

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CAMILLE MEZZARI GENEROSO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE UM
PEPTÍDEO MIMETIZANTE DO EPÍTOPO DA PROTEÍNA Ts1 DO
VENENO DE *Tityus serrulatus***

CRICIÚMA

2025

CAMILLE MEZZARI GENEROSO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE UM
PEPTÍDEO MIMETIZANTE DA EPÍTOPO DA PROTEÍNA Ts1 DO
VENENO DE *Tityus serrulatus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila
Coorientadora: Dra. Rahisa Scussel

CRICIÚMA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G326c Generoso, Camille Mezzari.

Caracterização e avaliação de segurança de um peptídeo mimetizante do epítipo da proteína Tsl do veneno de *Tityus serrulatus* / Camille Mezzari Generoso. - 2025.

63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientação: Rahisa Scussel.

1. Antivenenos. 2. Antídotos. 3. Escorpiões - Veneno. 3. Peptídeo sintético. 4. Biologia computacional. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.94

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

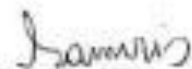


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 461

Com início às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 18 (dezoito) de fevereiro de 2025 (dois mil e vinte e cinco), realizou-se, na Sala 208/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **CAMILLE MEZZARI GENEROSO**, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila e coorientação da Dra. Rahisa Scussel, intitulada “**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE UM PEPTÍDEO MIMETIZANTE DO EPÍTOPO DA PROTEÍNA Ts1 DO VENENO DE *Tityus serrulatus***”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Tamy Colonetti (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Emílio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Antônio Augusto Schafer (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 18 (dezoito) de fevereiro de 2025 (dois mil e vinte e cinco).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Samiris Albano Pereira
Secretária do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças, por me concederem força, fé e perseverança para enfrentar cada desafio e alcançar este momento tão especial.

Aos meus pais, Terezinha e Antonio, minha eterna gratidão por me ensinarem valores como persistência e coragem, fundamentais para lutar pelos meus sonhos. Vocês sempre me guiaram pelo melhor caminho e foram meu porto seguro em toda a trajetória. Obrigada pelo amor incondicional, pelos conselhos e por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidava de mim mesma. Amo vocês profundamente.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, e ao meu namorado, Lucas, obrigada pelo apoio constante e pela paciência infinita. Lucas, você foi meu alicerce em momentos difíceis e celebrou comigo cada pequena conquista. À minha amiga Flávia, obrigada por ouvir meus inúmeros “e se...” e por sempre me motivar com palavras de incentivo e carinho.

Ao meu orientador e professor, Ricardo, deixo aqui minha profunda gratidão por todos os ensinamentos, pelo apoio constante e por acreditar no meu potencial. Seus conselhos vão muito além do âmbito acadêmico, e levarei para a vida os aprendizados que compartilhou comigo.

À Rahisa, carinhosamente, Rah, obrigada por ser um ponto luz que iluminou alguns dos momentos mais difíceis. Sua generosidade, paciência e prontidão para ajudar foram fundamentais nesta jornada.

Aos colegas do grupo de pesquisa Biotech e do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, minha sincera gratidão. Ellen, Mírian, Gabriel, Mariana e Eduarda Sombrio, cada um de vocês marcou minha trajetória com aprendizados, risadas e momentos inesquecíveis. Levarei todos no coração, com saudade das trocas e das experiências que vivemos juntos.

Também agradeço ao MultiLab, em especial ao Edson, pelo suporte técnico e humano, que fez toda a diferença em momentos cruciais do meu trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Vocês fizeram parte desta conquista, e cada gesto de apoio será lembrado com muito carinho. Obrigada por tudo!

“Não é o que somos, mas o que fazemos com o que somos que nos define.”

— Dumbledore, Harry Potter e a Câmara Secreta

RESUMO

Os animais peçonhentos desempenham um papel ecológico importante e utilizam o veneno para defesa. Os escorpiões são terrestres e amplamente distribuídos, com *Tityus serrulatus* sendo a espécie mais comum no Brasil, predominante em vários estados. Os casos de envenenamento por sua picada estão aumentando, segundo o Sistema de Informações e Agravos de notificação (SINAN). A picada pode causar sintomas leves a graves, como dor, edema e eritema. Seu veneno contém 30% de enzimas e 40% de pequenas proteínas, incluindo neurotoxinas que interagem com canais iônicos, influenciando a fisiologia do organismo afetado. A Ts1 é a toxina mais predominante no veneno do escorpião *T. serrulatus* e devido a sua forte interação com os canais de Na⁺, é extremamente potente e tóxica tanto para mamíferos quanto para insetos. A intervenção medicamentosa preconizada são os soros anti-escorpiônicos, eles são capazes de neutralizar as toxinas presentes no veneno por meio da ligação antígeno-anticorpo. No entanto sua produção, devido ao protocolo se basear na hiperimunização de cavalos utilizando o veneno bruto como imunógeno, ocasiona danos irreversíveis ao animal, diminuindo a qualidade e expectativa de vida e levantando questões bioética sobre este protocolo. Desta forma, a busca por imunógenos menos danosos se faz cada vez mais necessários. Assim, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar e avaliar *in vitro* a segurança de um peptídeo derivado de um epítipo conformacional da neurotoxina Ts1. Este peptídeo foi nomeado de CETs1. O peptídeo foi quimicamente sintetizado pelo técnica FMOC-sínteses e posteriormente caracterizado por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS). Após por ensaios *in vitro* de citotoxicidade (MTT) e hemocompatibilidade, pode-se verificar que o peptídeo CETs1 não apresentou caráter hemolítico e tóxico, podendo ser uma boa alternativa de estudo para viabilizar a produção de soros anti-escorpiônicos. Como CETs1 é derivado de um epítipo conformacional, apresenta maior especificidade quanto a ligação antígeno-anticorpo, podendo aumentar estímulo na produção de imunoglobulinas e diminuir possíveis reações cruzadas.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*; escorpionismo; Ts1, bioinformática; peptídeo sintético, imunógeno

ABSTRACT

Venomous animals play a crucial ecological role and utilize venom for defense. Scorpions are terrestrial and widely distributed, with *Tityus serrulatus* being the most common species in Brazil, predominantly found in several states. Envenomation cases due to its sting are increasing, according to the *Sistema de Informações e Agravos de Notificação* (SINAN). The sting can cause mild to severe symptoms, including pain, edema, and erythema. Its venom consists of 30% enzymes and 40% small proteins, including neurotoxins that interact with ion channels, affecting the physiology of the envenomed organism. Ts1 is the most predominant toxin in *T. serrulatus* venom and, due to its strong interaction with Na⁺ channels, it is highly potent and toxic to mammals and insects. The recommended pharmacological intervention involves antiscorpionic sera, neutralizing venom toxins through antigen-antibody binding. However, serum production relies on hyperimmunization of horses using crude venom as the immunogen, leading to irreversible damage, reduced quality of life, and raising bioethical concerns regarding this protocol. Therefore, the search for less harmful immunogens has become increasingly necessary. Thus, the present study aimed to synthesize and evaluate in vitro the safety of a peptide derived from a conformational epitope of the Ts1 neurotoxin. This peptide was designated CETs1. It was chemically synthesized using the Fmoc strategy and subsequently characterized by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). In vitro cytotoxicity (MTT) and hemocompatibility assays demonstrated that CETs1 was neither hemolytic nor toxic, suggesting its potential as a viable candidate for antiscorpionic serum development. Since CETs1 is derived from a conformational epitope, it exhibits higher specificity in antigen-antibody binding, potentially enhancing immunoglobulin production while reducing the likelihood of cross-reactivity.

Keywords: *Tityus serrulatus*; scorpionism; Ts 1, bioinformatics; Synthetic peptide, immunogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais espécies de escorpiões de importância médica no Brasil.....	14
Figura 2 - Escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	15
Figura 3 - Tendências do escorpionismo no Brasil na última década.....	17
Figura 4 - Estrutura de um canal para sódio.....	20
Figura 5 - Estrutura tridimensional da toxina Ts1 de <i>Tityus serrulatus</i> (PDB: 1NPI).....	21
Figura 6 – Predição do epítipo conformacional proveniente da neurotoxina Ts1 (PDB: 1NPI).....	37
Figura 7 - Espectro de massa (m/z) confirmatório do padrão de fragmentação do peptídeo Ts1.....	39
Figura 8: Avaliação da viabilidade celular da aplicação do CETs1 em células NIH3T3 e HT22 nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C).....	40
Figura 9 - Avaliação do percentual da capacidade hemolítica do peptídeo CETs1.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências do epítipo conformacional de acordo com a posição de aminoácidos na proteína Ts1 e propriedades físico-químicas do peptídeo sintético.....	38
Tabela 2 – Resultados do cálculo de peso molecular da massa monoisotópica e padrão de fragmentação para o peptídeo caracterizado por LC/MS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac - Anticorpos

Ag - Antígenos

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CPK - Creatina fosfoquinase

DCM – Diclorometano

DLM - Dose letal mínima

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DIC - N,N'-Diisopropilcarbodiimida

DMF - Dimetilformamida

FDA - *Federal Drug Administration*

FMOC - Fluorenil-metiloxicarbonila

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

ICH - *International Council for Harmonisation*

IEDB - *Epitope Prediction do Immune Epitope Database*

IgG - Imunoglobulina G

MTT - Brometo de 3- 4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PDB - *Protein Data Bank*

SAEsc - Soro antiescorpiônico

SFB - Soro fetal bovino inativado

SINAN - Sistema Nacional de Informação de Agravos

SUS - Sistema Único de Saúde

TES – Trietilsilano

TFA - Ácido trifluoracético

TsV - Veneno de *T. serrulatus*

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS DE AMINOÁCIDOS

SIGLA	SÍMBOLO	NOME
Gly	G	Glicina
Ala	A	Alanina
Leu	L	Leucina
Val	V	Valina
Ile	I	Isoleucina
Pro	P	Prolina
Phe	F	Fenilalanina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Cys	C	Cisteína
Tyr	Y	Tirosina
Asn	N	Asparagina
Gln	Q	Glutamina
Asp	D	Aspartato ou Ácido aspártico
Glu	E	Glutamato ou Ácido glutâmico
Arg	R	Arginina
Lys	K	Lisina
His	H	Histidina
Trp	W	Triptofano
Met	M	Metionina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANIMAIS PEÇONHENTOS

1.1.1. *A espécie Tityus serrulatus no Brasil*
definido. 1.1.5. *Neurotoxina do tipo Ts1*

1.2.1 *Produção do antiveneno de escorpião*

Erro! Indicador não definido. 1.1.2. *Escorp*

301.1.6. *Tratam*

271.2.2 *Anális*

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PREDIÇÃO DO PEPTÍDEO MIMETIZANTE

3.1.1 *Predição de epítipo conformacional por bioinformática*

3.2. SÍNTESE DO PEPTÍDEO

3.3. IDENTIDADE DO PEPTÍDEO POR LM-CS

3.4. CULTURA CELULAR

3.5. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

3.6. ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

4.2. IDENTIDADE DO PEPTÍDEO SINTETIZADO

4.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

4.4. ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

5. DISCUSSÕES

6. CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

APÊNDICE 1

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANIMAIS PEÇONHENTOS

Os animais peçonhentos estão presentes nos mais diversos lugares do planeta e representam um papel importante quando falamos de equilíbrio ecológico. A maioria destes animais utilizam a peçonha, popularmente conhecida como veneno, para poder se defender de seus predadores ou mesmo como um mecanismo de defesa. Alguns destes venenos apresentam risco ao ser humano podendo, em alguns casos, serem fatais. É importante destacar que esses animais possuem diferentes maneiras de inocular seu veneno em suas presas. Alguns utilizam ferrões ou outros mecanismos específicos para injetar suas toxinas, enquanto outros empregam anexos bucais, como as presas das cobras ou as quelíceras nas aranhas (Dehghani; Kamiabi; Mohammadi, 2018).

Em estudos realizados por Jho et. al, (2011), foi apresentado que vítima pode ser afetada tanto pelo veneno inoculado pela cobra quanto pela flora oral do animal, pois em algumas espécies encontramos as bactérias gram-positivas como *Corynebacterium* e *Staphylococcus*. Embora quando pensamos em animais peçonhentos, as cobras surgem para nós como o principal correspondente, os escorpiões desempenham grande importância neste grupo já que são responsáveis por diversos acidentes em várias localidades

Os escorpiões são animais terrestres e existem há aproximadamente 300 milhões de anos. Eles estão distribuídos por todo o mundo, presentes em todos os continentes, exceto na Antártida, e adaptam-se a diversos ambientes, como grandes altitudes, desertos, florestas tropicais e cavernas. (Shamoon, Zafar et al., 2017). Algumas espécies de escorpiões são endêmicas e dependem das condições naturais de seus habitats originais, vivendo em pequenas populações com mobilidade restrita. Já outras espécies são tidas como oportunistas, onde estes animais possuem a habilidade de se adaptarem e colonizar ambientes, uma vez que se reproduzem rapidamente. Além do fato de se reproduzirem rapidamente, estas espécies de escorpiões podem sobreviver longos períodos sem alimentação, o que irá garantir alta taxa de sobrevivência em condições tidas como não naturais, o que é o caso de escorpiões localizados em grandes centros urbanos (Oliveira et al., 2024).

Esta estratégia de vida pode acabar alterando o ecossistema de uma região pois temos a alteração da prosperidade de uma espécie endêmica por outra oportunista, aumentando as chances de encontro com seres humanos e consequentemente o número de acidentes. Esse fenômeno ocorre em diversas partes do mundo onde o escorpionismo é um problema, como no norte da África, Oriente Médio, Índia, México e América do Sul. Levanta-se a hipótese de que as incursões colonizadoras no interior do país tenham perturbado o habitat original de algumas espécies de escorpiões, e que a fundação de novas cidades tenha criado oportunidades de exploração para esses animais (Guerra-duarte et al., 2023).

