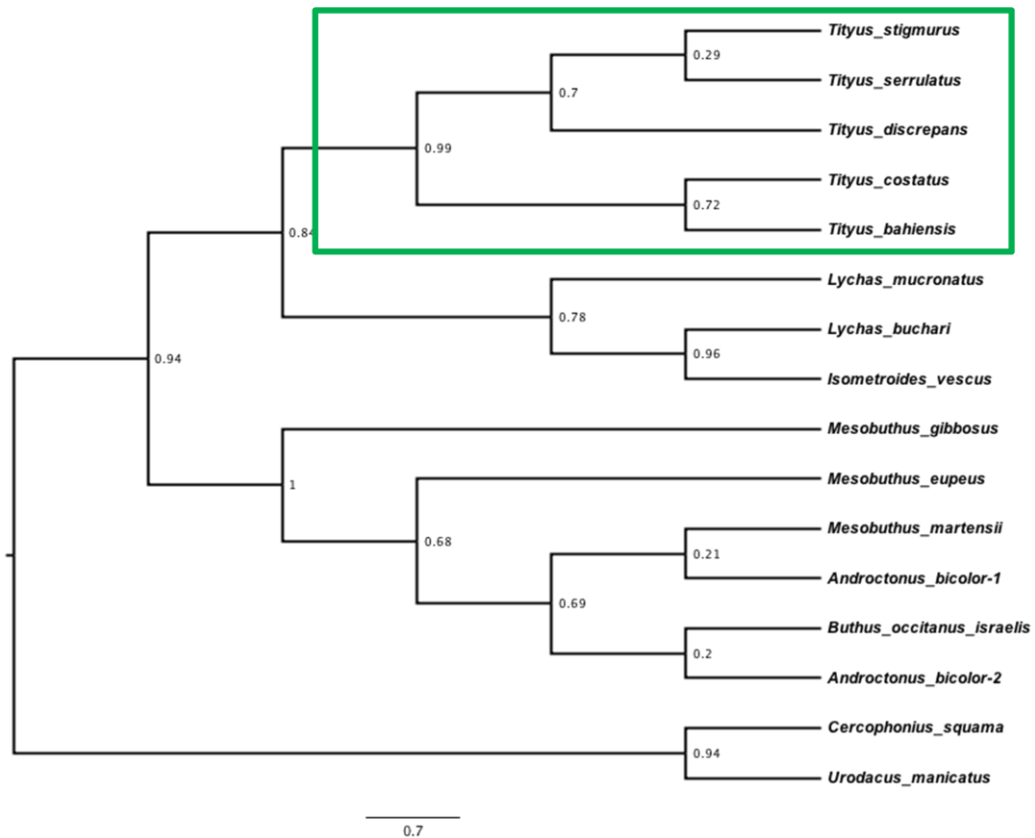
podem indicar que tais aminoácidos são essenciais à estrutura e atividade do peptídeo, além de lhes conferir as características aniônica e hidrofóbica. Percebe-se que as substituições que ocorrem são por aminoácidos de mesma característica química. A ausência de resíduos básicos pode refletir no enovelamento do peptídeo, uma vez que o excesso de carga negativa proveniente de D e E impede a formação de pontes salinas ou interações iônicas, que compõem a estrutura terciária de uma proteína ou peptídeo.

A importância da caracterização dos PSPDs é sustentada por sua diversidade biológica e estrutural associada à multiplicidade de seus potenciais efeitos sobre os alvos (QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2015). Diversas funções biológicas já foram determinadas para os PSPDs encontrados em várias espécies de escorpiões, como antimicrobiana, hemolítica, anticancerígena, anti-inflamatória, imunomoduladora e atividades de potenciação da bradicinina, além de atividades multifuncionais (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014).

5.2 Análise Filogenética

Para inferir as relações filogenéticas entre os peptídeos aniônicos das peçonhas de escorpiões, uma árvore filogenética contendo 16 espécies distintas (Figura 9) foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1992) e com o modelo LG. Esta análise foi realizada com o arquivo de sequências de aminoácidos alinhados pelo MAFFT.

Figura 9- Dendrograma entre TanP e demais peptídeos aniônicos de diversas espécies de escorpião. Obtido pelo método de Máxima Verossimilhança e o modelo LG. Aplicação dos algoritmos Neighbor-Join e BioNJ. Visualização no programa FigTree v.1.4.2.



Fonte: Dados obtidos e analisados

A topologia do dendrograma (Figura 9) ilustra que o peptídeo aniônico de *T. stigmurus* agrupou-se nos mesmos ramos que os peptídeos das outras espécies pertencentes ao gênero *Tityus* os quais são separados por uma dicotomia dos peptídeos do gênero *Lychas*. Outro ramo da árvore filogenética é composto por indivíduos da ordem *Mesobuthus*, *Androctonus* e *Buthus*. E como *outgroup* foram observadas as sequências oriundas de espécies pertencentes à família Scorpionidae.

A organização dos gêneros dentro da árvore filogenética está em concordância com o que foi descrito por SHARMA et al., (2015), que realizou a filogenia de 25 espécies distintas de escorpiões utilizando uma compilação de dados transcriptômicos, e observou que as espécies pertencentes ao gênero *Tityus*, conhecidos como Buthidae do Novo Mundo, se agrupavam mais proximamente dos *Lychas* e *Isometrus*, ambos encontrados na Ásia, do que com os transcritos de

Mesobuthus e *Androctonus*. Os dados também são consistentes com os achados de FET et al., (2003) o qual realizou a primeira filogenia do grupo Buthidae baseando-se em sequências de rRNA 16S.

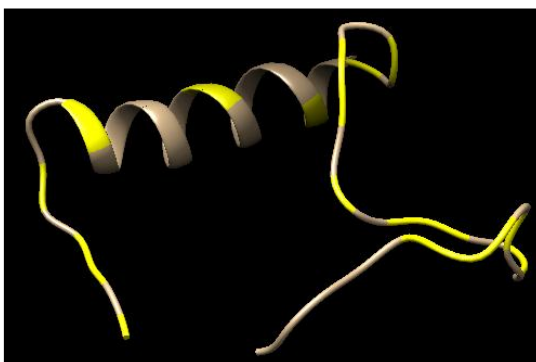
5.3 Modelagem *ab initio* e dinâmica molecular

Os métodos *ab initio* baseiam-se no fato de que a estrutura nativa de uma proteína corresponde ao mínimo global de sua energia livre e assim conseguem prever novas formas de enovelamento, pois, não estão limitados a proteínas que possuem sua estrutura já conhecida como na modelagem comparativa por homologia e no alinhamento (ROCHA, 2014).

A modelagem *ab initio* foi escolhida diante da inviabilidade da técnica por homologia, uma vez que não havia *templates* disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*) que fossem homólogos ao peptídeo em estudo.

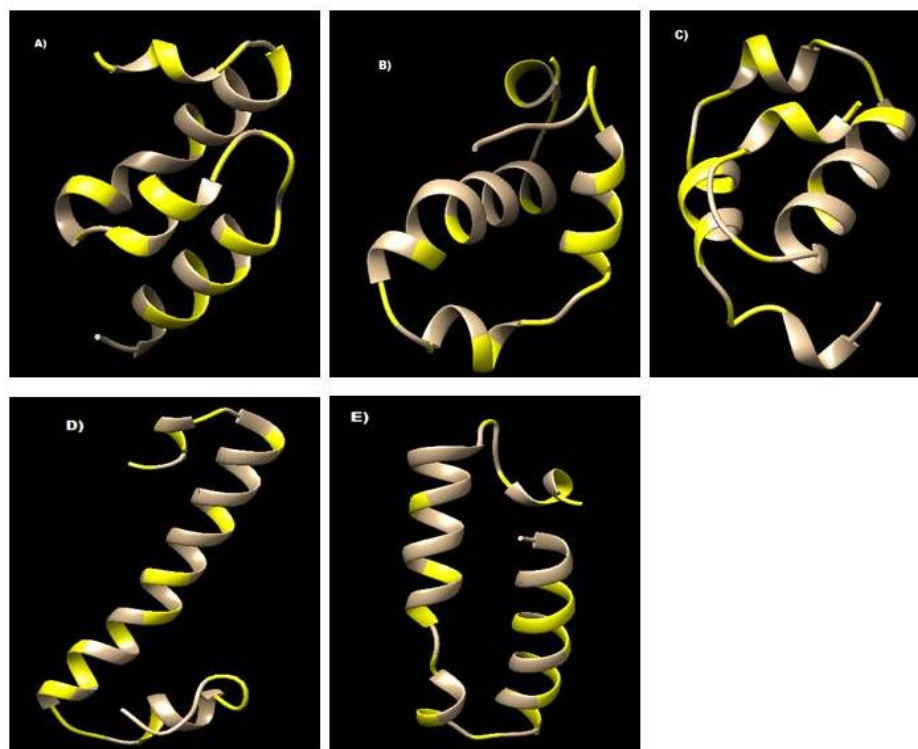
Obteve-se um modelo a partir do AIDA (Figura 10) e cinco modelos a partir do Robetta (Figura 11).

Figura 10 – Modelo tridimensional do TanP obtidos pelo AIDA. O modelo foi visualizado usando o software UCSF Chimera. Em amarelo os resíduos ácidos.



Fonte: dados obtidos e analisados

Figura 11 – Modelos tridimensionais do TanP obtidos pelo Robetta. O modelo foi visualizado usando o software UCSF Chimera. Em amarelo os resíduos ácidos.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Os modelos obtidos apresentaram conformação randômica e em α -hélice. Verifica-se que os resíduos ácidos (amarelo) estão voltados para a região de contato com o solvente do meio.

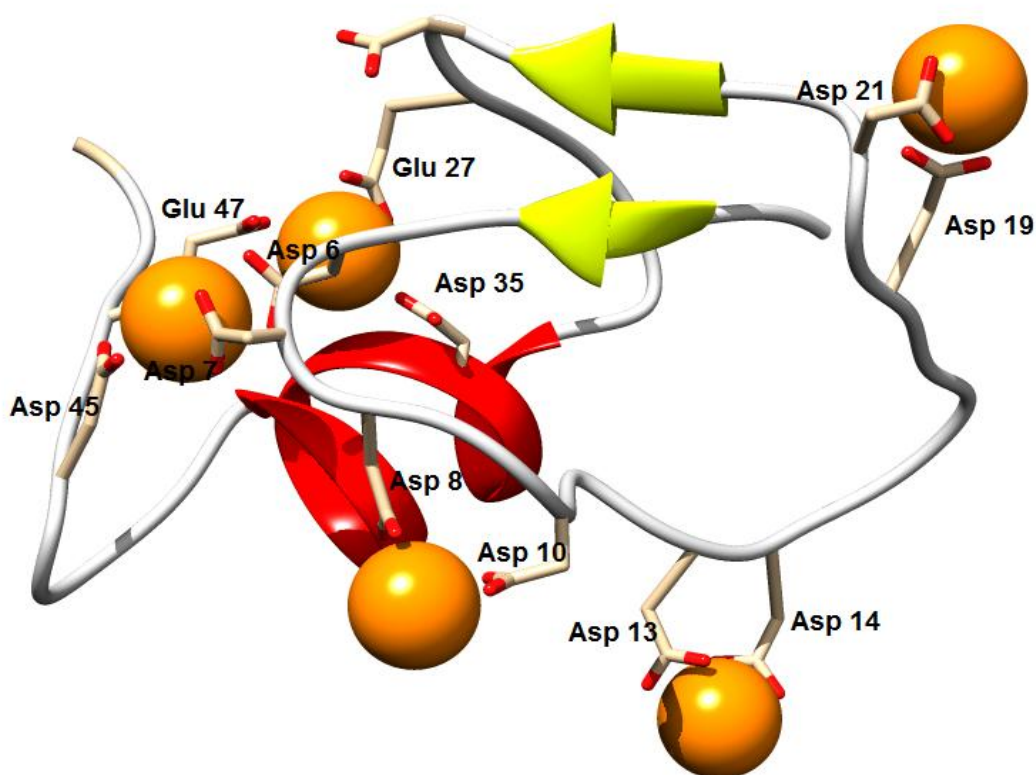
A predição da estrutura secundária do peptídeo aniônico BmKa2, de caráter anfipático, apresentado por Zeng *et al.* (2004), utilizando software *on-line*, sugere a presença de três regiões randômicas separadas por dois domínios α -hélices e ausência de β -folhas. Tais características se assemelham ao TanP, pois sua modelagem molecular também não apresentou regiões com β -folhas.

O modelo obtido pelo AIDA (Figura 10) apresentou *Molprobability score* de 2,54, enquanto para os demais modelos (robetta) o *score* foi 1,65. Adicionalmente, foi avaliado informações sobre a qualidade estrutural do modelo com base no diagrama de Ramachandran. A análise indicou cerca de 90 a 100% dos resíduos em regiões favoráveis para todos os modelos avaliados. O modelo obtido pelo AIDA foi utilizado para refinamento e análise de ligação com íons Cu^{2+} , através da dinâmica molecular

(DM). Trata-se de um modelo mais flexível, tendo maior possibilidade de enovelamento. Dados experimentais (dicroísmo circular) foram determinantes na escolha do modelo para DM.