Pertencentes à classe dos aracnídeos dentro do subfilo Chelicerata, os escorpiões possuem quatro pares de apêndices distribuídos ao longo de seu corpo segmentado, compreendendo o prosoma (cefalotórax) e o opistossoma (abdômen e cauda). Diversas espécies compreendem a família destes animais, porém são encontradas no Brasil *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e *Tityus obscurus* (Figura 1), espécies estas que estão classificadas dentro de 16 a 19 famílias, dentre elas a família *Buthida*, que abrange na faixa de 550 espécies, destacando-se a espécie *Tityus serrulatus* (Reckziegel; Pinto, 2014).

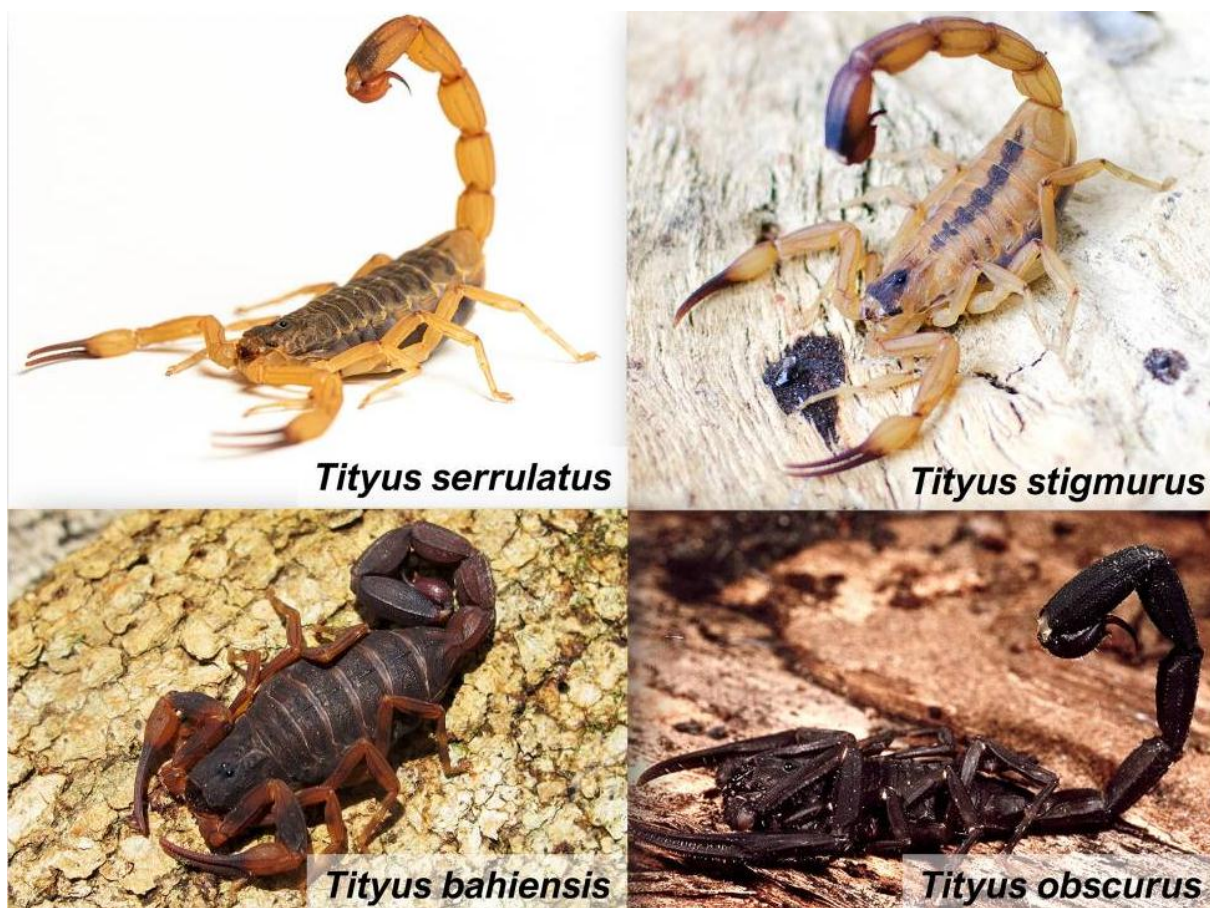


Figura 1 - Principais espécies de escorpiões de importância médica no Brasil.
 Fonte: GUERRA-DUARTE et al., 2023.

1.1.1. Espécie *Tityus serrulatus* no Brasil

O *T. serrulatus* é popularmente conhecido como escorpião amarelo e representa uma espécie altamente especializada em adaptação aos ecossistemas tropicais e subtropicais brasileiros. Esta espécie se caracteriza pelo seu tronco escuro, apêndices e cauda amarelada e presença de quelíceras e pedipalpos bem desenvolvidos no cefalotórax anterior, nos quais são responsáveis por facilitar o processo de alimentação. Na seção terminal do opistossoma, chamada também de telson, as glândulas secretoras de veneno abrigam o ferrão, um aparelho responsável pela inoculação do veneno. Vale lembrar que o *T. serrulatus* leva este nome devido a uma característica anatômica diferenciada em sua cauda, uma estrutura semelhante a dentes ou serrilhas, que garantiram a designação da espécie de “serrulatus” (Figura 2) (Oliveira et al., 2024).



Figura 2 - Escorpião *Tityus serrulatus*: O *Tityus serrulatus*, comumente medindo entre 7 e 9 centímetros de comprimento, é caracterizado por sua coloração que varia do marrom ao marrom escuro. O nome da espécie, "serrulatus", origina-se do termo português "serrilha", em referência à característica serrilhada presente em sua cauda. Essa marca anatômica distinta, destacada na imagem com um círculo vermelho, é um dos elementos que identificam a espécie.

Fonte: OLIVEIRA et al., 2024

Segundo Lutz e Mello (1922) a espécie *Tityus serrulatus* estava entre as espécies de maior relevância médica devido ao número de casos registrados no Brasil em 1922. Desde então, essa espécie é responsável pela maior parte dos acidentes envolvendo escorpiões no país. O *T. serrulatus* possui ampla distribuição geográfica, sendo predominante nos estados de Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Goiás. Essa ampla distribuição se deve à sua fácil adaptação ao ambiente urbano e à sua reprodução partenogenética, uma forma de reprodução assexuada (Lourenço; Ythier; Cloudsley-Thompson, 2008; Marcussi, S. et al., 2011; Seiter; Stockmann, 2017).

Assim como observado em outras espécies de escorpiões, o *T. serrulatus* apresenta grande resiliência durante períodos prolongados de privação de alimentos, com relatos documentando indivíduos sobrevivendo até 400 dias sem sustento (Oliveira et al., 2024). No entanto, essa resistência não se estende à ausência de acesso à água, que surge como um determinante crítico para o sustento e sobrevivência da espécie. A capacidade de adaptação desse escorpião a diferentes ambientes, suportando temperaturas extremas e mudanças climáticas, contribui para seu bem-estar em diversas regiões. Esses fatores, aliados à sua

forma de reprodução, agravam a ocorrência de acidentes escorpiônicos (Pimenta et al., 2019).

1.1.2. Escorpionismo no Brasil

O escorpionismo se caracteriza por um quadro clínico ocasionado após um episódio de acidente escorpiônico. Isso se deve à inoculação do veneno que é composto por uma infinidade de toxinas, que passam ativamente por meio do aguilhão. O Brasil é um dos principais países acometidos criticamente pelo escorpionismo. Os relatos de vítimas de picadas desses aracnídeos no país datam desde 1915, na mesma época em que a terapia antiveneno para picadas de escorpião foi desenvolvida. No entanto, é provável que o escorpionismo já ocorresse na região muito antes disso (Guerra-Duarte et al., 2023).

O envenenamento ocasionado pela picada de escorpiões vem crescendo cada vez mais e já ocupam a primeira posição entre os dados de acidentes com animais peçonhentos, eles somam um total de mais de 50% de ferimentos deste tipo de acordo com o Sistema Nacional de Informação de Agravos (SINAN) e só em Santa Catarina nos últimos 20 anos estas estatísticas aumentaram cerca de 576% segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil (Seemann et al., 2023).

Apesar da taxa de letalidade ser relativamente baixa no Brasil (cerca de 09 a 15%), dados anteriores comprovam que ao longo dos anos o número de incidentes decorrentes da picada de escorpiões aumentou drasticamente na última década, isto é, passaram de aproximadamente 80.000 incidentes em 2013 para mais de 180.000 em 2022, somando um percentual de aumento de mais ou menos 200% (Figura 3) (Oliveira et al., 2024).

A partir do ano de 2010 às notificações dos casos de acidentes com escorpiões se tornaram obrigatórias em unidades de saúde, porém o aumento de casos pode estar relacionado com a quantidade de notificações e não com o número de acidentes por si só. Vale ressaltar que os dados apresentados nos anos de 2020 e 2021 ainda estão passando por revisão devido à pandemia da doença COVID-19. Outro aspecto interessante é que por mais que o SINAN seja um recurso fundamental no estudo da epidemiologia do escorpionismo, podem ser encontradas algumas inconsistências devido a existência da chamada subnotificação de casos,

isto é, estima-se que até 10% das picadas de escorpião podem não ser notificadas ao sistema oficial de vigilância (Guerra-Duarte et al., 2023).

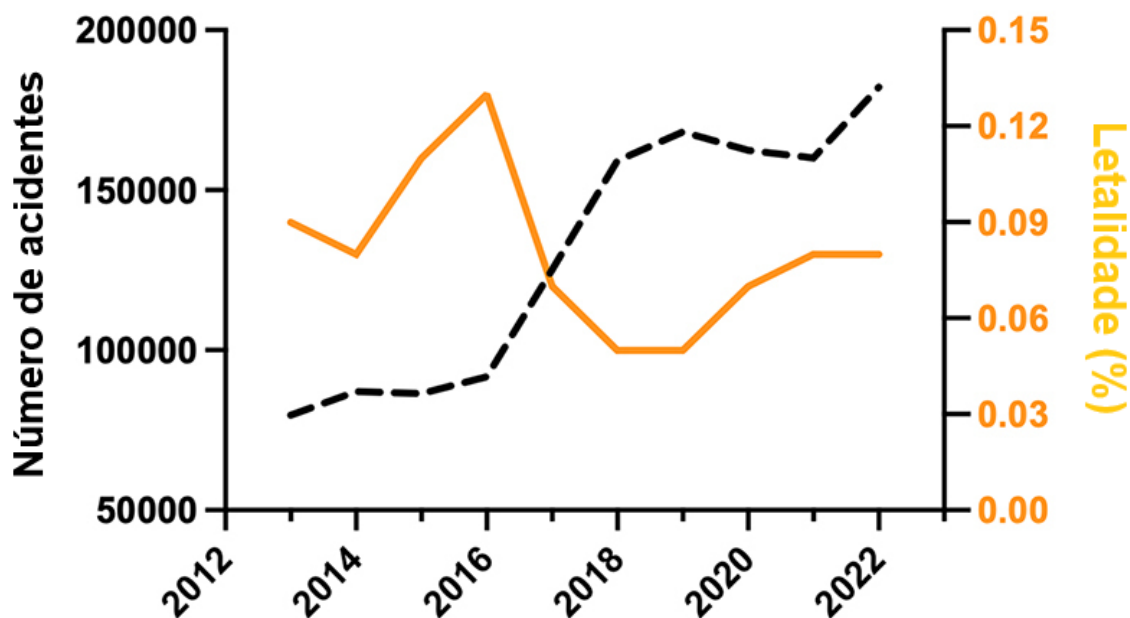


Figura 3 - Tendências do escorpionismo no Brasil na última década: O eixo Y à esquerda indica o número de incidentes de picadas de escorpião, enquanto o eixo Y à direita representa a taxa de letalidade em porcentagem (%).

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2024.

Alguns fatores como o aumento populacional, ambiente e a sazonalidade podem aumentar ou diminuir a incidência de escorpiões em uma determinada região. Alguns fatores climáticos como, por exemplo, o aquecimento global pode favorecer a proliferação, maturação e distribuição dos escorpiões, de mesmo modo, nas estações mais quentes e chuvosas este aumento também é verificado. O comportamento de sazonalidade ocorre principalmente nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste e com menor incidência nas regiões Nordeste e Norte, porém este menor índice não está apenas relacionado com a sazonalidade, mas também com dados de desenvolvimento social nestas regiões. O fato desses animais acometerem populações que muitas vezes se encontram afastadas do atendimento público de saúde, pertencendo a locais de baixo nível econômico, pode dificultar os dados de notificações compulsórias e diminuindo assim as estatísticas de proliferação destes animais nestas regiões (Guerra-Duarte et al., 2023; Seemann et al., 2023; Oliveira et al., 2024).

1.1.3. Fisiologia do envenenamento por *Tityus serrulatus*

A picada derivada do *T. serrulatus* pode ocasionar diversas manifestações clínicas que variam de leves, moderadas a graves que são influenciadas por diversos fatores como, por exemplo, a quantidade de veneno inoculado, número de picadas que ocorreram no momento do acidente, tempo até o processo de atendimento ao tratamento com soroterapia, status imunológico da vítima, idade, peso, assim como a espécie, ou até mesmo o tamanho do escorpião responsável (Cerni, 2023). Após a inoculação do veneno os sintomas locais mais comuns são dor, edema, eritema, sudorese e parestesia. Normalmente esses sintomas ocorrem algumas horas após a picada e podem durar vários dias. Além dos sintomas locais, podem ocorrer manifestações sistêmicas nesta fase, alguns sintomas como taquicardia, diaforese, sudorese profusa, agitação psicomotora, tremores, náuseas, vômitos, sialorreia, hipertensão arterial ou hipotensão são observados após o envenenamento. Já em manifestações mais graves são comumente observados edema pulmonar agudo, colapso cardiovascular, arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva e choque (Oliveira et al., 2024).

De acordo com Bahloul et al. (2013) e Maciel (2014), grande parte dos agravos que evoluem a um quadro sistêmico ou até mesmo óbito, são relacionados à insuficiência cardíaca, edema pulmonar, entre outras complicações, como resultados da liberação maciça de catecolaminas. A interação dessas neurotoxinas com canais iônicos pode levar a um descontrole dos níveis de eletrólitos no plasma, iniciando a diminuição dos níveis de sódio, potássio e cálcio, decorrentes da perda excessiva de fluidos corporais, ocasionados por salivação e lacrimação devido ao envenenamento (Ismail; Abd-Elsalam, 1988; Andrade, 2004; Vasconcelos et al., 2004; Cusinato et al., 2010). Toda essa ampla sintomatologia deve-se ainda à ação dessas neurotoxinas sobre o sistema imunológico, que acaba levando a um desequilíbrio total do organismo do indivíduo, por conta de sua ampla distribuição nos órgãos, como rins, fígado, sangue, pulmão, coração e sistema nervoso (Seemann et al., 2023).

Além da sintomatologia como forma de avaliação clínica, podem ser solicitados exames complementares como exames de imagem e exames bioquímicos. Para avaliação através de exames de imagem podemos citar o eletrocardiograma, radiografia de tórax e ecocardiograma. Já para avaliação

baseada em níveis bioquímicos a dosagem de creatina fosfoquinase (CPK) e sua fração MB, de glicose, amilase, cálcio e sódio sérico podem ser solicitados (Amaral et al., 1991).

1.1.4. Composição do veneno

O veneno de *T. serrulatus* (TsV) é uma mistura complexa composta por proteínas neurotóxicas básicas, proteases, hipotensinas, hialuronidases, sais, carboidratos e mucopolissacarídeos, entre outros componentes. Estudos atuais demonstram que mais de 30% do veneno é constituído por enzimas e, aproximadamente, 40% por peptídeos (Pimenta et al., 2019; Verano-Braga et al., 2008). Estes peptídeos presentes no TsV podem ser classificados como estruturados, nos quais são estabilizados por ligações de dissulfeto, ou lineares. Os peptídeos estruturados normalmente são mais estudados por conta de seus componentes, já que eles são classificados como neurotoxinas que interagem com os canais iônicos (Na^+ e K^+) e estão relacionados diretamente com os casos mais graves causados pelo veneno. Já os peptídeos lineares, por mais que sejam encontrados em abundância no veneno, ainda se apresentam pouco caracterizados. Devido a esta diversa composição, o veneno do *T. serrulatus* permite ao escorpião desempenhar um papel importante na captura de suas presas e na disputa contra predadores (Duzzi et al., 2021).

As neurotoxinas são capazes de interagir com os canais iônicos em membranas excitáveis e contribuir assim para seus efeitos biológicos. Dentre as diversas neurotoxinas presentes no veneno, algumas das principais são a Ts1, Ts2, Ts3, Ts4, Ts5, Ts6, Ts7, Ts8, Ts9, Ts11, Ts12, Ts15, Ts17, Ts19 e Ts32 porém a afinidade com os canais iônicos varia entre elas. As toxinas do canal de Na^+ como, por exemplo, Ts1, Ts2, Ts3, Ts4, Ts5 e Ts17, podem ser subdivididas entre α e β , enquanto as neurotoxinas do tipo α se ligam especificamente ao sítio três do domínio IV do canal iônico impedindo o mecanismo de inativação, as β toxinas se ligam ao sítio quatro do canal imobilizando-o e mantendo-o na posição ativada. Já as neurotoxinas dos canais de K^+ incluindo Ts6-9, Ts11, Ts12, Ts15 e Ts19, exibem efeitos inibitórios ou bloqueadores destes canais (Figura 4) (Duarte, 2011).

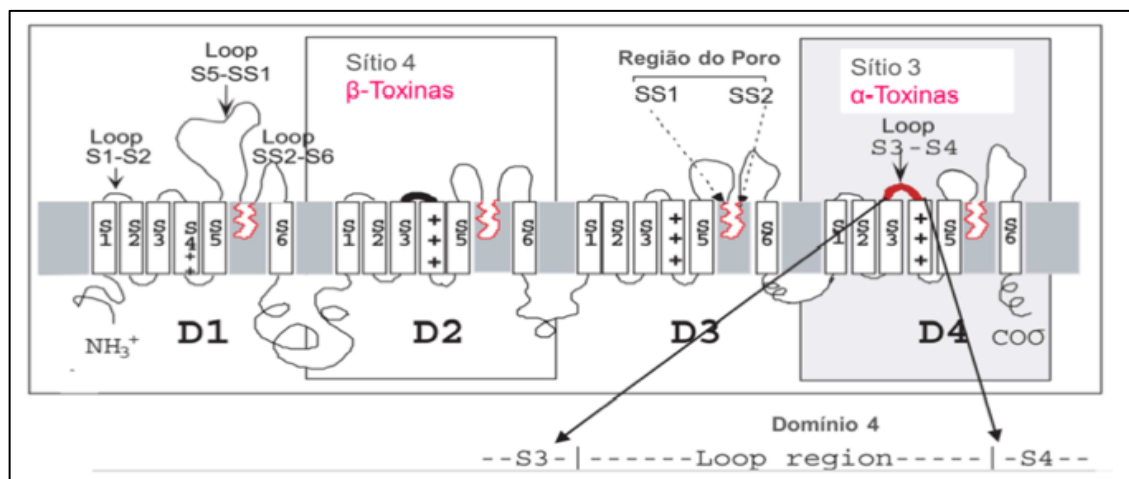


Figura 4 - Estrutura de um canal para sódio: As β -toxinas se ligam no domínio 2 do canal, em um loop entre os segmentos transmembrana 3 e 4 enquanto as α -toxinas se ligam no domínio 4, em loop também entre os segmentos 3 e 4.
Fonte: DUARTE, 2011.

1.1.5. Neurotoxina do tipo Ts1

A Ts1, também chamada de TsTX-I, é a toxina mais predominante no veneno do escorpião *T. serrulatus* onde representa aproximadamente 15% do seu peso solúvel (Pessini et al., 2001). Segundo Barhanin et al. (1984), ela foi a primeira toxina caracterizada desta peçonha. Devido a sua forte interação com os sítios do receptor 4 de canais de Na^+ , a Ts1 é extremamente potente e fonte de diversos estudos pois é uma β -toxina considerada tóxica tanto para mamíferos quanto para insetos. A Ts1 é a causadora dos mais diversos efeitos observados pelo envenenamento por *T. serrulatus* sendo sua ação tão forte que a DL-50 (dose letal responsável por matar 50% dos animais desafiados) via intravenosa, é de apenas $76 \pm 9 \mu\text{g}/\text{kg}$, além disso, ela é responsável pela ampla liberação de catecolamina e elevação da pressão arterial (Vasconcelos et al, 2005).

A estrutura da Ts1 (Figura 5) foi determinada pela primeira vez em 1999 através da metodologia de cristalografia de raios X com uma resolução de 1.73 \AA (Polikarpov et al, 1999). Em um primeiro momento ela foi armazenada no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB) pelo código de 1B7D, porém no ano de 2003, Pinheiro et al. (2003) depositaram no banco de dados do PDB sob o código de 1NPI, sendo esta uma estrutura com melhor resolução (1.16 \AA).

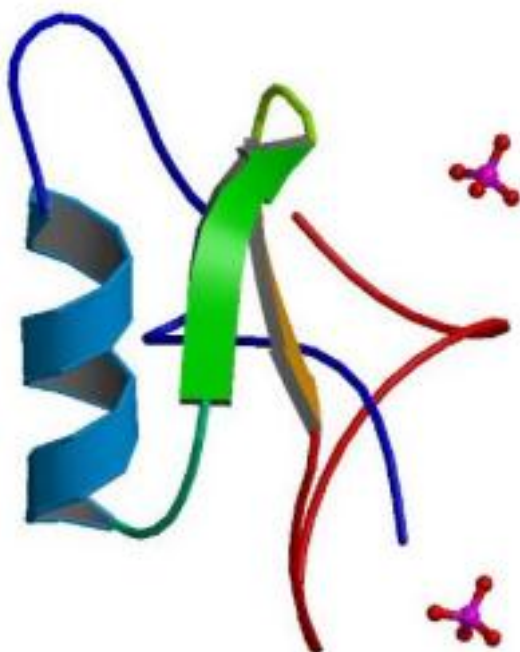


Figura 5 - Estrutura tridimensional da toxina Ts1 de *Tityus serrulatus* (PDB: 1NPI): Em verde, amarelo e vermelho estão as fitas β -pregueadas antiparalelas, e em azul a α -hélice. Dois íons de fosfato são apresentados também com átomo de fosfato em rosa e os quatro oxigênios em vermelho.

Fonte: PBD, 2024.

Em ambas as estruturas apresentadas, foi visto que a Ts1 é formada por três fitas- β pregueadas antiparalelas e uma α -hélice conectadas por quatro pontes dissulfeto. Vale ressaltar que a alça hidrofóbica I na molécula de Ts1 é mais curta do que em todas as outras β -toxinas, porém apresenta o mesmo comprimento da alça presente em α -toxinas. Também foi visto na análise estrutural que as posições de íons de fosfato marcam os possíveis sítios de ligação ao canal de Na^+ (Pinheiro et al, 2003).

1.1.6. Tratamento preconizado

A intervenção médica medicamentosa após o envenenamento em decorrência da picada por *T. serrulatus* é principalmente de suporte, onde são administrados de forma precoce medicamentos analgésicos, anti-histamínicos e benzodiazepínicos para alívio dos sintomas e prevenção de possíveis complicações, porém o tratamento com soro antiescorpiônico mantém-se como padrão ouro preconizado. Podemos subdividir as manifestações clínicas em leves a graves, onde

nos casos leves, no qual se há apenas os sinais e sintomas locais, a utilização do soro antiveneno não é recomendada (Oliveira et al., 2024).

A produção do primeiro soro antiveneno ocorreu em 1909 pelo pesquisador Todd o qual realizou experimentos utilizando cavalos. Ele injetou nestes animais o sobrenadante do veneno extraído da espécie *Buthus quinquestriatus* e devido ao grande porte dos animais, eles foram capazes de gerar uma quantidade de anticorpos contra o veneno, superior a qualquer outro tipo de animal em níveis de anticorpos (Todd, 1909). Desde então a produção e o desenvolvimento de soros vem ganhando maior espaço através de novos protocolos de imunização, processamento de purificação de imunoglobulinas, desenvolvimento de anticorpos, além de medidas que possam controlar e proteger o indivíduo em que se aplica, tornando assim o uso de soro antiescorpiônico (SAEsc), cada vez mais seguro para utilização em humanos e animais. O tratamento com soro antiescorpiônico, por ser um dos procedimentos mais bem sucedidos, se faz uma prática recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no tratamento com envenenamento pela picada de escorpiões (Guerra-Duarte et al., 2023).

No Brasil três soros comerciais são utilizados em grande escala para o tratamento contra acidentes de animais peçonhentos. Estes soros são produzidos pelo Instituto Vital Brazil no Rio de Janeiro, Instituto Butantan em São Paulo e Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte, os quais encontram-se distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Estes soros são subdivididos em duas classes, o antiveneno para aracnídeos e para escorpiões. No soro antiveneno para aracnídeos cada frasco pode neutralizar no mínimo 15,0 dose letal mínima (DLM) do veneno de *Loxosceles gaucho*, 1,5 DLM do veneno de *Phoneutria nigriventer* e 1,5 DLM do veneno de *T. serrulatus* por mL. Já o soro antiveneno para escorpiões, em cada frasco é possível neutralizar no mínimo 5,0 mg do veneno de referência de *T. serrulatus* (Silva, 2012).

1.1.7. Soroterapia

Antígenos (Ag) são considerados qualquer molécula que, ao entrar no organismo, apresente capacidade de gerar resposta imunológica, induzindo assim a produção de um anticorpo (Ac) através de células B (Muro, 2009). Segundo Querido (2016) e Melo et al. (2012) um o antígeno é qualquer agente capaz de se unir

exclusivamente às células e os constituintes do sistema imune como linfócitos e anticorpos solúveis. Em sua forma estrutural, essas moléculas se caracterizam por apresentar estruturas químicas que possibilitam a sua ligação com um anticorpo específico, originando assim o complexo Ag-Ac. Essa ligação ocorre devido a conexões não covalentes semelhantes ao que ocorre com as reações de complexos enzimas-substratos e de mesmo modo, são também reversivas (Harmening, 2002). Já os anticorpos são proteínas responsáveis pela identificação de um antígeno de forma exclusiva e com intensa afinidade (Lenz, 2004). Eles são constituintes da família das glicoproteínas, especificamente das imunoglobulinas (Ig), e são produzidos pelas células B do organismo. A metodologia de ação dos Ac é baseada na neutralização do Ag ou de seus produtos tóxicos mediante a sua ligação (Melo et al., 2012).