A Figura 12 apresenta a estrutura tridimensional do peptídeo obtida após 0,8 μ s de simulação, com os íons Cu^{2+} complexados. Verificou-se que os íons se ligaram apenas aos resíduos ácidos do peptídeo, especificamente aos grupamentos COO^- presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos Asp e Glu. Os grupos carboxílicos são considerados sítios de alta afinidade para ligação de metais, através de interações eletrostáticas e iônicas com cobre (ZHU et al., 2008). Dos 10 Cu^{2+} disponíveis, 5 foram complexados pelo TanP, conferindo uma razão molar de quelação de 1 : 5 (peptídeo : Cu^{2+}). Ao final da simulação, TanP sofreu alteração conformacional, apresentando uma estrutura com duas β -folhas (em amarelo) e uma porção de α -hélice (em vermelho).

Figura 12- Ligação de íons Cu^{2+} ao TanP. Os metais Cu^{2+} (em laranja) interagem diretamente com os grupos carboxilatos presentes na cadeia lateral de Asp e Glu. O modelo foi visualizado usando o software UCSF Chimera.

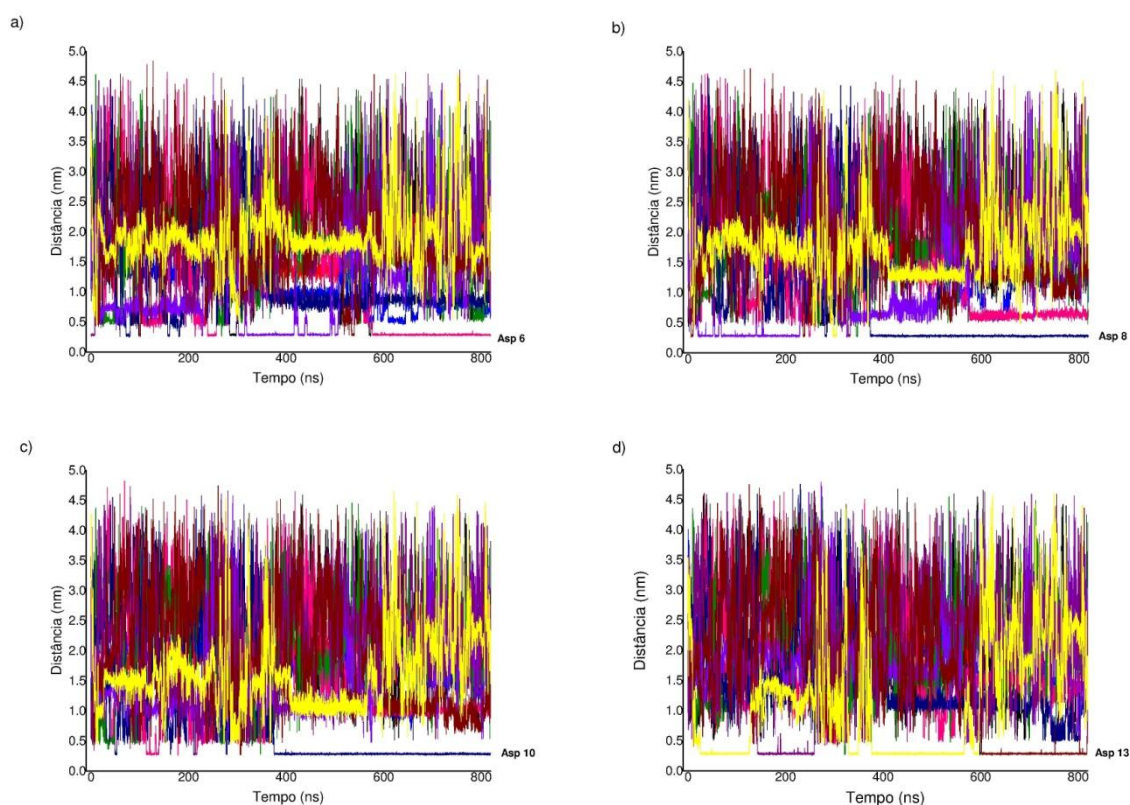


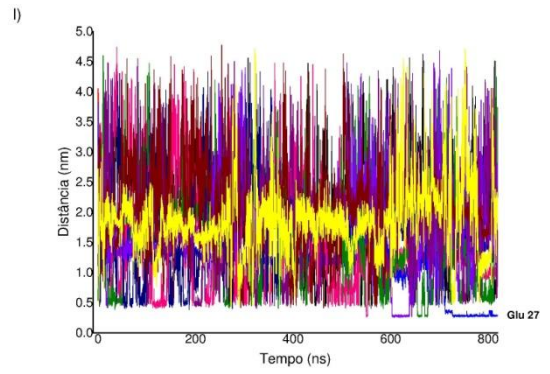
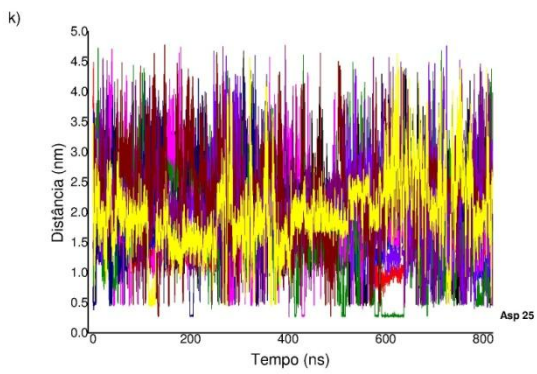
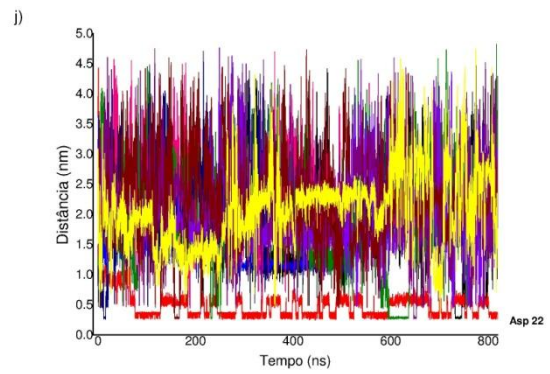
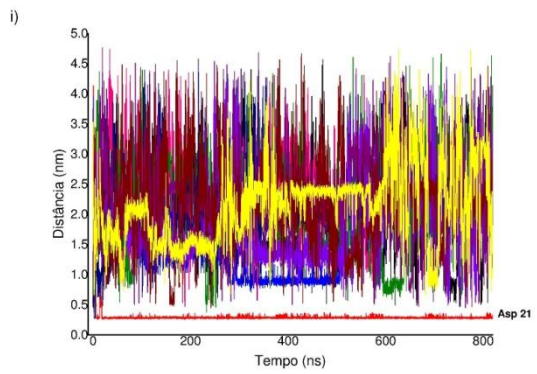
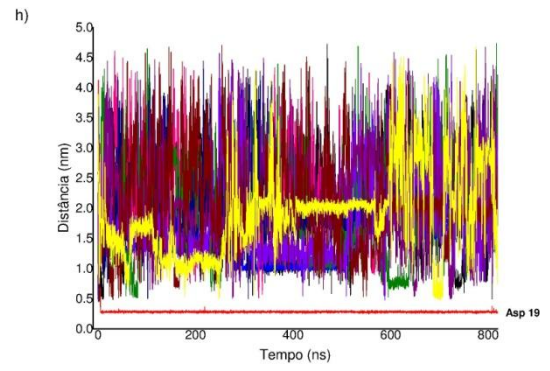
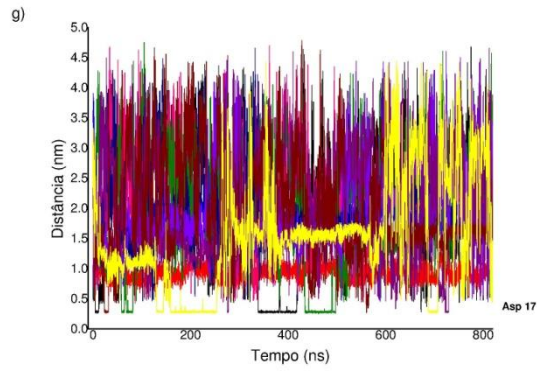
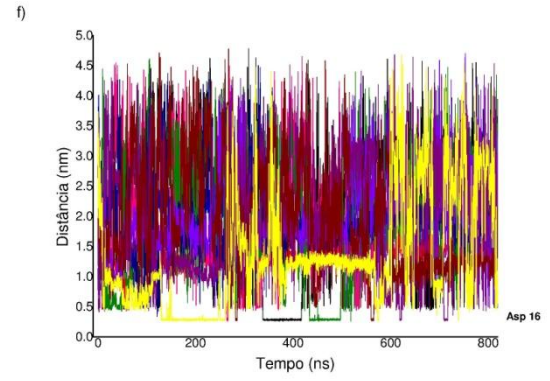
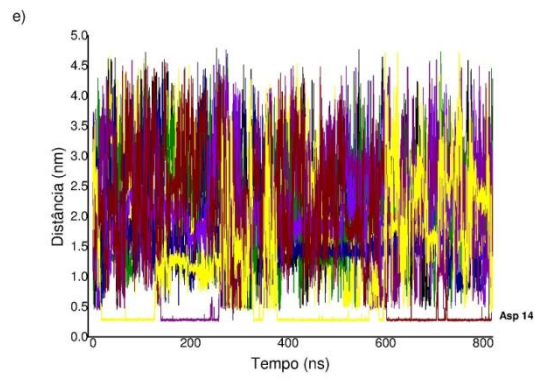
Fonte: Dados obtidos e analisados.

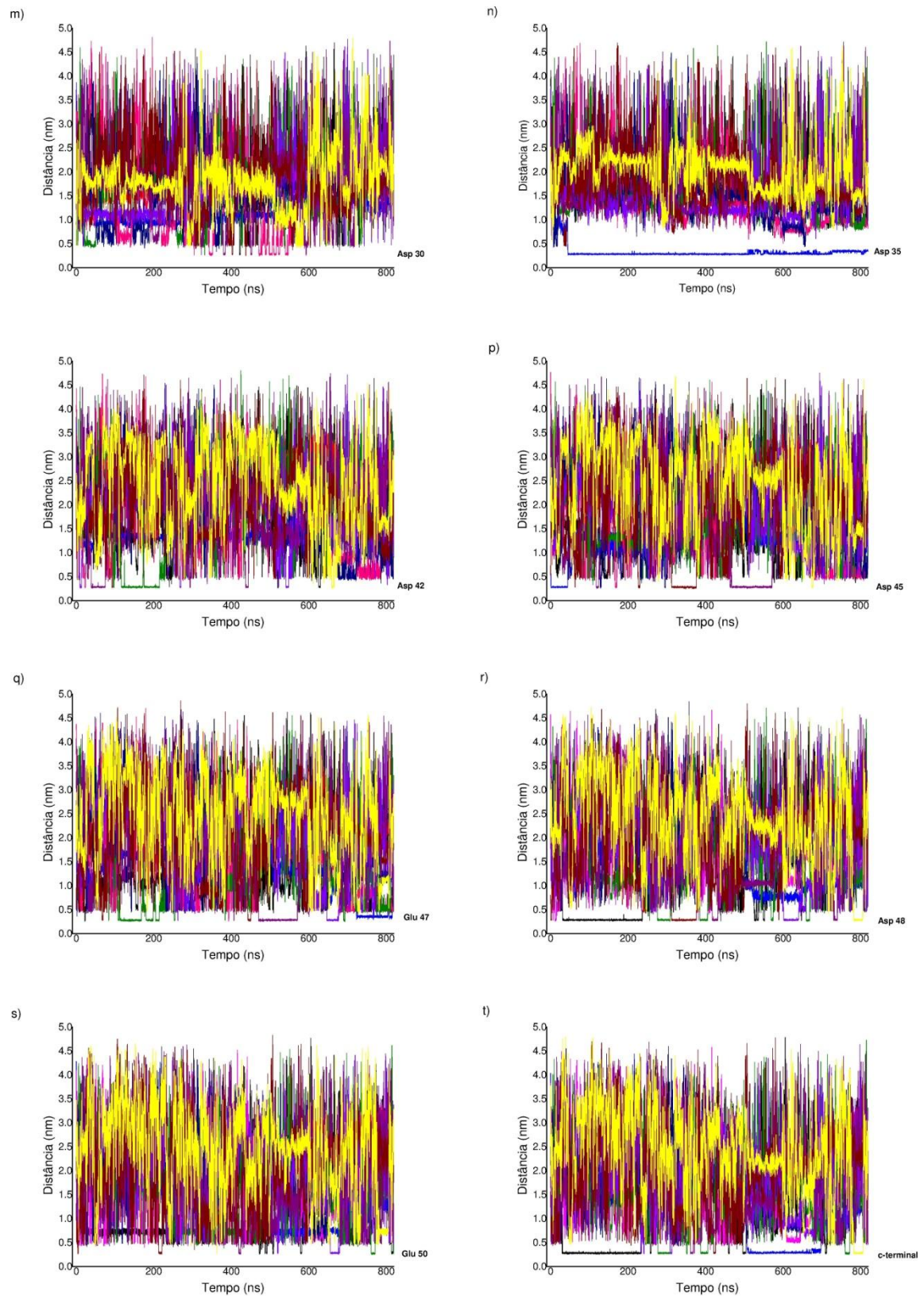
A Figura 13 apresenta graficamente as distâncias de cada metal ao grupamento COO^- de Asp e Glu, bem como da porção c-terminal durante o período da simulação. Quando a distância torna-se constante em função do tempo, até o final da simulação, tem-se evidenciado uma situação de quelação do peptídeo ao íon Cu^{2+} , como observado em 13a, 13b, 13c, 13d, 13e, 13h, 13i, 13l, 13n e 13q.

É importante notar que alguns íons não obrigatoriamente foram complexados por apenas um resíduo de aminoácido (Figura 13a), sendo quelados por dois ou mais diferentes resíduos (Figuras 13b e 13c, 13d e 13e, 13h e 13i, 13l 13m e 13q) e essa condição pode ter favorecido o enovelamento do peptídeo, uma vez que sua conformação estrutural modificou.

Figura 13- Pontos de Quelação dos íons Cu^{2+} no TanP detectados pela análise de distância em função do tempo.





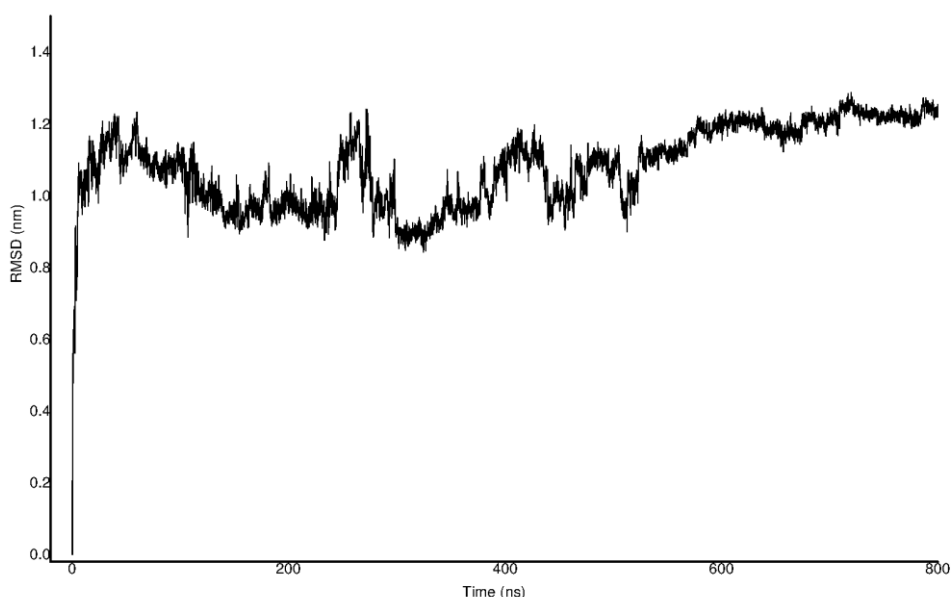


Fonte: Dados obtidos e analisados.

Em estudo anterior apresentado por Silva e colaboradores (2009), foi visto que o peptídeo aniônico microplusina complexava íons cobre através dos resíduos de histidinas presente na região N-terminal e C-terminal, dados esses que diferem dos apresentados neste trabalho, em que os resíduos ácidos que foram responsáveis pela complexação.

A estabilidade da estrutura gerada na simulação foi avaliada pelo RMSD (Figura 14). O valor médio do RMSD e seu respectivo desvio padrão foi $1,214 \pm 0,027$ nm. O pequeno desvio padrão é característico de uma estrutura equilibrada.

Figura 14- RMSD em função do tempo para TanP

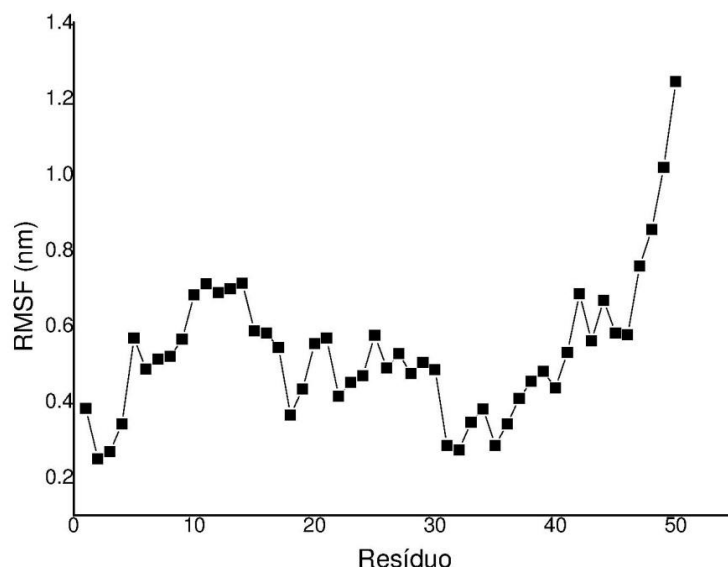


Fonte: Dados obtidos e analisados

O valor de RMSD representa a variação da posição do peptídeo ao longo da dinâmica, em relação à sua posição no primeiro ns de simulação. Como pode ser percebido, a partir de 400ns o peptídeo apresenta certa estabilidade no valor de RMSD.

Para avaliar a variação da posição de cada resíduo de aminoácido durante a DM obtivemos o gráfico do RMSF (Figura 15). Foi observado que a porção C-terminal não tem estrutura bem definida, uma vez que apresentou valor de RMSF elevado quando comparada aos demais resíduos do peptídeo.

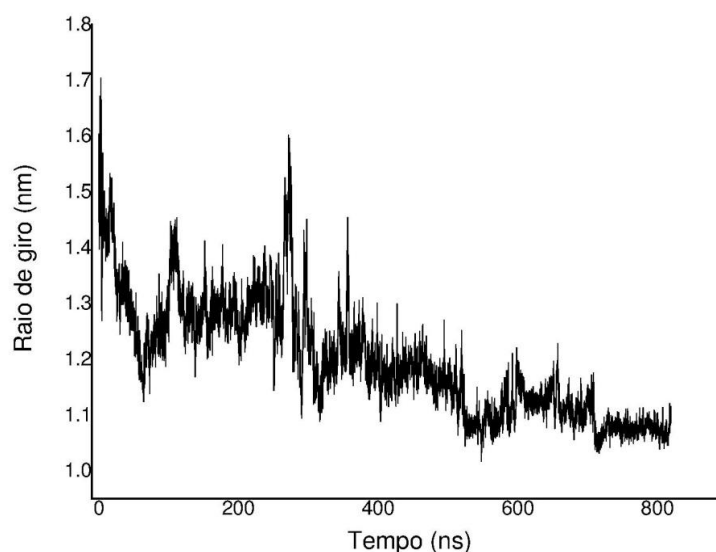
Figura 15- RMSF por resíduo de aminoácido



Fonte: Dados obtidos e analisados

O raio de giro calcula o raio de rotação de um grupo de átomos e os raios de rotação do peptídeo sobre os eixos X, Y e Z, em função do tempo. Na Figura 16 observa-se que no início da simulação o raio de giro é maior e que há uma redução do mesmo ao final da simulação. Desta forma podemos sugerir que houve enovelamento do peptídeo, diminuindo as interações da cadeia principal com o solvente do meio. Pode-se sugerir, também, que a presença dos metais complexados ao TanP influenciou no dobramento da molécula.

Figura 16- Raio de Giro do TanP em função do tempo



Fonte: Dados obtidos e analisados

5.4 Solubilização do peptídeo sintético

Para realização dos experimentos de CD, ensaios *in vitro* (exceto com células) e de complexação de metais, foi necessário solubilizar o peptídeo sintético. Para tanto foram seguidas as recomendações contidas no manual da empresa fabricante. As soluções de peptídeo foram preparadas na proporção de 1 mg do peptídeo sintético, em 1 mL de água destilada e 10 μ L de hidróxido de amônio (NH_4OH) 5%, sendo a concentração final da base na solução de, aproximadamente, 0,05%. O peptídeo foi insolúvel em água e solução salina.

5.5 Estrutura Secundária do TanP predita por espectrometria CD

A fim de elucidar a provável estrutura secundária do TanP e o equilíbrio entre diferentes estados conformacionais do peptídeo em um dado ambiente, ensaios de CD foram realizados.

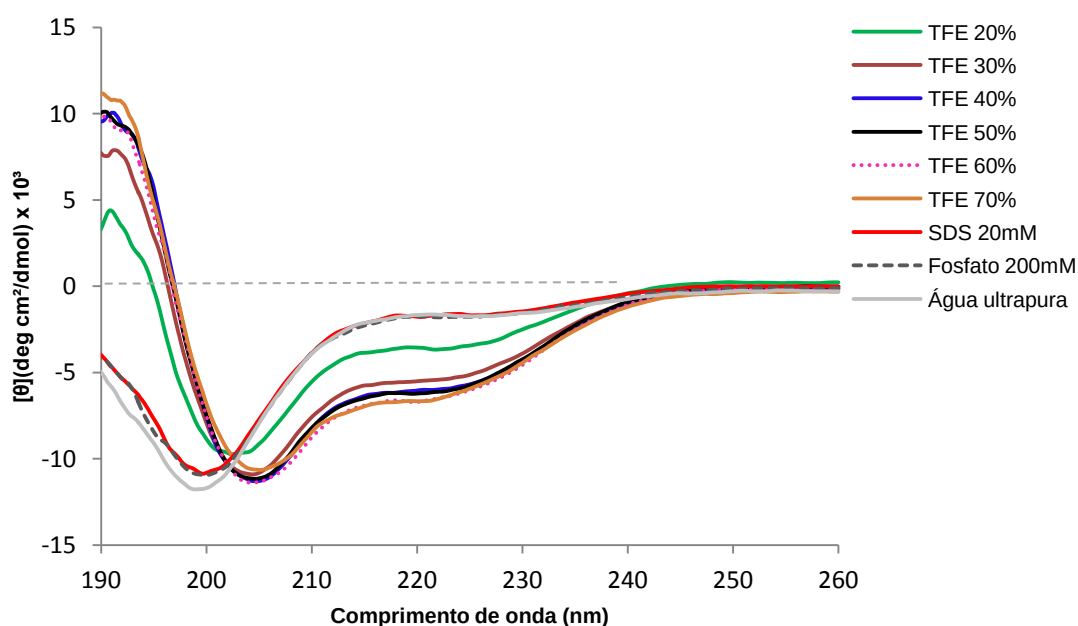
As proteínas e peptídeos exibem uma absorção diferencial da luz circularmente polarizada em virtude de dobramentos específicos que definem sua estrutura secundária, como α -hélices, β -folhas pregueadas e regiões desordenadas (randômicas) (MICSONAI et al., 2015).

Inicialmente foi avaliado o comportamento estrutural do TanP (51,54 μM) em água ultrapura, TFE 20% a 70% (v/v), Tampão Fosfato de Sódio 200 mM pH 7,4 e SDS 20 mM (Figura 17). Em todos os casos manteve-se a concentração de NH_4OH de 0,0125% na cubeta, inclusive para o branco.

Em água, tampão fosfato 200 mM e SDS 20 mM os espectros foram similares, apresentando valores mínimos em aproximadamente 195 nm, típico de estrutura randômica. A deconvolução mostrou que nestes meios o TanP apresentou menos que 10% de estrutura α -hélice, sendo o percentual de estrutura randômica predominantemente, seguido de β -folha (Tabela 01).

Entretanto, na presença de crescentes concentrações de TFE, um solvente lipofílico indutor de α -hélice (BUCK, 1998), a curva do sinal dicróico passou a adotar um padrão diferenciado, com formação de picos positivos em aproximadamente 192 nm e vales negativos em 208 e 222 nm, características típicas de peptídeos em conformação α -hélice (BÜRCK et al., 2008; GREENFIELD, 2009). Tal perfil foi mais representativo na presença de TFE 50% (v/v). Foi observado um aumento de cerca de 6 vezes do percentual de α -hélice quando comparado ao peptídeo em meio aquoso (Tabela 1).

Figura 17- Espectros de dicróismo circular do TanP em água, Tampão fosfato 200 mM, SDS 20 mM e TFE 20 a 70%.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Tabela 1- Estrutura secundária do TanP em diferentes meios calculada por deconvolução dos espectros CD. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão do percentual de estrutura secundária obtido nos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

Meio	α - hélice (%)	β -folha (%)	Randômica (%)
Água	3,6 $\pm$ 0,7	16,9 $\pm$ 6,2	75,5 $\pm$ 2,1
Tampão Fosfato	3,4 $\pm$ 0,6	24,4 $\pm$ 3,7	71,8 $\pm$ 3,9
SDS	3,3 $\pm$ 0,4	25,6 $\pm$ 4,9	70,2 $\pm$ 5,9
TFE 20%	9,0 $\pm$ 2,8	25,6 $\pm$ 5,0	64,8 $\pm$ 7,9
TFE 30%	18,5 $\pm$ 1,2	21,6 $\pm$ 4,0	59,1 $\pm$ 4,0
TFE 40%	21,7 $\pm$ 0,4	19,7 $\pm$ 2,7	58,3 $\pm$ 2,9
TFE 50%	21,1 $\pm$ 0,1	20,2 $\pm$ 2,6	58,3 $\pm$ 3,1
TFE 60%	21,6 $\pm$ 0,5	20,1 $\pm$ 2,9	58,1 $\pm$ 2,7
TFE 70%	21 $\pm$ 0,9	20,7 $\pm$ 2,2	57,9 $\pm$ 2,3

Fonte: Dados obtidos e analisados.