O estudo e entendimento dos mecanismos da produção dos anticorpos, é considerada uma das maiores vitórias das ciências biológicas neste século. Devido aos estudos, diversas frentes de pesquisa buscam por melhorias que sejam expressivas para diagnósticos e tratamentos de várias doenças que assolam a humanidade (Lenz, 2004). Os anticorpos vêm sendo produzidos primordialmente de forma a mobilizar e eliminar o antígeno que induziu a sua produtividade. Vale lembrar que após a liberação dos Ac, o processo de aniquilação dos Ag ou de suas toxinas é delimitado por diferentes formas de ação, ou seja, podem se dar mediante à estabilização do complemento, opsonização, reação anafilática (degranulação de mastócitos), neutralização da substância, aglutinação, entre outros (Melo et al., 2012).

Embasado nestes princípios, diversas terapêuticas têm utilizado a indução de resposta imune de forma ativa, como no caso da vacinação, ou então utilizam anticorpos monoclonais como princípio ativo relevante para abordagem terapêutica em diversas enfermidades. O tratamento com soros, a soroterapia, caracteriza-se por um processo de imunização passiva que se dá a partir do uso de imunoglobulinas G (IgG) obtidas através de uma digestão proteolítica. No primeiro momento, é feita a purificação do plasma de forma a minimizar a concentração de proteínas inespecíficas. Após, realiza-se um fracionamento do anticorpo por meio de uma digestão enzimática feita por pepsina ou papaína. No caso da papaína, disponibilizada pelo processo de digestão, obtém-se através da clivagem de IgG, alguns fragmentos denominados Fab, nos quais localizam os sítios de ligação com o

antígeno e a fração cristalizável. Quando obtido pela pepsina, ocorre a separação da fração e da região F(ab)₂, para que assim tenha dois sítios de agregação para o antígeno (Queiroz et al., 2005; Silva, 2012; Boyer et al., 2013). Como forma de intensificação da resposta ao antígeno, são utilizados adjuvantes, como é o exemplo do adjuvante completo de Freund. Este adjuvante permite com que se forme um depósito para o imunógeno o que irá intensificar a resposta imune (Silva, 2012).

Nos casos de envenenamento moderados onde as vítimas apresentam apenas dores intensas associadas a algumas manifestações, são administrados de dois a três frascos do soro antiveneno e nos casos graves, onde já se tem presença de sinais locais e sistêmicos mais intensos são administrados de quatro a seis frascos do antiveneno. Além do tratamento com soro antiveneno e as medicações já citadas no item 1.1.6, outras medicações adicionais com os vasodilatadores, agentes antiarrítmicos e inotrópicos podem ser utilizados (Pucca et al., 2015). Os profissionais da saúde encarregados do cuidado com o paciente devem entender completamente da apresentação clínica e do manejo do envenenamento por *T. serrulatus* já que por mais que o antiveneno seja o padrão ouro para o tratamento, a utilização do antiveneno heterólogo possui algumas limitações e podem ocorrer complicações adversas. Sabendo disso, deve-se sempre avaliar o risco-benefício na utilização do mesmo antes de realizar a sua administração (Oliveira et al., 2024).

1.2. ANÁLISE DE SEGURANÇA NO DESENVOLVIMENTO DE SOROTERAPIAS

1.2.1. Produção do antiveneno de escorpião

O antiveneno de escorpião é produzido pela imunização de cavalos com um conjunto de venenos de diferentes espécies de escorpiões. No Brasil, ele é composto por 50% de veneno de *T. serrulatus* e 50% de *T. bahiensis*. Estas são imunoglobulinas derivadas de plasma animal, que são fragmentos F(ab')₂ (Monteiro et al., 2019). Desde a criação do protocolo de produção de soro antiescorpiônico por Todd (1909), os animais imunizados já apresentavam vários sintomas de envenenamento, incluindo dor no local da injeção, diarreia, salivação, suor e tetania. A fim de abrandar esses sintomas, o veneno era misturado com iodo antes da inoculação para minimizar os efeitos adversos da imunização (Todd, 1909).

No Brasil, os equinos são os animais de escolha para produção de antivenenos devido ao seu grande porte e boa resposta ao estímulo antigênico, o que favorece a produção de grandes quantidades de soros (Ferreira et al., 2016). Em 1917 que o primeiro antiveneno brasileiro eficaz foi produzido em cavalos contra o veneno de escorpião. Em 1918 a produção de antiveneno contra o veneno brasileiro de *Tityus* spp. foi realizada em larga escala (Carmo et al., 2015). A primeira geração de antivenenos foi produzida somente de plasma sanguíneo sem células. No ano de 1927, as imunoglobulinas foram purificadas do plasma de cavalo para uso em humanos. Formulações compostas de anticorpos purificados tinham níveis mais baixos de contaminação (ou seja, proteínas sanguíneas presentes no plasma ou soro), prevenindo assim o desenvolvimento de reações adversas em humanos. Usando essa abordagem, a produção de soros antiveneno foi melhorada em todo o mundo (Carmo et al., 2015).

Entretanto, ainda há problemática bioética envolvendo a produção desses soros pela imunização de equinos, pois os animais imunizados frequentemente ficam doentes devido aos efeitos tóxicos dos imunógenos usados, apresentando assim uma redução na expectativa e qualidade de vida. O desenvolvimento de imunógenos alternativos que sejam eficazes na produção de anticorpos neutralizantes, mas não tóxicos para os animais produtores, é fundamental para melhorar a qualidade de vida dos animais imunizados (Ferreira et al., 2016).

Assim, além dos protocolos clássicos que usavam veneno bruto como antígeno, abordagens mais recentes usando veneno desintoxicado, toxinas recombinantes ou peptídeos sintéticos começam a ser desenvolvidas na tentativa de melhorar a eficácia do antissoro, reduzindo efeitos adversos em humanos e vencendo a problemática bioética na utilização dos cavalos no processo produtivo. No entanto, até o presente momento, nenhum desses imunógenos foi usado na produção de antissoro comercial (Carmo et al., 2015).

As imunizações sucessivas usando veneno bruto enfraquecem muito a saúde dos animais imunizados e reduzem sua expectativa de vida (Carmo et al., 2015; Ferreira et al., 2016). Neste sentido, estudos usando peptídeos sintéticos mostram que é possível produzir antissoro neutralizante após a imunização com epítomos definidos (Benazzouz et al., 2024; Bermúdez-Méndez et al., 2018; Camperi et al., 2020; Chavez-Olortegui; Molina; Granier, 2002).

Embora alguns peptídeos tenham provocado a produção de anticorpos antitoxina neutralizantes, testes adicionais (formulações contêm múltiplos peptídeos) serão necessários para avaliar a capacidade desses peptídeos de provocar a produção de anticorpos de proteção cruzada capazes de neutralizar outras toxinas importantes para a toxicidade do veneno, como avaliado previamente em alguns estudos anteriores (Bermúdez-Méndez et al., 2018; Chavez-Olortegui; Molina; Granier, 2002), bem como assegurar que estes produzirão menos efeitos à saúde do animal produtor do soro antiescorpiônico, em larga escala.

1.2.2. Análises de segurança

Os soros antivenenos são, até então, a única abordagem terapêutica específica para neutralizar as toxinas presentes em venenos de animais como escorpiões e serpentes por meio da ligação antígeno-anticorpo. Mas antes de serem comercializados, são realizadas várias análises ao longo de sua produção para garantir a qualidade e eficácia do antiveneno que será administrado ao paciente. Essas análises ou testes, são realizados através de modelos *in vitro* já que a substituição de ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* como, por exemplo, a cultura celular, vem sendo apresentada por outros autores como altamente vantajosa. Essa metodologia é capaz de ofertar a substituição de animais, menores quantidades de veneno, são mais rápidos, mais simples de executar, mais baratos e demonstram menor variabilidade quando comparados aos ensaios *in vivo* (Cajado-Carvalho et al., 2017). Além disso, esses testes garantirão doses efetivas capazes de reduzir os efeitos adversos à saúde do animal produtor do soro antiveneno. Segundo a normativa ISO 10993-4, como testes essenciais e primários altamente empregados estão os ensaios de hemocompatibilidade como a hemólise, bem como ensaios de citotoxicidade como, por exemplo, o ensaio de MTT.

Além destas, outras avaliações de segurança envolvem avaliações de alterações no material genético. Para a avaliação de segurança de um composto, tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quanto pelo *Federal Drug Administration* (FDA), o teste de genotoxicidade é um requisito importante. Ambos seguem diretrizes internacionais, como as do ICH (*International Council for Harmonisation*), que estabelecem os testes padrão para genotoxicidade de produtos farmacêuticos e biológicos. A genotoxicidade por exemplo, trata dos processos que

alteram a base genética da vida, o ácido desoxirribonucleico – DNA. Estas alterações, quando ocorrem na estrutura físico-química, desencadeiam os processos de mutagênese. Já os processos de carcinogênese e teratogênese são alterações no determinismo genético ao nível celular ou orgânico, respectivamente (Silva; Erdtmann; Henriques, 2003).

Um agente que tem ação alquilante pode atingir o DNA e desencadear mutações devido a modificações na estrutura molecular, alterando a sequência das bases do DNA, caracterizando a mutagênese. Este agente pode ser químico ou formas de radiação, como a luz ultravioleta e raios x, que causam alterações irreversíveis e hereditárias no material genético da célula. Já o fruto de mutações somáticas em outras células do organismo pode desenvolver tumores, que por sua vez caracterizam a carcinogênese. Após acumular mutações por meio de vários processos de divisões, uma célula poderá perder o controle de sua divisão, desta forma podendo acarretar o surgimento de câncer (Ribeiro; Salvadori; Marques, 2003; Ruppenthal, 2013).

1.3. BIOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

As proteínas são moléculas essenciais envolvidas em quase todos os processos biológicos. Elas são responsáveis por constituir a estrutura celular, funcionalidade do metabolismo, biossinalização, regulação genética, síntese de proteínas, transporte de solutos através de membranas, função imunológica e fotossíntese. Os rápidos avanços nos aspectos experimentais da proteômica inspiraram vários métodos de análise de bioinformática no qual permitiu a descoberta da relação entre mecanismos reguladores de proteínas em nível molecular e comportamento fenotípico como, por exemplo, o desenvolvimento e a progressão de doenças (Chen; Zhou; Wang, 2020).

A bioinformática é uma área de pesquisa com caráter multidisciplinar onde é possível aplicar ferramentas computacionais para analisar, visualizar e armazenar informações associadas a macromoléculas biológicas (Luscombe et al., 2001). Além disso, através dela podemos fazer uma triagem de moléculas que mostram uma diferença entre pacientes e indivíduos saudáveis a partir de dados de microarranjos que variam em vários níveis. Esta metodologia de pesquisa é eficaz para explorar o

potencial mecanismo molecular de uma doença. A metodologia de bioinformática teve um grande avanço após o surgimento do primeiro banco de dados de proteínas, PDB. O PDB foi desenvolvido devido a necessidade de existir um local de armazenamento de informações de proteínas que estavam tendo sua estrutura tridimensional descritas. A partir disso, surgiram novos softwares, que intensificaram e facilitaram as pesquisas e estudos baseados nas estruturas de proteínas. Um desses software, é o Swiss PDB-Viewer, que possibilita a visualização molecular das proteínas e a visualização individual dos aminoácidos e suas interações químicas (Guex, Peitsch, 1997; Burley et al., 2017).

Uma das áreas de destaque na bioinformática é a proteômica, onde é possível analisar as proteínas, buscando sua identidade e função. Neste âmbito pode-se estudar as interações entre anticorpos e antígenos, proteínas e receptores (Peng, Gygi., 2001). Com o auxílio de ferramentas e técnicas computacionais como, por exemplo, softwares e bancos de dados, pode-se processar uma grande quantidade de dados biológicos em um curto espaço de tempo para diversas aplicações. Atualmente, as ferramentas de bioinformática são extremamente úteis, pois diferentes bancos de dados podem ser sincronizados e integrados analisando e retornando resultados complexos (Sun et al., 2013; Webb, Sali, 2016).

Uma das ferramentas da bioinformática que vem sendo muito utilizada são as voltadas para predição e modelagem de proteínas e peptídeos. Diversos *pipelines* de bioinformática vêm surgindo na literatura com intuito de buscarem regiões em uma proteína que mimetizam as funções das proteínas de interesse. A descoberta de novos fármacos e o processo de desenvolvimento do mesmo inclui um enorme investimento de capital, portanto, tornou-se um desafio desenvolver medicamentos inovadores e de baixo caráter econômico (Malathi, Ramaiah., 2018). Como alternativa podemos citar o desenvolvimento e síntese de peptídeos já que possui baixo custo financeiro e é de fácil monitoramento quanto à sua qualidade. Além disso, os peptídeos são quimicamente mais estáveis, de fácil conservação e são menores e mais flexíveis quando comparados às proteínas, além de não serem infecciosos ou tóxicos. Dada a sua facilidade de obtenção, os peptídeos sintéticos podem ser utilizados para diferentes fins terapêuticos (Klementiev et al., 2014; Machado-De-Ávila et al., 2014).

Recentemente, os peptídeos vêm atraindo mais atenção nos campos de biologia, química e medicina devido às suas características específicas como, por

exemplo, a sua diversidade estrutural e flexibilidade conformacional o que os permite um melhor controle com interações a receptores específicos. Eles são considerados agentes terapêuticos novos e mais eficientes, com efeitos colaterais reduzidos, além disso apresentam alta seletividade devido a interações específicas com seus alvos. Por serem menores, os peptídeos acabam tendo mais vantagens que um medicamento convencional, uma vez que devido ao seu pequeno peso molecular possuem melhor permeabilidade em comparação às proteínas terapêuticas, e acabam excluindo suas desvantagens, como efeitos colaterais adversos, interações medicamentosas, e impermeabilidade da membrana, respectivamente. Os peptídeos evoluíram ao longo dos anos como uma estrutura muito promissora para diversas aplicações, tanto em diagnóstico quanto em terapias (Apostolopoulos et al., 2021).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a segurança de um peptídeo derivado da neurotoxina Ts1, previamente identificado em estudos anteriores, com o potencial de ativar mecanismos de produção de anticorpos contra o veneno de escorpião. O presente estudo demonstra relevância clínica pois os acidentes por picadas de escorpiões são um problema de saúde pública em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente a produção de soros antiescorpiônicos depende do uso de animais de grande porte, como cavalos, um processo que, além de ser dispendioso, apresenta limitações éticas e riscos de intercorrências.