Um perfil semelhante ao TanP foi observado em espectros dicróicos do peptídeo aniônico de anfíbio, maxima H5, que apresentou maior porcentagem de estrutura randômica em meio aquoso, e em meio TFE/água (50% v/v) o peptídeo adquiriu perfil helicoidal (DENNISON et al., 2015).

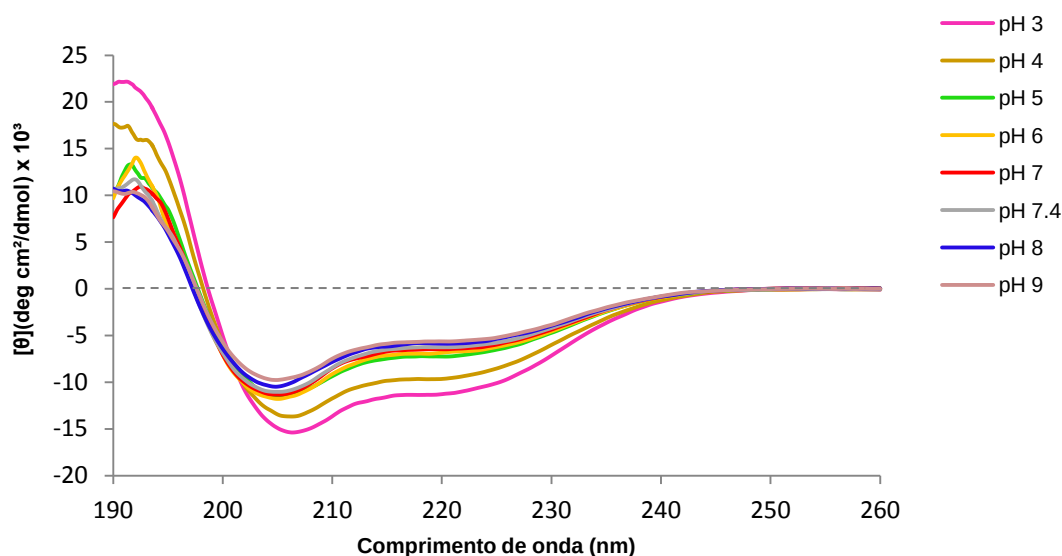
Da mesma forma o peptídeo aniônico DCD-1L, presente em humano, quando em água e tampão fosfato apresentou espectro de estrutura desordenada (PAULMANN et al., 2012). Já a microplusina, peptídeo aniônico de ovos de carrapato, rico em resíduos de histidina, apresentou conformação helicoidal em água (SILVA et al., 2009).

5.5.1 Avaliação da estabilidade estrutural do TanP em função da variação do pH por espectrometria CD

A análise de CD também permite avaliar a estabilidade estrutural de uma proteína, sob condições de mudanças de pH e/ou a temperaturas elevadas (KELLY; JESS; PRICE, 2005). O perfil estrutural do TanP foi avaliado em função da variação do pH (3 a 9) do meio, apresentando-se sensível a tal variação (Figura 18). Observa-se que em pH ácido há um maior percentual de conformação α -hélice e à medida

que o pH do meio aumenta, o percentual helicoidal diminui e a estrutura tende a formar β -folhas (Tabela 2).

Figura 18- Espectros do TanP em TFE 50% (v/v), obtidos por CD, submetido a diferentes condições de pH (3,0 – 9,0).



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Tabela 2 – Estrutura secundária do TanP em diferentes pH calculada por deconvolução dos espectros. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão do percentual de estrutura secundária obtida nos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

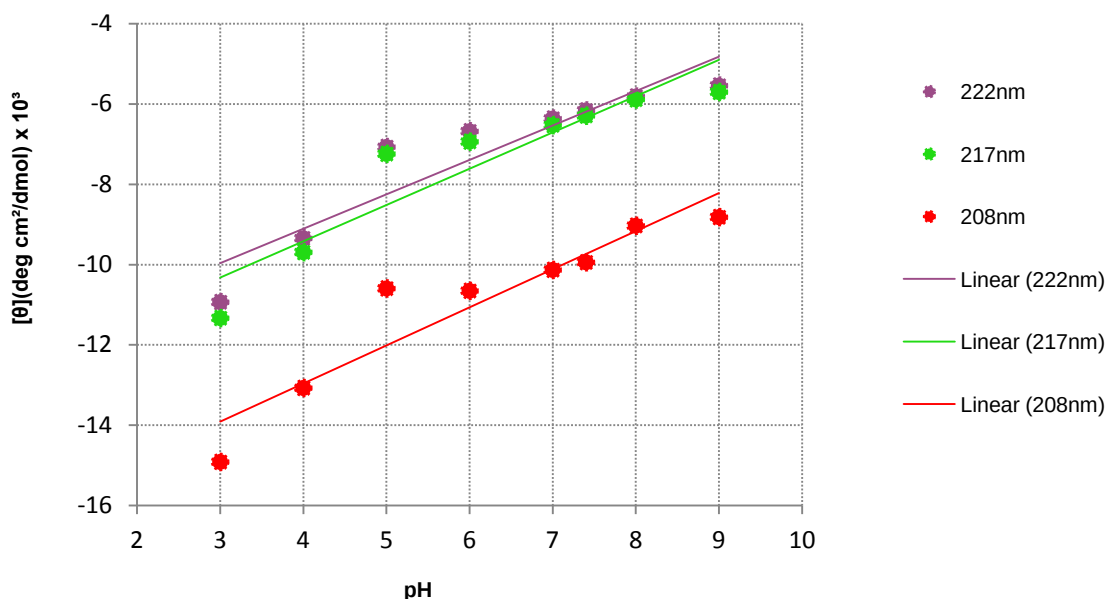
pH	α - hélice (%)	β -folha (%)	Randômica(%)
3,0	38,2 $\pm$ 1,6	12,8 $\pm$ 1,8	49,6 $\pm$ 4,0
4,0	35,8 $\pm$ 3,6	12,7 $\pm$ 2,7	51,0 $\pm$ 0,9
5,0	28,0 $\pm$ 7,0	15,8 $\pm$ 7,3	55 $\pm$ 2,6
6,0	28,6 $\pm$ 8,3	17,0 $\pm$ 8,0	53,6 $\pm$ 1,6
7,0	24,3 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 2,5	56,6 $\pm$ 2,3
7,4	21,7 $\pm$ 0,8	20,7 $\pm$ 2,5	57,4 $\pm$ 2,7
8,0	20,3 $\pm$ 0,4	21,1 $\pm$ 1,5	57,4 $\pm$ 3,9
9,0	18 $\pm$ 2,6	25,1 $\pm$ 5,5	55,8 $\pm$ 4,8

Fonte: Dados obtidos e analisados.

Sugere-se que há mudança conformacional de toda a estrutura do peptídeo em função da variação de pH, pois os vales em 208 e 222 nm (característicos de α -

hélice) variam proporcionalmente ao vale em 217 nm (característico de β -folha) (Figura 19).

Figura 19- Espectros do TanP em TFE 50% (v/v), obtidos por CD, submetido a diferentes condições de pH (3,0 – 9,0) nos comprimentos de onda 208, 217 e 222 nm.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Baixos valores de pH levam à protonação de aminoácidos, fornecendo carga positiva aos peptídeos (KACPRZYK et al., 2007). A protonação dos resíduos de Asp e Glu diminui o número de sítios disponíveis para a realização de ligações de hidrogênio com o solvente, fortalecendo as ligações intramoleculares que conferem as α -hélices e facilitando o enovelamento do peptídeo (THOMPSON, 2009).

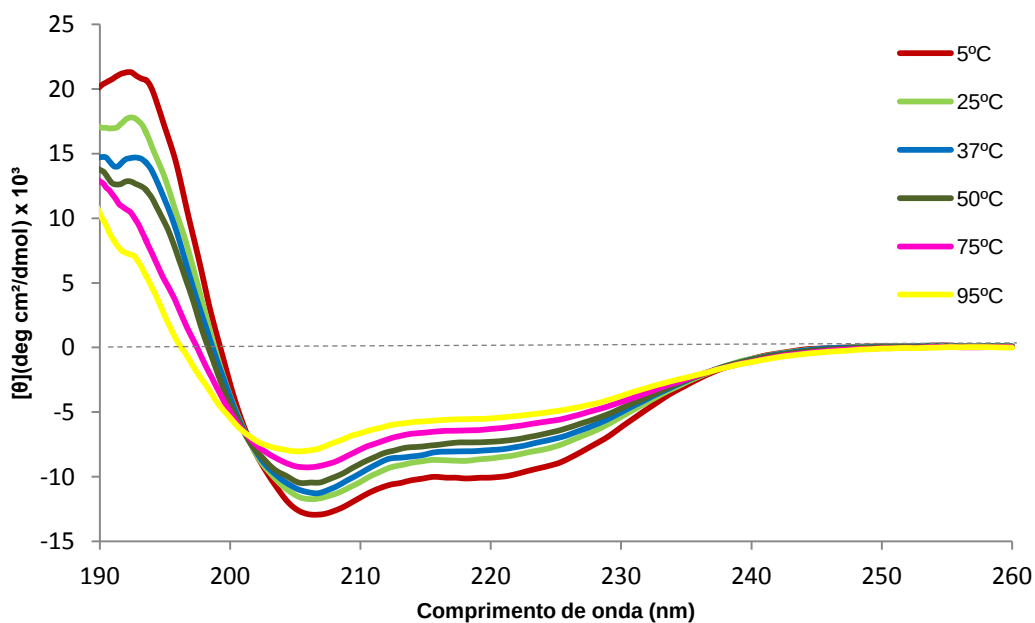
Os Asp e Glu possuem seus ácidos completamente desprotonados em pH neutro, sendo sua carga elétrica total, nesta faixa de pH, praticamente igual a -1 (BOSSA, 2013). O excesso de cargas negativas espacialmente disponíveis no peptídeo desestabiliza o enovelamento de proteínas, pois facilita a interação desta com o solvente, formando ligações de hidrogênio intermoleculares (ISOM et al., 2010).

5.5.2 Avaliação da estabilidade estrutural do TanP em função da temperatura por espectrometria CD

As alterações no CD em função da temperatura, a comprimentos de onda característicos, podem ser usadas para determinar a termodinâmica de desdobramento do peptídeo (GREENFIELD, 2009).

A Figura 20 apresenta a variação entre os espectros de CD do TanP em diferentes temperaturas. O peptídeo mostrou ligeiras alterações conformacionais nas temperaturas de 50 a 75 °C, tornando-se parcialmente desestruturado a 95 °C (Tabela 3).

Figura 20 – Espectros do TanP em TFE 50% (v/v) e pH 3, obtidos por CD, submetido a temperaturas diferentes (5 a 95 °C).



Fonte: Dados obtidos e analisados.

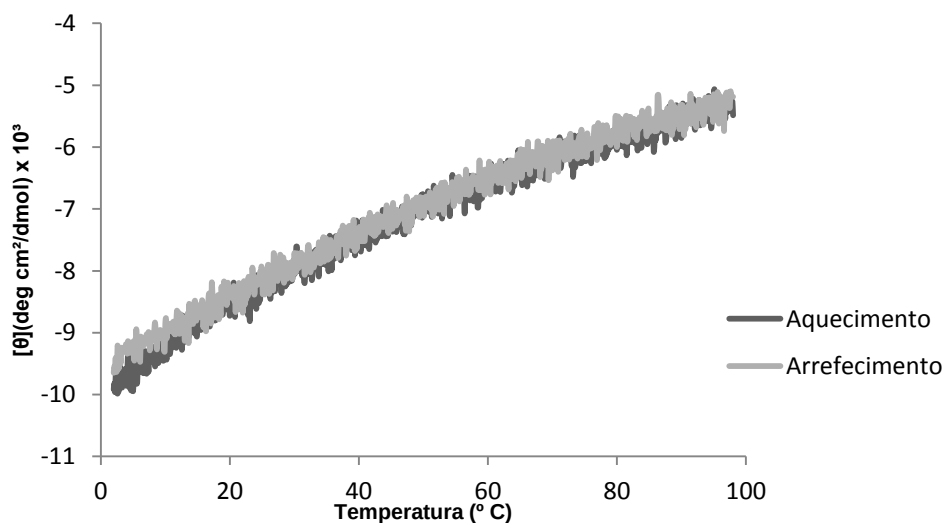
Tabela 3 – Estrutura secundária do TanP em TFE 50% e pH 3,0, em função do aumento de temperatura, calculado pela deconvolução dos espectros de CD (190 a 260 nm). Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP do percentual de estrutura secundária obtida pelos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

Temperatura (°C)	α -hélice (%)	β -folha (%)	Randômica (%)
5	39,8 $\pm$ 4,1	11,7 $\pm$ 6,5	48,3 $\pm$ 4,9
25	32,8 $\pm$ 3,0	18,8 $\pm$ 1,8	48,4 $\pm$ 2,6
37	32,5 $\pm$ 4,8	18,6 $\pm$ 1,6	48,2 $\pm$ 2,9
50	23,3 $\pm$ 0,5	21,4 $\pm$ 1,8	53,8 $\pm$ 4,0
75	19,0 $\pm$ 0,9	24,8 $\pm$ 1,2	55,1 $\pm$ 3,6
95	13,0 $\pm$ 4,4	26,1 $\pm$ 3,5	59,0 $\pm$ 8,8

Fonte: Dados obtidos e analisados.

A análise térmica, com comprimento de onda fixo, mostrou que o tratamento de aquecimento causou um aumento da elipticidade molar a 222 nm, que foi reversível quando a amostra voltou para a temperatura inicial do experimento (Figura 21). Sugerindo que o aumento da temperatura causa apenas perda temporária da estrutura de TanP, o que pode determinar certa estabilidade do peptídeo a variações de temperatura (Tabela 4).

Figura 21 – Avaliação do perfil estrutural do TanP em TFE 50% (v/v) em pH 3, submetido ao aquecimento e arrefecimento (2 – 98 ° C) em comprimento de onda fixo de 222 nm. Dados obtidos por CD.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Tabela 4 – Estrutura secundária do TanP em TFE 50% em pH 3,0, antes e após o tratamento térmico (2 a 98 °C) a um comprimento de onda fixo de 222 nm. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SD da porcentagem de estrutura secundária obtida através dos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

Condições de Temperatura	α-hélice (%)	β-folha (%)	Randômica (%)
Pré-aquecimento	33,13 $\pm$ 3,4	18,50 $\pm$ 1,4	48,20 $\pm$ 3,3
Após-resfriamento	28,10 $\pm$ 4,29	20,90 $\pm$ 0,7	50,40 $\pm$ 4,7

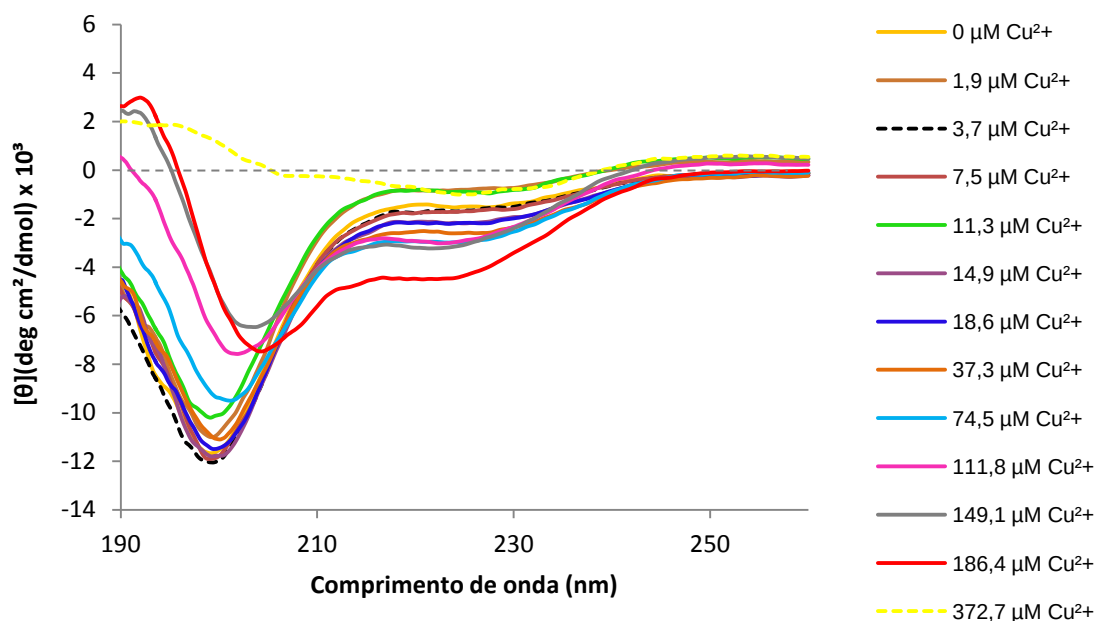
Fonte: Dados obtidos e analisados.

5.5.3 Análise da estrutura do TanP na presença de Cu²⁺ utilizando a técnica de CD

As mudanças estruturais em peptídeos provocadas pela interação com ligantes são uma parte essencial do mecanismo de ação e regulação da atividade biológica. O CD pode ser utilizado para determinar os efeitos dos ligantes sobre a estabilidade de proteínas e peptídeos (GREENFIELD, 2009) e ainda avaliar a concentração do ligante que causa alterações estruturais e a extensão das alterações no peptídeo de interesse (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Titulações sucessivas de íons Cu²⁺ alteraram o sinal espectral de CD do peptídeo. Desse modo, sugere-se que o metal bivalente realmente se liga ao TanP, como já havia sido sugerido diante dos resultados da DM. Na ausência e em baixas concentrações de íons Cu²⁺, o espectro foi típico de estrutura desordenada, com valores negativos de elipticidade molar em aproximadamente 195 nm. Porém à medida que a concentração de íons foi aumentada, verificou-se uma tendência à formação de vales característicos de α -hélice (208 e 222 nm), bem como valores positivos em 192 nm. O melhor perfil estrutural foi observado para a concentração de 186,4 μ M de Cu²⁺, sugerindo que a ligação do íon Cu²⁺ ao TanP ocorre a uma razão molar de peptídeo/metálico de 1: 3 (Figura 22).

Figura 22 - Espectros de CD do perfil estrutural do TanP e suas mudanças, devido adição de íons Cu^{2+} .



Fonte: Dados obtidos e analisados

A mudança do sinal dicróico em função da adição de íons Cu^{2+} à solução de TanP reflete que há interação do metal com o peptídeo. Além disso, acredita-se que essa ligação favorece o enovelamento do peptídeo, devido ao aumento considerável no percentual de α -hélice da estrutura. Na concentração 372,7 μM de Cu^{2+} houve perda significativa da estrutura, o que pode ser justificado pela precipitação do metal no meio, comprometendo a leitura do espectro. Não foram observadas mudanças significativas no percentual de estrutura β -folha, o qual se manteve praticamente constante, demonstrando que a ligação dos metais não afeta essa conformação (Tabela 5).

Tabela 5 – Estrutura secundária do TanP em função de concentrações crescentes de íons Cu^{2+} calculado por deconvolução dos espectros de CD. Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP do percentual de estrutura secundária obtida pelos algoritmos CDSSTR, Selcon3 e Contin/LL.

$[\text{Cu}^{2+}]$ (μM)	α- hélice (%)	β-folha (%)	Randômica (%)
0	$2,6 \pm 0,8$	$24,1 \pm 5,6$	$72,4 \pm 6,2$
1,9	$2,6 \pm 0,8$	$23,8 \pm 0,3$	$72,6 \pm 0,8$
3,7	$3,1 \pm 0,1$	$21,4 \pm 5,2$	$74,6 \pm 6,5$
7,5	$3,0 \pm 0,4$	$22 \pm 3,3$	$75 \pm 2,9$
11,2	$2,1 \pm 1,5$	$25,8 \pm 1,7$	$71,7 \pm 0,9$
14,9	$3,7 \pm 0,9$	$18,0 \pm 1,4$	$77,5 \pm 2,1$
18,6	$3,1 \pm 0,1$	$19,0 \pm 2,9$	$77,5 \pm 3,5$
37,3	$3,9 \pm 0,2$	$19,0 \pm 4,3$	$76,7 \pm 5,2$
74,5	$5,7 \pm 1,0$	$18,1 \pm 2,7$	$75,7 \pm 2,4$
11,8	$5,7 \pm 0,9$	$25,7 \pm 0,5$	$67,2 \pm 1,6$
149,1	$7,1 \pm 1,5$	$26,8 \pm 5,3$	$66,7 \pm 7,6$
186,4	$11,5 \pm 6,3$	$22,2 \pm 0,3$	$65,8 \pm 5,9$

Fonte: Dados obtidos e analisados.

A presença de metais pode favorecer a formação de ligações intramoleculares por meio das cadeias laterais de Asp ou Glu num peptídeo (BECUCCI et al., 2014). Sendo assim, a presença de ligantes específicos, como íons bivalentes, podem ser uma via alternativa para o favorecimento do enovelamento proteico (FOLLMER; NETTO, 2013).

Um ensaio de ligação de Cu^{2+} com BSA, avaliado por espectroscopia CD, demonstrou a formação de complexos na razão molar de 1: 1 (Cu^{2+} : BSA), com o íon se ligando aos resíduos de ácido aspártico, tirosina e histidina, localizados na porção N-terminal da proteína (PESSOA et al., 2009). Tal proporção de ligação é inferior à apresentada neste trabalho, uma vez que através da análise de CD verificamos que uma molécula de TanP pode se ligar a três átomos de cobre (II).

Com base em análises de CD, verificou-se que íons bivalentes alteraram a estrutura do peptídeo aniônico humano DCD-1L, favorecendo estabilização de α -hélices, o que acarretou numa melhor atividade antimicrobiana (BECUCCI et al., 2014). Mudanças conformacionais também foram visualizadas, através da técnica

de RMN, na estrutura do peptídeo aniônico Kappacina, quando em presença de íons bivalentes cálcio e zinco (DASHPER et al., 2005).

Os resultados experimentais de CD corroboraram com o que foi demonstrado *in silico* pela DM na presença de íons Cu^{2+} . Em ambas as situações o TanP apresentou predomínio de estrutura randômica na ausência do íon bivalente, porém a presença dos íons metálicos complexados à molécula favoreceu o dobramento do peptídeo, dando-lhe uma conformação, ainda que predominantemente randômica, com presença de β -folhas e α -hélices.

5.6 Avaliação da Reatividade do TanP com Cu^{2+}

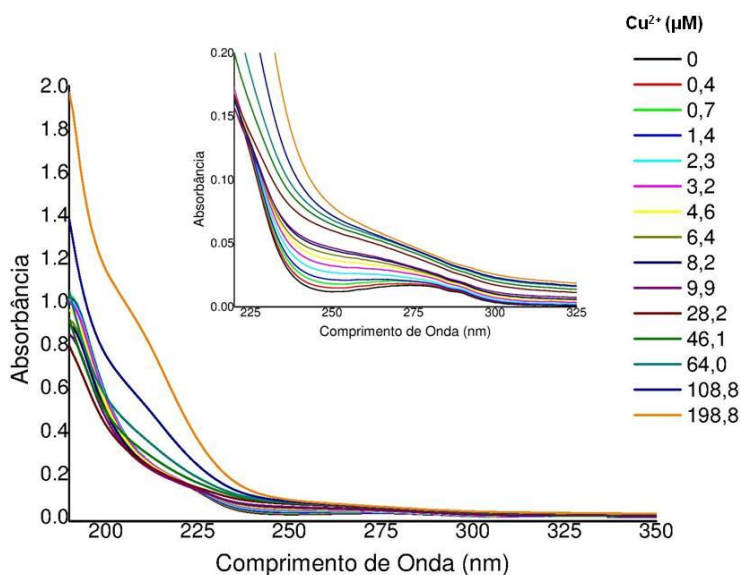
Peptídeos quelantes de metais são, geralmente, compostos de resíduos de histidina, serina, cisteína, ácido aspártico e glutâmico (WANG; LI; AO, 2012). Sendo a maioria deles com alto teor de Glu e Asp (STORCKSDIECK; BONSMANN; HURRELL, 2007). Medidas espectroscópicas, como o UV-Vis e CD são usadas para avaliar as constantes de estabilidade, estequiometria e estruturas geradas a partir da reatividade entre o metal e peptídeo (WANG; LI; AO, 2012).

Diante dos resultados obtidos na DM e CD, resolveu-se avaliar a possível ação quelante do TanP em relação ao íon Cu^{2+} por meio do acompanhamento, via espectroscopia Uv-Vis, das alterações espectrais resultantes da reatividade de uma solução de TanP frente a concentrações variadas do metal.

No primeiro experimento, em que a concentração de TanP na cubeta foi de 2,11 μM , pode-se verificar que o aumento gradativo de Cu^{2+} à solução inicial do peptídeo resultara em alterações no perfil do espectro.

Na figura 23 foi observado um aumento das absorbâncias em função de adições sucessivas de Cu^{2+} , sendo estas alterações mais evidentes nos comprimentos de onda 255 e 275 nm. Podendo-se sugerir que houve formação de um complexo “peptídeo-metal”.