Sabendo disso, o uso de peptídeos sintetizados para ativação do sistema imunológico pode reduzir os custos de produção dos soros, aumentar sua especificidade para diferentes espécies de escorpiões e melhorar sua estabilidade em comparação ao soro tradicional. Resolver essa questão não só poderia melhorar a eficiência no tratamento de envenenamentos, mas também impactaria diretamente a saúde pública e as políticas de segurança sanitária, ao proporcionar uma solução mais acessível, eficaz e ética, com o potencial de tratar mais pessoas e reduzir os custos para os sistemas de saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a segurança da aplicação de um peptídeo derivado da neurotoxina do tipo Ts1 para a produção do soro antiescorpiônico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular uma curva de dose para avaliar o potencial de citotoxicidade do peptídeo derivado da neurotoxina TS1;
- Avaliar a identidade do peptídeo sintetizado derivado da neurotoxina Ts1 por meio da caracterização físico-química realizada com LC-MS;
- Determinar o perfil de citotoxicidade do peptídeo através de linhagens celulares do tipo NIH3T3 (fibroblasto de murino) e HT22 (hipocampo de murino);
- Avaliar o potencial hemolítico do peptídeo através da capacidade do peptídeo de causar hemólise em hemácias humanas, verificando sua compatibilidade com componentes sanguíneos e descartando possíveis efeitos adversos sistêmicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho aqui proposto foi realizado em duas etapas. Primeiramente, realizou-se a predição e síntese do peptídeo derivado da neurotoxina do tipo Ts1. Após sintetizado quimicamente e liofilizado, o peptídeo foi avaliado para a verificação da sua constituição e só após, foi utilizado nas posteriores análises *in vitro*. A segunda etapa do projeto é constituída através de técnicas *in vitro* para a avaliação da capacidade hemolítica do peptídeo sintetizado assim como a avaliação da sua citotoxicidade. Para isso, foram utilizadas células imortalizadas da linhagem NIH3T3 (fibroblasto de murino) e HT22 (hipocampo de murino).

3.1. PREDIÇÃO DO PEPTÍDEO MIMETIZANTE

3.1.1. Predição de epítopo conformacional por bioinformática

Para a obtenção da estrutura tridimensional, a pesquisa da proteína foi realizada selecionando o PDB, na qual foi selecionada a estrutura tridimensional de melhor resolução. O epítopo foi predito utilizando os algoritmos do *Epitope Prediction do Immune Epitope Database* (IEDB). Este servidor possui uma série de algoritmos voltados para predição de epítopos de células B. Foram aplicados os algoritmos *Emini Surface Accessibility*, que identifica na sequência primária os aminoácidos que estão mais expostos na superfície da proteína, e, o *Bepipred Linear Epitope Prediction*, que identifica os resíduos de superfície com maior probabilidade de serem reconhecidos por anticorpos. Os aminoácidos próximos espacialmente nas estruturas terciárias foram usados para desenhar peptídeo que mimetizou a região epitópica, como já descrito (Machado-De-Ávila et al., 2014). Os epítopos conformacionais foram desenhados combinando aminoácidos de diferentes regiões de proteínas, projetando-os nas estruturas 3D coletadas no PDB. O desenho dos epítopos conformacionais foi realizado usando o *SwissPDB-viewer* (Guex; Peitsch, 1997) (Berman et al,1999).

3.2. SÍNTESE DO PEPTÍDEO

A sequência peptídica foi sintetizada manualmente por *Fmoc Solid phase Peptide Synthesis* conforme descrito por Machado-de-Ávila, et al. (2014) e adaptado por Scussel et al. (2022). Nesta técnica, o N-terminal de cada aminoácido é protegido por 9-fluorenil metoxicarbonil (Fmoc). Além disso, existe um grupo de proteção adicional nas cadeias laterais para evitar reações colaterais. A síntese é realizada em uma seringa de 6 mL com um filtro de polietileno hidrofóbico 3 x 9 (mm) (#20 µm). O resíduo de aminoácido C-terminal é ancorado por meio de seu grupo ácido carboxílico em suporte sólido insolúvel, resina rink. O grupo Fmoc é removido por 4-metilpiperidina 25% em dimetilformamida (DMF) em dois ciclos de desproteção, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min. Após são feitas três lavagens com DMF e uma com diclorometano (DCM). O acoplamento do primeiro aminoácido à resina é realizado por ativação do grupo carboxílico com os reagentes de acoplamento, DIC (N, N-diisopropilcarbodiimida) e Oxyma (etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato) por 30 min. Em seguida, são feitas quatro lavagens com metanol intercalado com DMF e uma última lavagem com DCM. Entre todos os ciclos de desproteção e acoplamento, uma etapa de controle colorimétrico de desproteção e acoplamento é realizada usando azul de bromofenol 0,1% em DMF. Os ciclos de desproteção e acoplamento são realizados até que a cadeia peptídica na resina seja totalmente sintetizada por sucessivas ligações peptídicas que acoplam resíduos de aminoácidos do C-terminal em direção ao N-terminal. Após o último ciclo de desproteção, a etapa de clivagem é realizada para remover os grupos de proteção da cadeia lateral e clivar a cadeia peptídica da resina. A solução de clivagem é composta por ácido trifluoroacético (TFA): H₂O: trietilsilano: 1,2-etanoditiol (92,5: 2,5: 2,5: 2,5, v/v). A clivagem dura em média 3 h, onde a resina é incubada na solução de clivagem. O peptídeo é precipitado em éter etílico gelado (~4°C) e mantido overnight (-20 °C) para ser recuperado por centrifugação. A primeira etapa de centrifugação (10.000 × g, por 10 minutos a 4°C), é realizada após o overnight e posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, o peptídeo é lavado com éter etílico gelado, recentrifugado (10.000 × g, por 10 minutos a 4°C), o sobrenadante é descartado mais uma vez e, em seguida, o peptídeo é liofilizado.

3.3. IDENTIDADE DO PEPTÍDEO POR LM-CS

O peptídeo sintético foi caracterizado por espectrometria de massa electrospray. A caracterização foi realizada utilizando espectrômetro de massa Xevo TQ-S micro Triplo Quadrupolo, com fonte de ionização de geometria Z-Spray, acoplado a um sistema UPLC (Waters Corporation, Framingham, MA, USA). Uma amostra do peptídeo foi diluída em acetonitrila (LC/MS) e introduzidas no equipamento por infusão em modo de ionização positiva. Respeitando o limite máximo de detecção do equipamento [2000 m/z], os íons precursores foram submetidos a fragmentação por colisão com argônio, e os espectros de fragmentação foram considerados na análise. O espectro de massas foi obtido e analisado pelo software MassLynx, versão V4.2 SCN1001 2019, Waters Inc.

3.4. CULTURA CELULAR

Para os ensaios de cultura celular, foram utilizadas as células de linhagem NIH3T3 e HT22, fibroblasto e hipocampo de murino, respectivamente. Essas células foram escolhidas, pois se trata de constituintes de tecidos envolvidos no processo de envenenamento por *T. serrulatus*.

As células foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm², com meio DMEM suplementado com 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (10 U.L/mL), 10 % de soro fetal bovino inativado (SFB) e altos níveis de glicose (DMEM completo). Para o crescimento e adesão celular, elas permaneceram em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. As trocas de meio foram realizadas em dias alternados, podendo haver adaptações, até se obter uma confluência de células suficiente, isto é, em torno de 80%, para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro*. Ao obter a confluência necessária, as células seguiram para a etapa de tripsinização, onde foi retirado o DMEM da garrafa e adicionado 4 mL de tripsina durante 5 min, ou até as células ficarem em suspensão, desaderindo desta forma do fundo da garrafa. Após este processo foi adicionado 4 mL de DMEM com o intuito de neutralizar a tripsina.

Com a finalização do processo de neutralização, foi então realizada uma contagem no número de células na câmara de Neubauer e posterior à contagem, as células foram diluídas em meio DMEM completo na concentração desejada. Foram adicionados 500 µL/poço em placas de 24 poços, com uma concentração final 1x10⁵ células/poço e após o processo de acondicionamento em placa, elas foram

incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada, sob atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, a fim de proporcionar a aderência das células na superfície da placa, para então realizar os ensaios celulares.

Decorrido o período de aderência das células, elas foram dispostas nas placas sob a divisão prevista dos grupos experimentais: controle negativo e experimental. Para o grupo controle negativo não foi adicionado nenhuma solução ao meio. No grupo experimental, as células receberam o peptídeo sintético nas concentrações 50, 100, 150 e 200 µL.mL⁻¹. Como forma de avaliação da dose peptídica, as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

3.5. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

Esse método visou avaliar a viabilidade celular, pela redução do brometo de 3- 4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que em sua forma oxidada é solúvel em água e possui uma coloração amarela. Ao ser reduzido, o MTT forma cristais de formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Essa reação de redução ocorre nas mitocôndrias das células, fazendo com que a viabilidade celular seja diretamente proporcional à produção dos cristais de formazan (Mosmann, 1983). Para isso, foram adicionados 100 µL/poço em uma placa de 96 poços, com uma concentração final 1x10⁴ células/poço permanecendo incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, a fim de proporcionar a aderência das células na superfície da placa.

Após a incubação das células com o peptídeo sintetizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, foi preparada uma solução de 0,5 mg/mL de MTT diluído em PBS. Finalizando cada tempo de incubação, o tratamento foi retirado dos poços, adicionou-se 100 µL/poço da solução de MTT e as células voltaram para uma incubação, porém agora, por 3 horas (5 % de CO₂ a 37 °C). Este período é necessário para permitir a formação dos cristais de formazan. Ao final desta incubação, a solução de MTT foi retirada de todos os poços e adicionou-se 100 µL/poço de álcool isopropílico, a fim de solubilizar os cristais de formazan. Por fim, a placa foi analisada em espectrofotômetro de placas por absorvância, no comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade celular é determinada através da comparação dos resultados das absorbâncias dos grupos experimentais, com as absorbâncias do grupo controle, ou seja, o grupo que possui apenas células viáveis. Sendo assim, os resultados serão apresentados em porcentagem de viabilidade celular, onde o grupo controle mimetiza 100% de células vivas. Perante isso, foram realizados os cálculos, para obter a porcentagem de células viáveis em cada grupo, para que dessa forma seja avaliado a toxicidade do peptídeo proposto.

3.6. ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

O teste de hemólise foi conduzido utilizando eritrócitos humanos coletados de três voluntários e isolados por lavagens com solução salina. Após a última lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos. Os eritrócitos foram então incubados com o peptídeo em concentrações distintas das realizadas previamente no projeto piloto (50, 100 e 150 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), a uma temperatura de 37 °C e sob agitação constante a 100 rpm por 60 minutos.

Após a incubação, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, e 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços, onde a absorbância foi medida a 540 nm utilizando um espectrofotômetro SpectraMax M3. Como controles positivo e negativo, 40 μL da suspensão de eritrócitos foram incubados com 960 μL de água destilada e solução salina, respectivamente. As análises foram conduzidas em triplicata, e os resultados foram expressos como a porcentagem de hemólise.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, para comparação entre as médias das amostras paramétricas, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido de *post hoc* de Bonferroni. O pacote estatístico utilizado foi o GraphPad Prism versão 10.

3.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade do Extremo Sul Catarinense, número do protocolo CAAE 14560419.9.0000.0119.

4. RESULTADOS

Em trabalhos realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa o peptídeo aqui testado foi aplicado e avaliado em animais com uma concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No antígeno, há regiões chamadas de epítipo que são os locais de interação com anticorpo responsável pela geração de uma resposta imune. No anticorpo estes locais são chamados de parátomos. A análise para mimetizar estas regiões permitiu o isolamento dos aminoácidos da neurotoxina Ts1 responsáveis por ativar o mecanismo de resposta imune, já que estes estão relacionados com a ligação ao anticorpo validados anteriormente e estudo *in vivo* (anexo 1,2 e 3).

Como forma de validar a concentração já executada no projeto piloto, nos quais os resultados estão apresentados nos anexos 1, 2 e 3, mas também para avaliar doses superiores, as análises de bioinformática assim como a síntese do peptídeo foram performadas novamente no laboratório. Dando sequência na pesquisa, esse peptídeo foi utilizado para avaliação da segurança em ensaios *in vitro* visando avaliar sua ação hemolítica e ou se apresenta potencial de citotoxicidade em doses maiores.

4.1. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Identificaram-se os aminoácidos na estrutura tridimensional da proteína Ts1 (PDB: 1NPI) utilizando o software de visualização de estruturas proteicas *Swiss-PDBViewer*. Os aminoácidos selecionados da análise do algoritmo do IEDB, considerados os mais acessíveis, foram destacados em verde (Figura 6). Posteriormente, foi localizada uma região da proteína com alta densidade desses aminoácidos, considerados potenciais epítomos. A definição dessa região levou em conta um diâmetro de 20 \AA , correspondente ao tamanho médio de um parátomo de anticorpo (Machado DE Ávila et al., 2014). A região selecionada incluía os seguintes aminoácidos: HIS8, GLU9, ARG25, ILE29, LYS31, ASN49, TRP50, LYS52, LYS60.