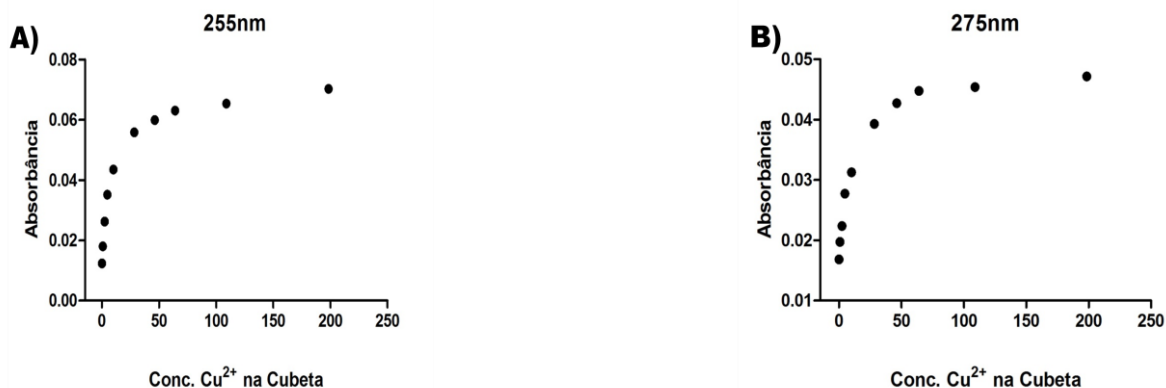
Figura 23 - Acompanhamento Uv-Vis da reação entre TanP (2,11 μM) e diferentes concentrações de Cu^{2+} . Sobreposição de todos os espectros obtidos em meio aquoso da reação entre o TanP (2,11 μM) e diferentes concentrações de Cu^{2+} , variando de 0 a 198,8 μM . Gráfico inserto para destacar a variação em 255 e 275 nm.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Ao avaliar a absorbância nos comprimentos de onda específicos 255 e 275 nm, nota-se que a partir de, aproximadamente, 14,7 μM de Cu^{2+} a absorbância tende a se manter constante. Nesta concentração, provavelmente, houve saturação dos sítios de ligação do metal no peptídeo, chegando-se ao ponto estequiométrico da reação (Figura 24). Neste caso, sugere-se que íons Cu^{2+} se ligam ao TanP numa razão molar de 1: 7 (TanP : Cu^{2+}).

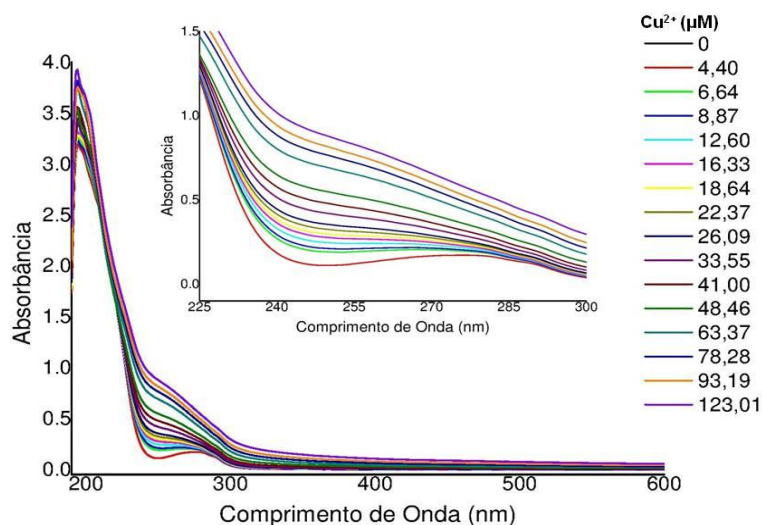
Figura 24- Variação da absorbância do TanP (2,11 μM) em função da concentração de Cu^{2+} . (A) Absorbância *versus* concentração do Cu^{2+} (μM) no comprimento de 255 nm. (B) Absorbância *versus* concentração do Cu^{2+} (μM) no comprimento de 275 nm.



Fonte: Dados obtidos e analisados

O segundo experimento foi realizado mediante uma solução mais concentrada de TanP, sendo esta de 23,6 μM . Observou-se, também, um aumento da absorbância em função da adição de Cu^{2+} à cubeta (Figura 25), logo é sugerido que também houve formação de complexos envolvendo o TanP e os íons disponíveis em solução.

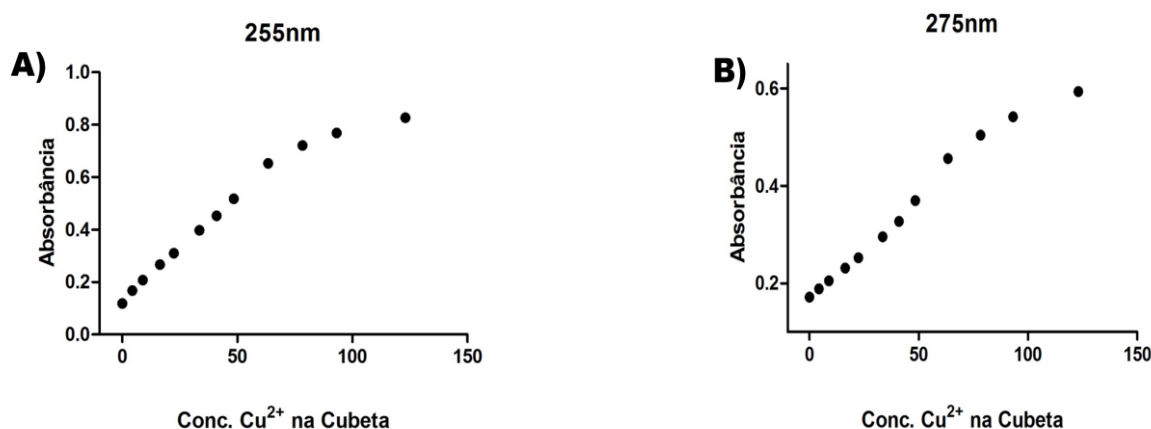
Figura 25 - Acompanhamento Uv-Vis da reação entre TanP (23,6 μM) e diferentes concentrações de Cu^{2+} . Sobreposição de todos os espectros obtidos em meio aquoso da reação entre TanP (23,6 μM) e diferentes concentrações de Cu^{2+} , variando de 0 a 123 μM . Gráfico inserto para destacar a variação em 255 e 275 nm.



Fonte: Dados obtidos e analisados

Com relação às absorvâncias nos comprimentos de onda 255 e 275 nm, referente ao segundo experimento, tem-se que a condição de estequiometria difere da situação mais diluída (primeiro ensaio). O gráfico referente ao comprimento de onda 255 nm exibe um perfil de saturação na concentração de 68,7 μM de Cu^{2+} , sendo este o provável ponto estequiométrico (Figura 26), apresentando uma razão molar de 1 : 3 (TanP : Cu^{2+}). Trata-se da mesma proporção sugerida pelo ensaio de CD, em que se utilizou o dobro da concentração de TanP aqui testada.

Figura 26- Variação da absorvância do TanP (23,6 μM) em função da variação da concentração de Cu^{2+} . (A) Absorvância *versus* concentração do Cu^{2+} (μM) no comprimento de 255 nm. (B) Absorvância *versus* concentração do Cu^{2+} (μM) no comprimento de 275 nm.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Por fim, tem-se que a razão molar é dependente da concentração de TanP na solução. Concentrações mais baixas de TanP pode favorecer a ocorrência de interações intramoleculares, uma situação em que um centro de metal podem ser ligados a diferentes locais de uma mesma molécula de peptídeo. Diferentemente, numa solução mais concentrada de TanP, interações intermoleculares podem tornar-se mais frequentes, uma vez que, assim como sugerido por nossos resultados, há maior probabilidade de um metal se ligar a um ou mais locais de moléculas de peptídeos diferentes. Isto pode acontecer como resultado do aumento da competição para a ligação ao metal causada pela alta concentração de peptídeo na solução.

O cobre é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio que induzem a quebra de cadeias de DNA e oxidação de bases. Além disso, este metal é um

poderoso catalisador da reação de oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), promovendo a aterogênese e desenvolvendo vasoconstrição e propriedades pró-trombóticas. Nesse contexto, peptídeos quelantes de cobre podem evitar a oxidação de LDL induzida por cobre através da quelação dos íons metálicos (MEGÍAS et al., 2007). Além disso, estudos recentes indicam que os peptídeos quelantes de metais podem aumentar a estabilidade, absorção e biodisponibilidade destes minerais (MIQUEL; FARRÉ, 2007; WANG; LI; AO, 2012), sendo esta outra aplicação biológica destas moléculas.

A microplusina, um peptídeo aniônico quelante de íons cobre e ferro, apresentou uma razão molar de ligação de 1:1 e 1:3 para estes metais, respectivamente. Sendo as histidinas presente na região N-terminal e C-terminal, os sítios aos quais os metais se ligam (SILVA et al., 2009). O TanP apresentou maior razão molar de ligação ao cobre, e seus sítios de ligação foram apenas os resíduos ácidos.

Moléculas quelantes de metais bivalentes tem sido alvo de estudos para elucidar novos tratamentos para doenças neurodegenerativas, como a doença de Wilson (WHITE; KANNINEN; CROUCH, 2015). Além disso, agentes quelantes de íons metálicos transitórios atuam indiretamente como um mecanismo antioxidante, uma vez que a reação de Fenton, responsável pela formação de radicais hidroxilo e, subsequentemente, reação em cadeia de radicais, é inibida (CANABADY-ROCHELLE et al., 2015).

Diante dos resultados o TanP pode ser considerado como o primeiro peptídeo aniônico, presente na peçonha de escorpião, com atividade quelante de Cu^{2+} caracterizado estruturalmente.

5.7 Potencial antimicrobiano

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) no veneno de escorpião são frequentemente citados na literatura como um dos primeiros componentes do sistema imunitário (MELO et al., 2015). Embora a maioria dos PAM já descritos seja de natureza catiônica, existem alguns relatos de peptídeos aniônicos com a mesma função, obtidos de várias espécies (PAULMANN et al., 2012; SILVA et al., 2009).

Estudos mostram que devido algumas cepas microbianas desenvolverem mecanismos de resistência a peptídeos antimicrobianos catiônicos, os peptídeos aniônicos vem sendo alvo de novas pesquisas para avaliar possível ação antimicrobiana (DENNISON et al., 2006).

O TanP na concentração de 250 µg/mL não apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas descritas, quando incubados por 24 horas.

Em sua maioria, os peptídeos antimicrobianos são moléculas anfipáticas, pequenas (GUO et al., 2013; MELO et al., 2015; SÁNCHEZ-VÁSQUEZ et al., 2013) e catiônicas (ZDYBICKA-BARABAS et al., 2012). Sendo assim acredita-se que o tamanho (50 aminoácidos) e a carga negativa do TanP foram fatores determinantes para a ausência de atividade contra as cepas apresentadas.

Os PAM possuem grupos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos espacialmente organizados em regiões das moléculas (KACPRZYK et al., 2007). Esta estrutura anfipática lhes permite interagir seletivamente com membranas bacterianas, que contém usualmente fosfolipídios carregados negativamente, com o auxílio de interações eletrostáticas (LAI et al., 2002). O excesso de carga negativa distribuída por toda a extensão da molécula de TanP provavelmente interfere na interação com a membrana bacteriana.

Peptídeos antimicrobianos aniônicos já identificados em outras espécies de animais contêm aminoácidos hidrofílicos e ácidos, que são opostos em carga (pI 2,5 a 3,5), e são consideravelmente menores (<1 kDa) em tamanho, quando comparado com a peptídeos antimicrobianos catiônicos (COSTA et al., 2012), porém tais características não corroboram com o perfil químico e estrutural dos aminoácidos que compõem a sequência primária do TanP, já que aminoácidos hidrofílicos são ausentes, sendo o peptídeo rico em aminoácidos hidrofóbicos e ácidos.

O peptídeo aniônico Bmka2 do *Buthus martensii* Karsch, que possui carga negativa de -13 é considerado um suposto peptídeo antimicrobiano derivados da peçonha do escorpião chinês (ZENG et al., 2004). Os clones de peptídeos aniônicos 7, 8, 9 e 10, pertencentes à peçonha do *Tityus costatus*, possuem carga que variam de -19 a -20, podendo possuir atividade antimicrobiana. Porém nenhum deles foi caracterizado, nem tiveram sua atividade biológica avaliada (HARRIS; DENNISON;

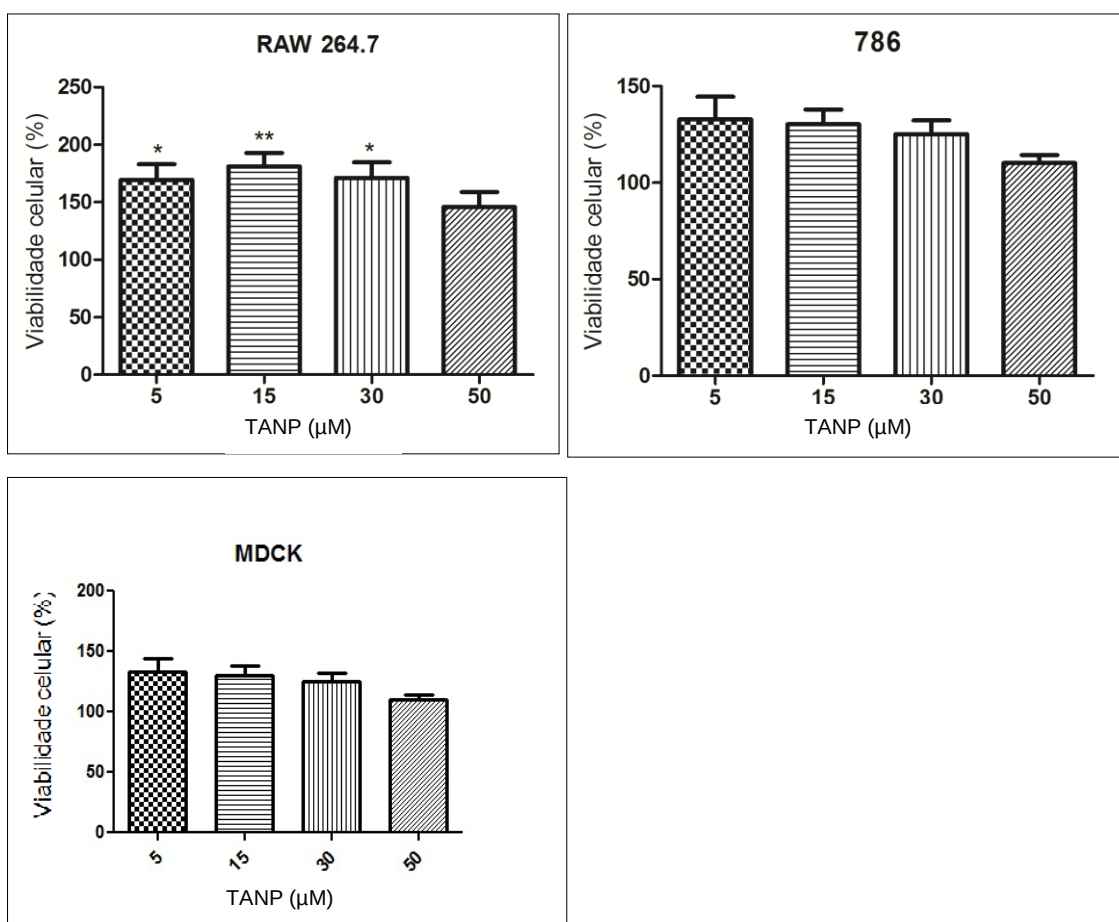
PHOENIX, 2009). Sendo assim, até o presente momento não há na literatura peptídeos aniônicos antimicrobianos identificados na peçonha de escorpião.

5.8 Proliferação celular

Não há ensaios de citotoxicidade com linhagens celulares normais e/ou tumorais, usando peptídeos aniônicos de escorpiões descritos na literatura até então. Sendo o TanP o primeiro a ser testado.

TanP não foi citotóxico para as linhagens celulares testadas. Porém, nas concentrações de 5, 15 e 30 μM , o TanP induziu a proliferação de macrófagos RAW (Figura 27), podendo também atuar modulando o sistema imune.

Figura 27- Efeito do TanP relacionado à proliferação de células em cultura. Foram testadas diferentes concentrações do TanP (5, 15, 30 e 50 μM) frente a linhagens celulares tumorais (786) e normais (MDCK e RAW), após 24 horas de incubação, utilizando o ensaio do MTT e a densidade óptica avaliada em 570 nm. Os valores são expressos como a média $\pm$ DP ($n = 3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparando com o grupo controle (100 % de viabilidade celular).



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Assim como o TanP, a microplusina, peptídeo aniônico quelante de Cu^{2+} isolado da hemolinfa e ovos do carrapato *Rhipicephalus microplus*, não apresentou citotoxicidade contra macrófagos e ainda foi classificado como um agente imunomodulador da resposta imune inata (JUNIOR, 2010).

Uma das maiores complicações dos agentes quelantes utilizados na terapia da Doença de Wilson é a nefrotoxicidade (RODRIGUEZ-CASTRO; HEVIA-URRUTIA; STURNIOLO, 2015) de tais medicamentos, porém o TanP não foi tóxico às células renais normais nas concentrações testadas, as quais estão dentro da faixa de concentração na qual o peptídeo apresentou atividade quelante de Cu^{2+} . Isto pode ser visto como uma vantagem desse composto frente aos produtos já comercializados, podendo o TanP ser uma nova alternativa para o tratamento de algumas doenças neurodegenerativas.

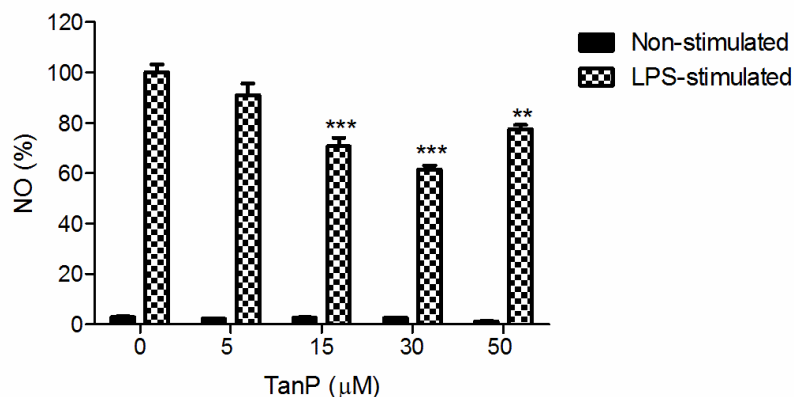
5.9 Efeito do TanP na liberação de NO

Para estudar a produção de um dos mediadores inflamatórios, o NO, na presença de TanP foram elaboradas duas abordagens experimentais. Inicialmente, os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados na presença de um agente indutor inflamatório (o LPS – lipopolissacarídeo bacteriano) e do peptídeo avaliado nas concentrações de 0, 5, 15, 30 e 50 μM . Na segunda condição, as células RAW 264.7 foram cultivadas na ausência de LPS e na presença das mesmas concentrações do peptídeo, já citadas.

A liberação de nitrito por macrófagos RAW na presença de LPS foi inibida por TanP, nas concentrações de 15, 30 e 50 μM , indicando que o peptídeo neutraliza a produção de NO, induzida por LPS. O tratamento com TanP na ausência de estimulação por LPS revela níveis semelhantes ao controle negativo (Figura 28).

Foi demonstrado que o TanP não induziu a produção de NO por células RAW em nenhuma das concentrações. No entanto nas concentrações 15, 30 e 50 μM , TanP inibiu a liberação de NO, induzida pelo LPS. Dessa forma, sugere-se que o peptídeo tem ação imunossupressora nas concentrações testadas, podendo desempenhar um papel regulador da resposta imune, atuando como agente imunomodulador.

Figura 28 – Níveis de NO no sobrenadante de células RAW. As células foram incubadas com diferentes concentrações de TanP (0, 5, 15, 30 or 50 μ M), na presença ou ausência de LPS, por 24 horas, e a concentração de nitrito foi determinada pelo método de Griess.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

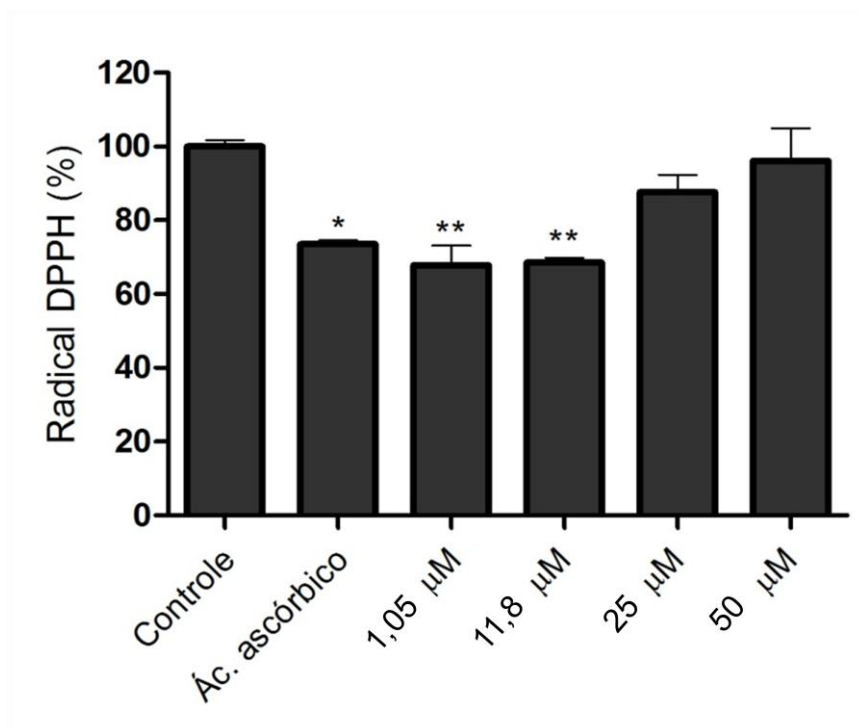
5.10 Sequestro de radical DPPH

É bem sabido que a presença de aminoácidos hidrofóbicos em peptídeos eleva a sua atividade antioxidante (YOUSR; HOWELL, 2015), a qual é geralmente devido a quelação de metais de transição e sequestro de radicais livres (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012).

A quelação de metais tem um efeito antioxidante, pois metais de transição como ferro e cobre catalisam a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo os radicais hidroxila ($\cdot$ OH) e superóxido ($O_2^{\cdot-}$), os quais ocasionam a oxidação de lipídios insaturados e promovem dano oxidativo em diferentes níveis (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012).

Nesse contexto, resolveu-se avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante total do TanP através do sequestro de radicais livres (DPPH). Os resultados foram expressos em percentual de redução do radical DPPH, o qual é proporcional à atividade antioxidante do peptídeo (Figura 29).

Figura 29 - Atividade de Sequestro do radical Livre DPPH. O TanP teve sua atividade antioxidante avaliada em concentrações variando de 1,05 a 50 μM . O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. As absorbâncias foram lidas no comprimento de onda 517 nm.



Fonte: Dados obtidos e analisados.

Foi observado que o TanP, nas menores concentrações (1,05 e 11,8 μM) apresentou um percentual de redução do radical de, aproximadamente, 32%. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, reduziu o DPPH em, aproximadamente, 26%. Desta forma pode-se inferir, preliminarmente, que o TanP, em baixas concentrações, possui uma potente capacidade de capturar radicais livres, estando tal condição relacionada a uma provável atividade antioxidante do peptídeo.

6.0 Conclusões

- ❖ O peptídeo isolado do veneno de escorpião *T. stigmurus* denominado TanP é rico em resíduos de Asp e Glu, possui massa molecular de 5,815 kDa e o ponto isoelétrico é 2,75.
- ❖ Esse peptídeo apresenta uma significativa similaridade com outros peptídeos aniônicos previamente identificados em outras espécies de escorpião.
- ❖ TanP apresentou atividade quelante de metal cobre e ensaios de dinâmica molecular exibiram que os grupamentos -COO^- dos resíduos de Asp e Glu seriam os prováveis sítios de ligação dos íons metálicos.
- ❖ Os ensaios de DM e CD corroboraram no perfil estrutural do peptídeo em presença de Cu^{2+} , em que além dos metais estarem complexados ao peptídeo, modificam sua estrutura, facilitando seu dobramento e aparecimento de região α -hélice.
- ❖ A razão molar de ligação (TanP : Cu^{2+}) foi similar para os ensaios de DM, CD e UV-visível.
- ❖ A estrutura de TanP é sensível a variação de pH do meio. Porém, com reação a variação de temperatura, o peptídeo apresentou uma variação estrutural reversível.
- ❖ Não foi observada ação antimicrobiana por parte do TanP (250 $\mu\text{g/ml}$) contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.
- ❖ O TanP não apresentou atividade antiproliferativa para a linhagem de célula cancerígena 786, nem para células normais MDCK.
- ❖ Sugere-se, preliminarmente, que TanP apresenta ação imunossupressora nas concentrações testadas, podendo desempenhar um papel regulador da resposta imune, atuando como agente imunomodulador, e mais estudos são necessários para elucidar o seu potencial biotecnológico completo.
- ❖ TanP também é um possível candidato a um potente agente antioxidante, uma vez que, em baixas concentrações, foi responsável pelo sequestro de radicais livres DPPH, de modo similar ao ácido ascórbico.

Em conclusão, TanP é o primeiro peptídeo aniônico da peçonha de escorpião a ser caracterizado estruturalmente, apresentando atividades biológicas, que o torna um candidato com potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Além disso, os dados apresentados nesse trabalho podem fornecer subsídios

importantes para uma melhor compreensão do papel desses peptídeos aniônicos na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*.

Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, C. M. R. DE et al. Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 484–489, 2013.

ALMAAYTAH, A. et al. Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: Biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. **Peptides**, v. 35, n. 2, p. 291–299, 2012.

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

ALMEIDA, R. B. DE. Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil. v. 1836, 2010.