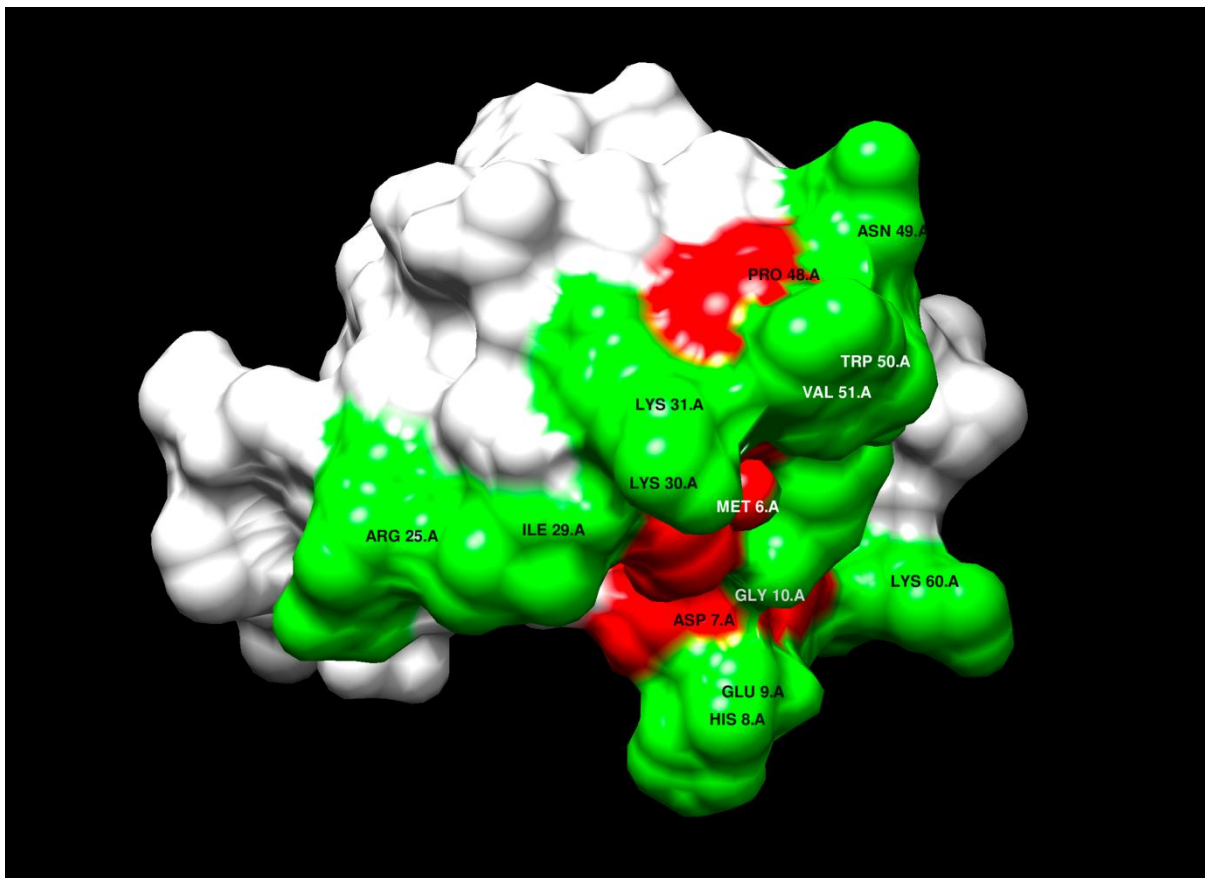


Figura 6 – Predição do epítipo conformacional proveniente da neurotoxina Ts1 (PDB: 1NPI). Em verde: aminoácidos selecionados da predição utilizando algoritmo do IEDB. Em vermelho: aminoácidos de ligação para manter a conformação 3D.

Fonte: Da autora, 2024.

Com base na proximidade espacial entre esses aminoácidos e seus vizinhos, foi desenhado um peptídeo que mimetiza a região epitópica identificada. Os aminoácidos destacados em verde foram ligados, e, quando necessário, utilizaram-se aminoácidos de ligação (destacados em vermelho) para unir segmentos, respeitando a proximidade espacial, e mimetizar a estrutura conformacional. O peptídeo conformacional proposto é composto pela seguinte sequência de 15 aminoácidos: ARG-25, ILE-29, LYS-31, PRO-48, ASN-49, TRP-50, VAL-51, LYS-30, LYS-52, MET-6, ASP-7, GLY-10, LYS-60, GLU-9 e HIS-8.

4.2. IDENTIDADE DO PEPTÍDEO SINTETIZADO

O peptídeo aqui sintetizado, cuja nomenclatura é CETs1, foi produzido seguindo a sua predição prévia em trabalhos anteriores e confirmado por nova

predição em outra metodologia, utilizando IEDB. Ele possui em sua constituição 15 aminoácidos isolados e selecionados do epítipo da neurotoxina Ts1, sendo eles ARG-25, ILE-29, LYS-31, PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51, LYS-30, LYS-52, MET-6, ASP-7, GLY-10, LYS-60, GLU-9 e HIS-8. Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes às propriedades físico-químicas e constituição do peptídeo CETs1.

Tabela 1 - Sequências do epítipo conformacional de acordo com a posição de aminoácidos na proteína Ts1 e propriedades físico-químicas do peptídeo sintético.

Peptídeo	Sequência peptídica	Massa isotrópica (g/mol)	Ponto isoelétrico	Solubilidade em água
CETs1	RIKPNWVKKMDGKEH	1866,21	10,00	Boa

Fonte: Tabela elaborada pela autora, 2025.

Como forma de confirmação de sua identidade, foram realizadas as avaliações de peso molecular e a análise do padrão de fragmentação (Tabela 2). Para isso, a massa monoisotópica do CETs1 foi calculada através da somatória do peso de isótopos mais leves de cada elemento químico constituinte do mesmo como, por exemplo, ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O (Figura 7 e Apêndice 1) e comparada com o resultado expresso pelo espectrômetro de massas.

Tabela 2 – Resultados do cálculo de peso molecular da massa monoisotópica e padrão de fragmentação para o peptídeo caracterizado por LC/MS.

Peptídeo	Fórmula molecular	Massa isotrópica (g/mol)	Fragmentação massa (m/z)
CETs1	$\text{C}_{83}\text{H}_{136}\text{N}_{26}\text{O}_{21}\text{S}_1$	1866,21	1866,0172 (+1) 933,5125 (+2) 622,6776 (+3) 467,2602 (+4) 374,0097 (+5) 311,8427 (+6)

Fonte: Tabela elaborada pela autora, 2025.

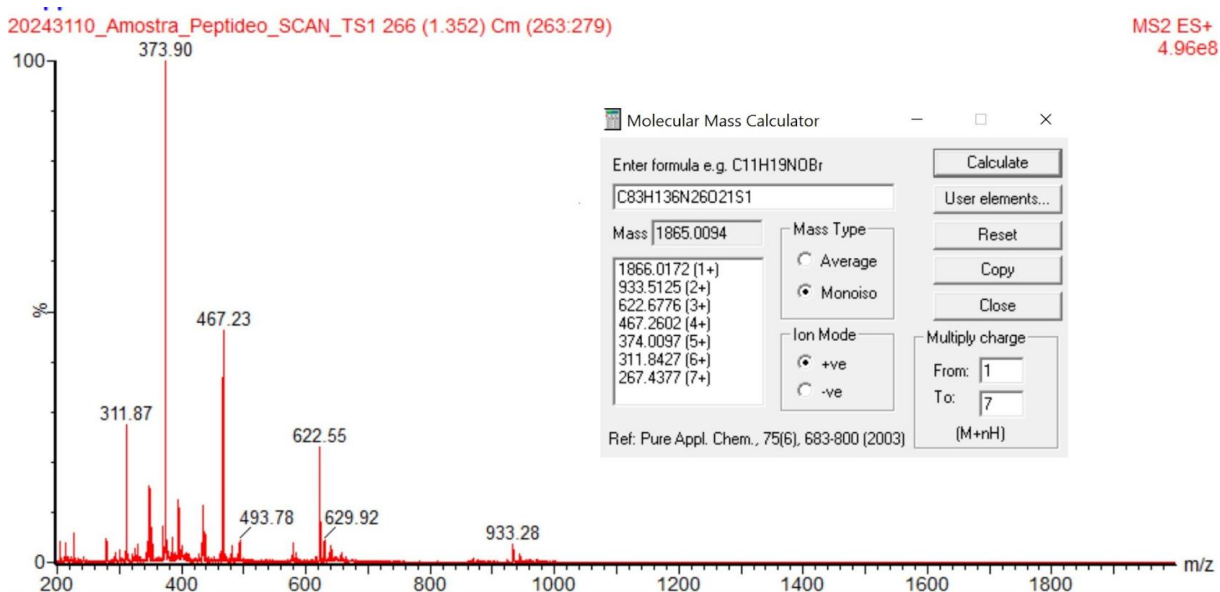


Figura 7 - Espectro de massa (m/z) confirmatório do padrão de fragmentação do peptídeo Ts1.

Fonte: da autora, 2025.

Como evidenciado na Figura 7, o valor obtido para a massa isotópica correspondente ao resultado detectado pelo LC/MS foi de 1865,00 g/mol e esse resultado foi comparado com o proposto na Tabela 1, no qual resultou em 1866,21 g/mol. Percebe-se que as massas obtidas, de forma calculada e através do espectro de massas, estão próximas. Este fato é indicativo de uma síntese efetiva, pois acredita-se que os aminoácidos propostos anteriormente, estão presentes na composição do peptídeo CETs1.

Os dados expostos na Tabela 2 e Figura 6, demonstram que a fragmentação dos íons precursores, isto é, aqueles que compõem a molécula de forma completa, foram isolados no massas e então fragmentados. A avaliação realizada pelo espectro permite a reflexão do padrão de fragmentação do peptídeo, este calculado anteriormente. Os resultados obtidos através da calculadora do *software* fizeram uma previsão do padrão de fragmentação (em termos de massa/carga) e o que foi avaliado no espectro demonstra a confirmação desse padrão, que por sua vez valida a identidade do peptídeo.

4.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Através das análises realizadas com diferentes concentrações do CETs1 e da avaliação dos efeitos em três momentos distintos (24, 48 e 72 horas) fica

evidenciado que o peptídeo proposto não apresentou efeitos citotóxicos nas linhagens de células utilizadas. Essa avaliação em períodos diferentes é importante para observar se a toxicidade, caso presente, muda ao longo do tempo levando sempre em consideração a dose avaliada. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos através da utilização das linhagens celulares, doses aplicadas e tempos avaliados.

Para que um composto não seja considerado tóxico é necessário que haja uma confluência de pelo menos 80% de viabilidade celular. Através dos resultados exemplificados na Figura 7, independentemente da dose ou do tempo avaliado, as linhagens celulares apresentaram taxas de sobrevivência acima de faixa de confluência, indicando baixa toxicidade do peptídeo.

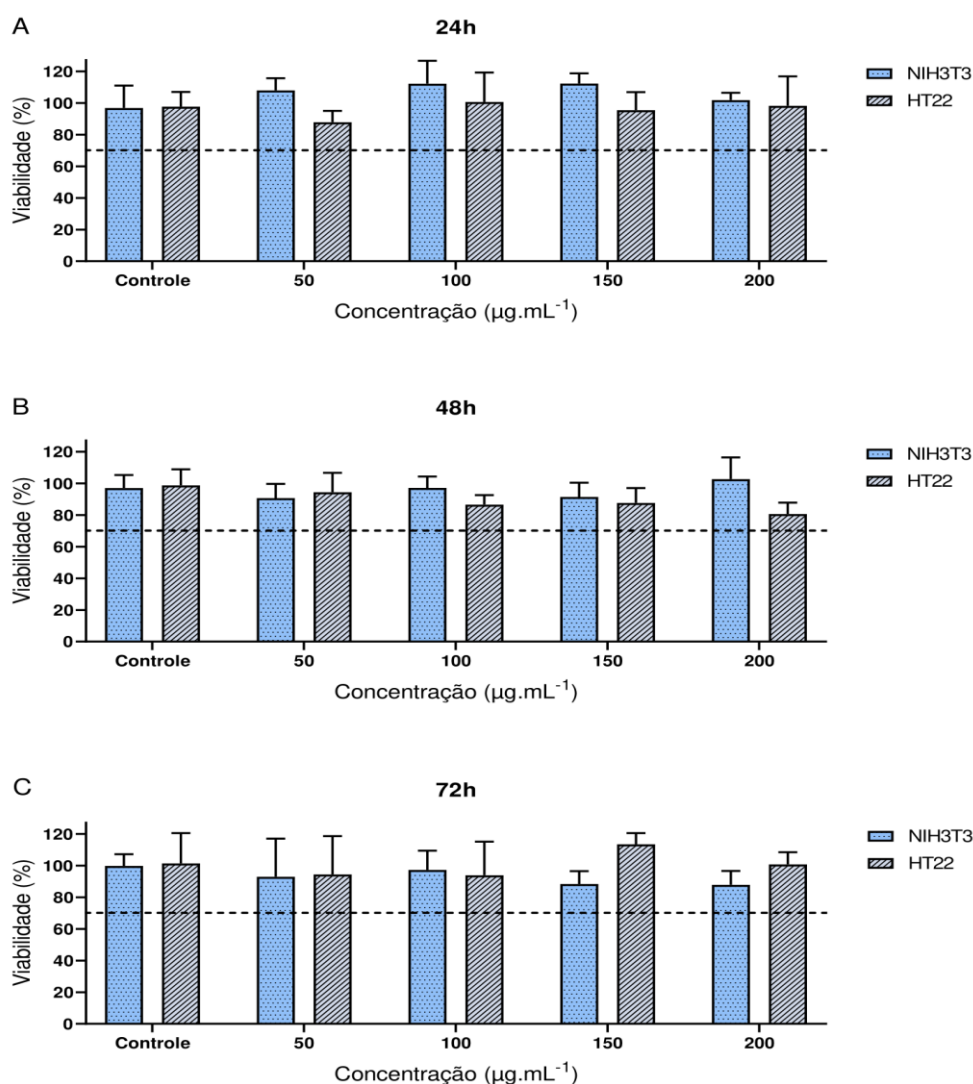


Figura 8 - Avaliação da viabilidade celular da aplicação do CETs1 em células NIH3T3 e HT22 nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). A aplicação do CETs1 não

ocasionou diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas e o grupo controle, bem como entre as linhagens celulares avaliadas. Fonte: Da autora, 2025.