ALMEIDA, D. D. et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 362, 2012.

ALMEIDA, D. D. et al. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: CDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 113–118, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; LIPMAN, D. J. Protein database searches for multiple alignments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5509–13, 1990.

ALVARENGA, É. R. et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 02, n. 04, p. 210–220, 2012.

ALVES, R. D. S. et al. Aspectos epidemiológicos dos acidentes escorpiônicos no estado do Ceará no período de 2003 a 2004. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 1, n. 3, p. 14 – 20, 2007.

ANTONIADES, V. et al. Is copper chelation an effective anti-angiogenic strategy for cancer treatment? **Medical Hypotheses**, v. 81, n. 6, p. 1159–1163, 2013.

BARBOSA, I. R. ASPECTOS DO ESCORPIONISMO NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE. **Rev.Saúde.Com**, v. 10, n. 1, p. 43–53, 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROS, R. M. et al. Clinical and epidemiological aspects of scorpion stings in the northeast region of Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1275–1282, 2014.

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

BECUCCI, L. et al. Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: influence of lipid charge, pH and Zn²⁺ on its interaction with a biomimetic membrane. **Soft Matter**, v. 10, n. 4, p. 616–626, 2014.

BORGES, A. et al. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 66–79, 2008.

BORGES, A. et al. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 436–454, 2010.

BORGES, A.; MIRANDA, R. J.; PASCALE, J. M. Scorpionism in Central America, with special reference to the case of Panama. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 2, p. 130–143, 2012.

BOSSA, G. V. **DETERMINAÇÃO DO GRAU DE IONIZAÇÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SÃO PAULO**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, 2013.

BRASIL, M. DA S. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Casos de acidentes por escorpiões**. Brasil,

Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013.

BREWER, G. J. Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis disease and inflammatory and autoimmune diseases . **REVIEWS. Drug discovery today**, v. 10, n. 16, p. 1103–1109, 2005.

BUCK, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. **Rev. Biophys**, v. 31, n. 3, p. 297–355, 1998.

BÜRCK, J. et al. Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. **Biophysical journal**, v. 95, n. 8, p. 3872–3881, 2008.

CAMMERS-GOODWIN, A. et al. Mechanism of stabilization of helical conformations of polypeptides by water containing trifluoroethanol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 13, p. 3082–3090, 1996.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. S. et al. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. **Food Chemistry**, v. 183, p. 129–135, 2015.

CARMO, A. O. DO. **Expressão Heteróloga e Purificação da Tityustoxina: Obtenção da proteína recombinante Ts3 do escorpião Tityus serrulatus**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1789–1795, 2012.

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

COSTA, T. O. G. et al. Isolation and amino acid sequencing by MALDI-TOF-MS/MS of a novel antimicrobial anionic peptide from the skin secretion of *ostecephalus taurinus* (Anura, Hylidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2133–2136, 2012.

CRISPONI, G. et al. A Speciation Study on the Perturbing Effects of Iron Chelators on the Homeostasis of Essential Metal Ions. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0133050,

2015.

D'SUZE, G. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. **Biochimie**, v. 91, n. 8, p. 1010–1019, 2009.

DARDEN, T. et al. New tricks for modelers from the crystallography toolkit: The particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations. **Structure**, v. 7, n. 3, p. 55–60, 1999.

DASHPER, S. G. et al. Divalent Metal Cations Increase the Activity of the Antimicrobial Peptide Kappacin Divalent Metal Cations Increase the Activity of the Antimicrobial Peptide Kappacin. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2322–2328, 2005.

DASHPER, S. G.; LIU, S. W.; REYNOLDS, E. C. Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 505–516, 2007.

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

DEHESA-DÁVILA, M.; POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1015–1018, 1994.

DENNISON, S. R. et al. Interactions of an anionic antimicrobial peptide with *Staphylococcus aureus* membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n. 4, p. 1006–1010, 2006.

DENNISON, S. R. et al. The role of C-terminal amidation in the membrane interactions of the anionic antimicrobial peptide, maximin H5. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 5, p. 1111–1118, 2015.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 273–283, 2005a.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: Genes, peptides and function. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 273–283, 2005b.

DORCE, A. L. C.; DORCE, V. A.; NENCIONI, A. L. A. Mild reproductive effects of the *Tityus bahiensis* scorpion venom in rats. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 20, n. 1, p. 4, 2014.

FALES-WILLIAMS, A. J. et al. Increased anionic peptide distribution and intensity during progression and resolution of bacterial pneumonia. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 1, p. 28–32, 2002.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies from Restriction Sites: A Maximum-Likelihood Approach. **Evolution**, v. 46, p. 159–173, 1992.

FET, V. et al. The first molecular phylogeny of Buthidae (Scorpiones). **Euscorpius**, v. 4, n. 4, p. 1–10, 2003.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in metal intoxication. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 7, p. 2745–2788, 2010.

FOLLMER, C.; NETTO, H. J. C. B. FÁRMACOS MULTIFUNCIONAIS: MONOAMINA OXIDASE E α -SINUCLEÍNA COMO ALVOS TERAPÊUTICOS NA DOENÇA DE PARKINSON. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. 306–313, 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and $[^{15}\text{N}]$ nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2009.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.

GUO, X. et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1784–1794, 2013.

GUPTE, A.; MUMPER, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 1, p. 32–46,

2009.

HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.

HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115–137, 2014.

HE, Y. et al. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 1–14, 2013.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n. 2, p. 182–192, 1993.

HOLADAY JR, S. K. et al. NMR Solution Structure of Butantoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 1, p. 18–27, 2000.

ISOM, D. G. et al. Charges in the hydrophobic interior of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 37, p. 16096 –16100, 2010.

JUNIOR, L. A. G. **Avaliação da Atividade Imunomodulara da microplusina sobre macrófagos murinos in vitro**. [s.l.] Universidade de São Paulo, São Paulo., 2010.

KACPRZYK, L. et al. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 11, p. 2667–2680, 2007.

KATOH, K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KOURY, C. J.; DONANGELO, C. M. Zinco , estresse oxidativo e atividade física Zinc

, oxidative stress and physical activity. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433–441, 2003.

LAI, R. et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 295, n. 4, p. 796–799, 2002.

LEEMING, J. **Scorpions of Southern Africa**. Struik Pub ed. [s.l: s.n.].

LINDAHL, E. et al. Implementation of the charmm force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 2, p. 459–466, 2010.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MONTEIRO DE AMORIM, A.; KOBLEK BRAZIL, T.

Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones ; Buthidae) no Estado da Bahia , Brasil; Envenomation by *Tityus stigmurus* (Scorpiones ; Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 239–245, 2000.

LOURENÇO, W. R. Peut-on parler d'une biogeography du scorpionisme? C. R. **Soc. Biogéogr**, v. 64, p. 137–143, 1988.

LOURENÇO, W. R. Scorpions of Brazil. **Les Editions de L'IF**, 2002.

LOURENÇO, W. R. Nouvelle Proposition De Découpage Sous-Générique Nouvelle Proposition De Découpage Sous-Générique Du Genre *Tityus* C.L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). **Boletín de la SEA**, v. 39, p. 55–67, 2006.

MA, Y. et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. **BMC genomics**, v. 10, p. 290, 2009.

MA, Y. et al. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1563–76, 2012.

MACHADO, R. J. A. et al. Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, v. 101, p. 11–18, 2015.

MACHADO, R. J. A. et al. Characterization of TistH, a multifunctional peptide from the scorpion *Tityus stigmurus*: Structure, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Toxicon**, p. 1–9, 2016.

MALKOSKI, M. et al. Kappacin , a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk Kappacin , a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2309–2315, 2001.

MARSHALL, S. H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 96–109, 2003.

MEGÍAS, C. et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3949–3954, 2007.

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

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, v. 15, n. 2, p. 127–30, 2001.

MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. E3095–103, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. DA. **ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan**.

MIQUEL, E.; FARRÉ, R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 139–143, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NANJARAJ URS, A. N. et al. Inhibitory potential of three zinc chelating agents against the proteolytic, hemorrhagic, and myotoxic activities of *Echis carinatus* venom. **Toxicon**, v. 93, p. 68–78, 2015.

NENCIONI, A. L. A et al. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. **Neuroscience Letters**, v. 463, n. 3, p. 243–238, 2009.

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

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

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

PARDAL, P. P. et al. Clinical aspects of envenomation caused by *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) in two distinct regions of Pará state, Brazilian Amazon basin: a prospective case series. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 20, p. 3, 2014.

PAULMANN, M. et al. Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 8434–8443, 2012.

PESSOA, J. et al. Circular dichroism in coordination compounds. **The Journal Argentine Chemical Society**, v. 97, p. 151–165, 2009.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785–786, 2011.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 10, 2010.

PLESSIS, L. DU; ELGAR, D.; PLESSIS, J. L. DU. Southern African scorpion toxins: An overview. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 1–9, 2008.

PORTO, T. J. et al. Primeiro relato de acidentes escorpiônicos causados por *Tityus martinpaechi* Lourenço , 2001 (Scorpiones ; Buthidae) 1 First report of scorpion accidents caused by *Tityus martinpaechi* Lourenço , 2001. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1980, n. 3, p. 266–269, 2010.

PUCCA, M. B. et al. Non-disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom: evidence for proline-free ACE-inhibitors. **Peptides**, v. 82, p. 44–51, 2016.

QUINTERO-HERNANDEZ, V. et al. Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.

RAMBOUT, A. **FigTree v. 1.4.2.**, 2012. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>

RIGIRACCILOLO, D. C. et al. Copper activates HIF-1 α /GPER/VEGF signalling in cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 33, p. 34158–34177, 2015.

ROCHA, C. A. **Peptídeos derivados da toxina ParE : síntese , estrutura e estudos de inibição de DNA topoisomerases**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, Araraquara., 2014.

RODRIGUEZ-CASTRO, K. I.; HEVIA-URRUTIA, F. J.; STURNIOLO, G. C. Wilson's disease: A review of what we have learned. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 29, p. 2859–2870, 2015.

RUIMING, Z. et al. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 452, 2010.

RUSSELL, A. L. et al. The effect of the length and flexibility of the side chain of basic amino acids on the binding of antimicrobial peptides to zwitterionic and anionic membrane model systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1723–1739, 2012.

SÁNCHEZ-VÁSQUEZ, L. et al. Biochimica et Biophysica Acta Enhanced antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from vejovine and hadrurin

☆. **BBA - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3427–3436, 2013.

SANTOS FILHO, O. A.; BICCA DE ALENCASTRO, R. MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

SHARMA, P. P. et al. Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 282, n. figure 1, p. 20142953, 2015.

SILVA, F. D. et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34735–34746, 2009.

STEFFEN, H. et al. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2608–2620, 2006.

STORCKSDIECK, S.; BONSMANN, G.; HURRELL, R. F. Iron-Binding Properties, Amino Acid Composition, and Structure of Muscle Tissue Peptides from in vitro Digestion of Different Meat Sources. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. S19–S29, 2007.

SUNAGAR, K. et al. Evolution Stings: The Origin and Diversification of Scorpion Toxin Peptide Scaffolds. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2456–2487, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

THOMPSON, H. N. **Mudanças Estruturais na Proteína Príon Celular Induzidas por pH Baixo**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

TORRES-FUENTES, C. et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 180, n. August, p. 194–202, 2015.

TUSSING-HUMPHREYS, L. et al. Rethinking Iron Regulation and Assessment in Iron Deficiency, Anemia of Chronic Disease, and Obesity: Introducing Hepcidin. v. 112, n. 3, p. 391–400, 2012.

- VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66486, 2013.
- VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.
- VENANCIO, E. J. et al. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, v. 69, n. January 2007, p. 180–190, 2013.
- WALLACE, B.; LEES, J.; ORRY, A. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. **Protein ...**, p. 875–884, 2003.
- WANG, C.; LI, B.; AO, J. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1231–1238, 2012.
- WARD, R. J.; DEXTER, D. T.; CRICHTON, R. R. Chelating agents for neurodegenerative diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2760–72, 2012.
- WEI, L. et al. The first anionic defensin from amphibians. **Amino Acids**, p. 1301–1308, 2015.
- WHITE, A. R.; KANNINEN, K. M.; CROUCH, P. J. Editorial: Metals and neurodegeneration: Restoring the balance. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. JUL, p. 1–2, 2015.
- WHITMORE, L. et al. The Protein Circular Dichroism Data Bank, A Web-Based Site for Access to Circular Dichroism Spectroscopic Data. **Structure**, v. 18, n. 10, p. 1267–1269, 2010.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., p. 668–673, 2004.
- XU, D. et al. AIDA: Ab initio domain assembly server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 308–313, 2014.

YOUSR, M.; HOWELL, N. Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29161–29178, 2015.

YU, Y. et al. Iron Chelators for the Treatment of Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2689–2702, 2012.

ZDYBICKA-BARABAS, A. et al. Synergistic action of Galleria mellonella anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 11, p. 2623–2635, 2012.

ZENG, X. C. et al. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from Buthus martensii Karsch. **Peptides**, v. 25, n. 2, p. 143–150, 2004.

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

ZHU, L. et al. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.