4.4. ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

Para a avaliar a extensão do CETs1 em ocasionar ruptura da membrana de eritrócitos foi realizado o ensaio de hemocompatibilidade ou técnica de hemólise. Foi avaliado se o peptídeo possui efeito hemolítico nas concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Vale ressaltar que a hemoglobina possui um espectro de absorbância distinto e o grau de hemólise foi calculado seguindo a Fórmula I. Os resultados obtidos com a fórmula, foram agrupados e representados na Figura 9, no qual consta os resultados obtidos através da técnica de hemólise.

$$\square\square (\%) = \frac{\square\square\square\square\square\square - \square\square\square\square\square}{\square\square\square\square\square - \square\square\square\square\square} 100\% \quad (I)$$

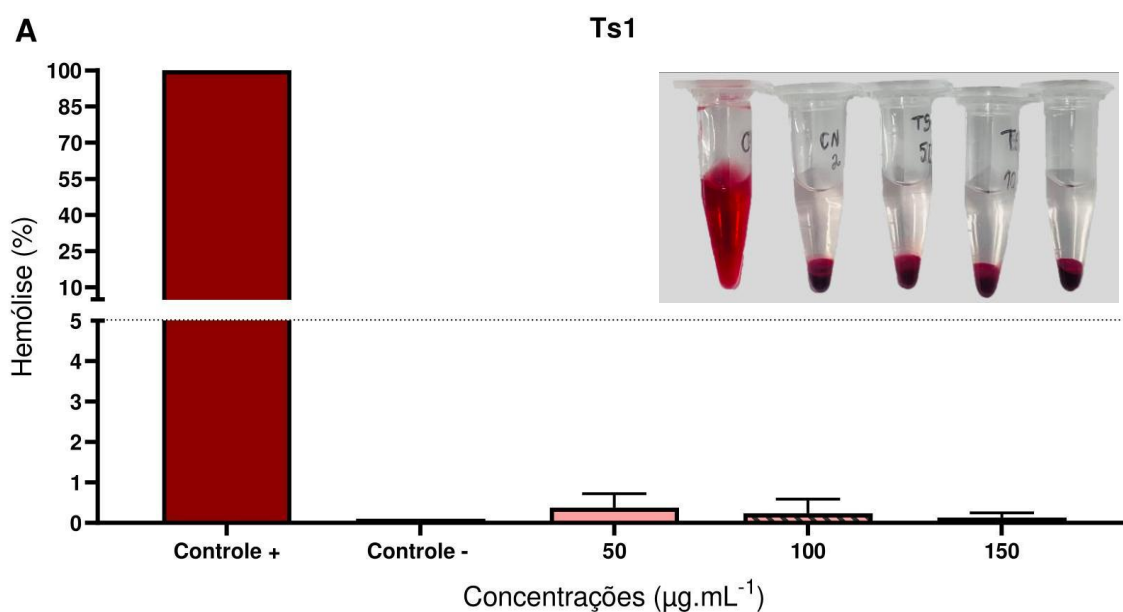


Figura 9 - Avaliação do percentual da capacidade hemolítica do peptídeo CETs1. Fonte: Da autora, 2025.

Na Figura 9 em ambas as concentrações avaliadas, pode-se verificar que o percentual de hemólise ficou muito próximo ao obtido pelo controle negativo, esses dados demonstram que o CETs1 não ocasionou dano significativo à membrana dos eritrócitos e conseqüentemente desta forma, não gerou extravasamento do conteúdo celular, isso significa que o peptídeo proposto não possui um caráter hemolítico.

5. DISCUSSÕES

A Ts1 é a principal toxina do veneno escorpião *T. serrulatus*, uma β -toxina que representa cerca de 15% do seu peso solúvel (Pessini et al, 2007). Além disso, a Ts1 apresenta alta similaridade na sua estrutura primária com outras toxinas do veneno (Ts2, Ts3 e Ts4) (Machado De Ávila et al, 2014). Os dados encontrados no PDB mostram que a Ts1 é composta por 61 aminoácidos (Pinheiro et al, 2003). Alguns trabalhos mostram que o tamanho das toxinas escorpiônicas giram em torno de 60 a 70 aminoácidos. Normalmente, são moléculas com 3 folhas-betas e uma alfa-hélice, formadas por 4 pontes de dissulfetos o que pode estar relacionado com a capacidade de ligação aos canais de Na^+ (Duarte et al, 2010; Machado De Ávila et al, 2011, Machado De Ávila et al, 2014). Por outro lado, o peptídeo utilizado neste trabalho apresenta apenas 15 aminoácidos e uma ponte de dissulfeto o que pode ser atribuído a sua não toxicidade, já que ele não interage com os canais iônicos e, desta forma, não apresentou efeito tóxico.

Mesmo que o CETs1 seja considerado um peptídeo pequeno com 15 aminoácidos, divergindo de sua proteína original, ele pode ser capaz de gerar boa resposta imune. Segundo relata Kozlova et al (2015) em alguns epítomos, poucos aminoácidos são responsáveis por ativar uma resposta imune. Como a conformação da Ts1 é um ponto importante para a interação com o canal, faz-se indicar que um epítopo para Ts1 deva ser conformacional e não linear. Este fato vai de encontro ao relatado por Van Regenmortel (1996), onde afirma que os epítomos que promovem uma reação imune são na maioria das vezes conformacionais. Somado a isso, a predição de epítomos conformacionais através da bioinformática é um método que, possivelmente, substituirá a atual forma de produção de antiveneno, que apresenta alto custo de produção, além do baixo rendimento do produto final. Estudos demonstram que anticorpos que se ligam a epítomos conformacionais possuem maior poder neutralizante sobre a toxicidade do veneno, já que esses anticorpos são mais específicos a neutralizar o efeito tóxico do veneno (Devaux et al, 1997; Alvarenga et al, 2005; Loret et al, 1992).

O CETs1, predito e sintetizado, é formado pelos aminoácidos ARG-25, ILE-29, LYS-31, PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51, LYS-30, LYS-52, MET-6, ASP-7, GLY-10, LYS-60, GLU-9 e HIS-8. Estes aminoácidos estão bem distribuídos na

estrutura primária da proteína Ts1, já que são encontrados na porção N-terminal (MET-6, ASP-7, HIS-8, GLU-9 e GLY-10), central (ARG-25, ILE-29, LYS-30 e LYS-31) e C-terminal (PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51 e LYS-52 e LYS-60). No entanto, estão todos bem próximos espacialmente em uma mesma região na proteína. Machado de Ávila et al. (2014) viram em seu trabalho a presença de um epítipo linear na porção C-terminal da proteína formado pelos aminoácidos LEU-47, PRO-48, ASN-49, TRP-50, VAL-51, LYS-52, VAL-53, TRP-54, ASP-55, ARG-56, ALA-57, THR-58, ASN-59, LYS-60 e CYS-61, capaz de reconhecer um anticorpo policlonal anti-TsTFG50 (Fração tóxica do TsV purificada em coluna Sephadex G-50). Interessantemente, os seis aminoácidos preditos na porção C-terminal (PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51 e LYS-52 e LYS-60) do peptídeo aqui utilizado, aparecem no peptídeo de Machado de Ávila et al. (2014).

Esta hipótese é reforçada, pois, no mesmo trabalho, Machado de Ávila et al. (2014), ao estudar outras duas toxinas do veneno, a Ts2 (uma outra β -toxina) e a Ts3 (principal alfa-toxina do veneno) encontraram dois epítipos lineares para cada toxina. Um na região C-terminal da toxina e outro na região central da toxina, a mesma região central (ARG-25, ILE-29, LYS-30 e LYS-31) do epítipo conformacional predito exposto aqui. Assim, além de reforçar a ideia dos epítipos de Machado de Ávila et al. (2014) serem na verdade conformacionais ao invés de lineares, os aminoácidos da porção C-terminal e central eram importantes para reconhecer e neutralizar outras toxinas do TsV.

A importância da região central na Ts1 é ainda relatada no trabalho de Alvarenga et al. (2005), onde viram a interação dessa região, mais especificamente o epítipo linear formado pelos aminoácidos LYS-30, LYS-31, GLY-32, SER-33, SER34, GLY-35, TYR-36, SER-37, ALA-38, TRP-39, PRO-40, ALA41, SER-42, TYR-43, SER-44 com um anticorpo monoclonal anti-TsTFG50. Os cinco aminoácidos da região central do peptídeo (ARG-25, ILE-29, LYS-30 e LYS-31) fazem parte do epítipo linear encontrado no trabalho destes autores, mostrando novamente que o epítipo conformacional é bastante reativo e capaz de interagir com as toxinas do veneno do escorpião *T. serrulatus*.

Alvarenga et al. (2005) ao realizarem o ensaio de ALASCAN, no qual sintetizaram o peptídeo trocando em cada síntese um dos aminoácidos do epítipo linear por uma alanina, verificaram que a LYS-30 e a LYS-31 são responsáveis pela ligação do epítipo com o anticorpo monoclonal anti-TsTFG50. Nos dois peptídeos

propostos em que a LYS-30 ou LYS-31 foram substituídas por uma alanina, não ocorreu reatividade com o anticorpo monoclonal. O peptídeo CETs1 proposto contém esses dois aminoácidos então, pode ser indicativo de que é um epítopo conformacional e que a predição foi capaz de encontrar os resíduos chaves para interação com o anticorpo.

Os primeiros estudos do fracionamento do TsV começaram com Gomez e Diniz na década de 1960, eles relataram o primeiro processo de fracionamento com a primeira fração obtida, a “tityustoxin”. Por muito tempo esse componente foi considerado uma toxina purificada, porém com o aprimoramento da metodologia de purificação foi constatado que se trata de um “*pool*” constituído de vários peptídeos. Desde os primeiros processos de purificação, várias toxinas foram isoladas e sequenciadas e alguns dos seus efeitos biológicos foram caracterizados. O TsV apresenta uma sua composição oligopeptídeos, glicosaminoglicanos, proteínas, nucleotídeos, aminoácidos e uma grande variedade de peptídeos. Alguns desses compostos possuem ação de modulação de canais iônicos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- principalmente com atividade enzimática através de neurotoxinas. Segundo Pimenta et al. (2001) o veneno bruto pode ser facilmente disperso em água ou soluções salinas, preservando dessa forma a estabilidade de seus peptídeos iônicos.

Como o CETs1 é derivado da neurotoxina Ts1 presente no veneno bruto, ele apresentou boa solubilidade em água seguindo os mesmos padrões do veneno convencional. Além disso, Pimenta et al. (2001) evidenciam que a espectrometria de massa não é apenas uma ferramenta poderosa para uma determinação precisa e sensível da massa molecular e pureza de amostras, mas também é amplamente utilizada para a elucidação estrutural a fim de combinar e identificar compostos presentes em amostras biológicas brutas. Através de LC/MS podemos observar uma boa correlação dos dados teóricos de massa isotrópica com os resultados obtidos através da técnica da espectrometria de massas. Essa boa correlação é válida pois demonstra que o peptídeo predito e sintetizado, apresenta em sua constituição todos os aminoácidos propostos em sua estrutura através das técnicas de bioinformática.

A principal forma atualmente de obtenção dos soros antiescorpiônicos, se dá através da imunização de animais como, por exemplo, cavalos e ovelhas que devido ao seu grande porte e boa resposta ao estímulo antigênico, favorecem a produção de grandes quantidades de soros. Porém o desenvolvimento de

imunógenos alternativos que sejam eficazes na obtenção de anticorpos neutralizantes, mas não sejam tóxicos para os animais produtores, é fundamental para melhorar a qualidade de vida dos animais imunizados e aumentar a especificidade de ação do composto. Em trabalhos realizados previamente por este grupo de pesquisa, o peptídeo aqui utilizado, foi testado *in vivo* em modelo com murinos onde foi avaliado a capacidade imunizante do peptídeo quando comparado com o veneno bruto de *T. serrulatus*. Vale lembrar que para um peptídeo ser considerado um epítipo conformacional, ele deve possuir capacidade antigênica e imunogênica.

A resposta antigênica é definida como aquela capaz de induzir a produção de anticorpos, já a resposta imunogênica é aquela capaz de gerar uma resposta imunológica (Abbas; Lichtman; Pober, 1994). Assim, para confirmação da sua capacidade antigênica, Triches (2017) realizou o ensaio de ELISA indireto. No Anexo 1 constam os resultados da avaliação da resposta antigênica obtidos através do teste ELISA, onde pode-se observar que o CETs1 foi capaz de gerar anticorpos, comprovando, assim, sua capacidade antigênica. Já para a avaliação da capacidade imunogênica, os autores realizaram uma imunização prévia de. No Anexo 3 fica evidenciado que todos os animais que foram imunizados com veneno de *T. serrulatus* sobreviveram ao envenenamento, enquanto os animais que receberam BSA durante as imunizações foram ao óbito. O peptídeo desenhado, sintetizado e utilizado como imunógeno no trabalho anterior e no presente estudo foi capaz de neutralizar 75% dos animais que receberam o veneno. Revelo et al. (1996), demonstraram pela primeira vez em termos proteicos, que quando administrado o soro anti-escorpiônicos para veneno de *T. serrulatus* em camundongos, após um período máximo de 2 horas de inoculação, o veneno não se encontra mais presente no organismo do indivíduo. De acordo com os pesquisadores, após tal processo de envenenamento permanecem no organismo apenas sequelas ocasionadas pela ação das toxinas.

Neste mesmo trabalho, Triches (2017) avaliou a ação do antiveneno sendo que este não apresentou reatividade com o peptídeo. Essa ausência de reatividade do anticorpo antiveneno com o peptídeo pode ser atribuída à complexidade do veneno. O antiveneno é uma mistura de anticorpos contra diversas moléculas. Dentre essas moléculas, está a Ts1, que gerará alguns anticorpos específicos contra esta toxina, e dentre esses anticorpos estão aqueles capazes de

realizar o efeito neutralizante. Então, acredita-se que o antiveneno não foi capaz de reconhecer o peptídeo devido aos anticorpos específicos estarem diluídos no antiveneno. Estes resultados estão apresentados no Anexo 2, onde fica destacado que o CETs1 não foi capaz de reconhecer o veneno de *T. serrulatus*, utilizado para sensibilizar a placa de ELISA.

De acordo com Benazzouz et al., 2024, os antivenenos vem se mostrando geralmente eficazes no salvamento de milhares de vidas em todo o mundo, porém a sua produção envolve o processo de imunização repetida de grandes mamíferos (principalmente cavalos e ovelhas), seguida pela purificação dos anticorpos da IgG do plasma hiperimunizado. Como produto final deste processo, tem-se mistura de anticorpos neutralizantes de toxinas e anticorpos contra todos os outros antígenos que o animal imunizado encontrou ao longo de sua vida, resultando em um baixo título de anticorpos terapeuticamente relevantes. Mesmo sendo a principal linha de obtenção de anticorpos neutralizantes, uma desvantagem demonstrada em diversos estudos está associada a esta produção convencional de antiveneno. Algumas pesquisas como a desenvolvida por Duzzi et, al. 2021, vêm sendo realizadas a fim de estudar o uso de toxinas e peptídeos recombinantes ou sintéticos, bem como estratégias de vacinação de DNA para aumentar os anticorpos terapeuticamente relevantes por meio de procedimentos de imunização.

O CETs1 por ser um peptídeo mimetizante da proteína Ts1 possui alta probabilidade de ser utilizado como imunógeno pois além de não apresentar efeitos hemolíticos e citotóxicos, apresenta alta especificidade com a IgE específica. Vale ressaltar que os soros antivenenos são obtidos através da aplicação de uma dose não letal nos animais, porém esta dose é geralmente baixa para não levar o animal ao óbito, tendo como único objetivo, a produção dos títulos de anticorpos. Nestes casos, a titulação de anticorpos obtidas é baixa, sendo necessárias outras aplicações de veneno nos animais para induzir a produção de anticorpos antiveneno. Entretanto o animal produtor do soro antiveneno ainda fica vulnerável a sintomatologia do envenenamento. Com a utilização do peptídeo proposto, pode-se pressupor que a titulação de anticorpos obtidos será maior ou equivalente sem proporcionar os efeitos adversos do veneno bruto, pois a dose de segurança aplicada, também é mais elevada. Através disso, podemos ter uma produção de soro antiescorpiônico mais segura para os animais e mais eficaz devido ao seu percentual de aproveitamento da titulação de anticorpos do tipo IgE. Mesmo que os

peptídeos sintéticos sejam uma via possível de imunização, Ramos et al. (2013) demonstra que o veneno bruto não poderá ser retirado totalmente, pois ele é necessário para o controle de qualidade do antiveneno e validação de pesquisa para garantir que novos antivenenos fabricados tenham eficácia adequada.

Mesmo que ensaios *in vivo* prévios tenham demonstrado boa resposta do peptídeo CETs1 em avaliação de resposta imune, testes de segurança precisam ser realizados antes do composto ser aplicado na produção em larga escala, bem como para evoluir as análises *in vitro* e *in vitro*, como forma a garantir a qualidade e eficácia do antiveneno que será administrado ao paciente. Segundo Medeiros et al. (2020), o TsV bruto demonstrou efeito citotóxico e hemolítico dependente da dose aplicada, fato este que não foi observado ao testar o peptídeo CETs1 *in vitro*. O peptídeo proposto foi avaliado e utilizado com concentrações superiores ao encontrado na literatura e através de ensaios de citotoxicidade do tipo MTT e ensaios de hemocompatibilidade, verificou-se que ele não apresentou toxicidade às linhagens celulares e nem resultados hemolíticos.

De acordo com a normativa ISO 10993-4 o teste de citotoxicidade é uma etapa inicial para determinar a biocompatibilidade. Porém resultados negativos na citotoxicidade não excluem a necessidade de testes adicionais, como hemocompatibilidade, isto é, embora a citotoxicidade avalie os efeitos tóxicos diretos em células, a análise através da avaliação de hemólise determina o impacto do composto sobre células sanguíneas e componentes plasmáticos. Quando um composto apresenta redução da viabilidade celular superior a 30% é considerado que o mesmo apresente um efeito citotóxico, fato esse que não foi observado nos resultados exemplificados na Figura 8. O peptídeo CETs1, não gerou redução significativa na viabilidade celular, mantendo sua viabilidade acima de 80% estando de acordo com a normativa apresentada e podendo ser considerado como um composto de baixa toxicidade.

Percebe-se na Figura 8 em B, que no tempo de 48 horas com a concentração de $200 \mu\text{L.mL}^{-1}$, a linhagem celular HT22 apresentou uma redução na viabilidade celular quando comparado com a linhagem NIH3T3, ainda que não estatisticamente significativa. Diversos são os fatores que podem ter ocasionado esta diminuição, um deles seria que a HT22, por se tratar de uma linhagem hipocampal, acaba sofrendo mais os efeitos do CETs1 já que ele é derivado da neurotoxina Ts1, assim sugere-se evoluir estes estudos com outros ensaios *in vitro*,

como avaliação de proliferação celular, mecanismo de morte celular e ensaio cometa para avaliação de genotoxicidade. Segundo Freire-Maia e Campos (1989), os efeitos centrais do TsV seriam o resultado e não a causa do processo de envenenamento, pois o veneno não seria capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Por outro lado, Ismail, Abd-Elsalam e Morad, (1990) acreditam na participação direta do sistema nervoso central no processo, principalmente em indivíduos muito jovens, onde a barreira hematoencefálica não estaria completamente formada.

Na Figura 9, ao comparar-se os resultados do peptídeo CETs1 com os obtidos pelo controle positivo, percebe-se que houve resultados significativos, isto porque este composto se apresenta muito mais próximo do controle negativo. Estes resultados sugerem que o CETs1 através desta análise, não apresentou caráter hemolítico, demonstrando que ele é hemocompatível. Essa capacidade de compatibilidade permite com que novas doses testadas possam ser avaliadas em modelos *in vivo*, avaliando a reprodutibilidade dos ensaios, bem como maiores contundências nos resultados e potencial de aplicação do peptídeo como imunizante.

Segundo Sæbø et al.(2023), alguns fatores podem influenciar diretamente o resultado dos ensaios de hemocompatibilidade, um deles é a fonte dos eritrócitos, ou seja, a avaliação da capacidade hemolítica de um composto possui relação direta com a escolha da espécie testada, sendo esta variável desde o humano ao cavalo. As grandes diferenças na atividade hemolítica de compostos dependendo da espécie utilizada, segundo os autores, está relacionada com a composição de proteínas e lipídios nas membranas dos eritrócitos. Outro fator que influencia o grau de hemólise é o conteúdo de hemoglobina nas células, no entanto, vale ressaltar que o conteúdo de hemoglobina é proporcional ao tamanho da célula e as diferenças parecem ser pequenas entre as espécies de mamíferos. Porém, de acordo com Lippi et al. (2008), ao utilizar os eritrócitos de murinos o grau de hemólise pode ser consideravelmente maior quando comparado aos eritrócitos derivados do sangue humano. Esse pressuposto é explicado devido a escolha de agulhas mais finas durante a flebotomia dos murinos, o que pode romper fisicamente os eritrócitos e com isso extravasar o conteúdo celular.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, nos quais os testes de hemólise e citotoxicidade indicaram que o peptídeo CTs1 se mostrou promissor

em termos de segurança, sugere-se que futuras investigações contemplem a avaliação *in vivo* deste peptídeo. A realização de estudos *in vivo* permitirá uma comparação direta com os dados obtidos nos testes *in vitro*, fornecendo uma visão mais aprofundada sobre a eficácia e segurança do peptídeo em um organismo vivo. Esses estudos poderão verificar a resposta imunológica, possíveis efeitos adversos e a dinâmica do peptídeo no contexto biológico real, algo que os testes *in vitro* não conseguem reproduzir totalmente. Assim, a continuidade dessa pesquisa pode consolidar o potencial terapêutico do CTs1, contribuindo significativamente para o avanço no desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes no combate ao envenenamento por escorpiões.

6. CONCLUSÃO

Através do exposto no presente trabalho, o CETs1 se mostrou um promissor peptídeo para a produção de soros antiescorpiônicos. Por ser um peptídeo derivado da neurotoxina Ts1, sendo uma das maiores constituintes e responsável por diversos efeitos colaterais do TsV, ele é capaz de estimular a produção de anticorpos anti-TsV e neutralizar a ação do mesmo. Além disso, como é um epítopo conformacional, apresenta maior especificidade e com isso pode reduzir os efeitos colaterais nos animais quando comparado ao veneno bruto. A verificação *in vitro* aqui avaliada, demonstrou que o CETs1 não apresenta efeito hemolítico e citotóxico dentro das linhagens de células utilizadas, podendo evoluir para mais testes *in vivo* com concentrações maiores do que as testadas no ensaio piloto, e o que podemos atribuir como uma ótima vantagem pensando em sua possível aplicação industrial.

Como perspectivas futuras, deverá ser realizada a investigação da viabilidade do CETs1 como antígeno a fim de testar o potencial do peptídeo derivado, como componente seguro e eficaz para estimular a produção de anticorpos neutralizantes, fato este fundamental no desenvolvimento do soro antiescorpiônico. Como citado no presente estudo, a produção de novos imunógenos se dá através da técnica de purificação de anticorpos do tipo IgG, como o CETs1 é um peptídeo derivado de um epítopo conformacional, acredita-se que ele é obterá maior especificidade com os anticorpos e com isso aumentar a capacidade de produção de imunoglobulinas mais específicas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Antibodies and antigens. Cellular and molecular immunology, v. 2, p. 33-64, 1994.
- ALVARENGA, L. M. et al. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against Tityus serrulatus scorpion venom. Toxicon, v. 46, n. 6, p. 664-671, 2005.
- AMARAL, Carlos Faria Santos et al. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after Tityus serrulatus scorpion poisoning. The American journal of cardiology, v. 67, n. 7, p. 655-657, 1991.
- ANDRADE, Marcus V. et al. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid–base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 138, n. 1, p. 97-104, 2004.
- APOSTOLOPOULOS Vasso, et al. A global review on short peptides: frontiers and perspectives. Molecules, v. 26, n. 2, p. 430, 2021.
- BAHLOUL, Mabrouk et al. Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. International journal of cardiology, v. 162, n. 2, p. 86-91, 2013.
- BARHANIN, Jacques et al. Tityus γ toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. Pflügers Archiv, v. 400, p. 22-27, 1984.
- BENAZZOZ, S. M. et al. Evaluation of the immunoprotective power of a multiple antigenic peptide against Aah II toxin of Androctonus australis hector scorpion. Vaccine: X, v. 19, p. 100503, ago. 2024.
- BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E. et al. Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. Toxins, v. 10, n. 11, p. 452, 2 nov. 2018.
- BOYER, Leslie et al. Safety of intravenous equine F (ab')₂: insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. Toxicon, v. 76, p. 386-393, 2013.
- BURLEY Stephen K, et al. Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. Methods Mol Biol. 2017;1607:627-641.
- CAMPERI, S. A. et al. Synthetic peptides to produce antivenoms against the Cys-rich toxins of arachnids. Toxicon: X, v. 6, p. 100038, jun. 2020.

- CARMO, A. O. et al. Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. *Toxicon*, v. 97, p. 64–74, abr. 2015.
- CAJADO-CARVALHO, Daniela et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom: In vitro tests and their correlation with in vivo lethal dose assay. *Toxins*, v. 9, n. 12, p. 380, 2017.
- CERNI, Felipe et al. The nociceptive response induced by different classes of *Tityus serrulatus* neurotoxins: The important role of Ts5 in venom-induced nociception. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 1, p. e0011057, 2023.
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with α - and β -toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Molecular Immunology*, v. 38, n. 11, p. 867–876, mar. 2002.
- CHEN, Chen; ZHOU, Yiwu; WANG, Dao Wen. SARS-CoV-2: a potential novel etiology of fulminant myocarditis. *Herz*, v. 45, p. 230-232, 2020.
- CUSINATO, D. A. C. et al. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v. 56, n. 8, p. 1477-1486, 2010.
- DEHGHANI, Rouhollah; KAMIABI, Fatemeh; MOHAMMADI, Malihe. Scorpionism by *Hemiscorpius* spp. in Iran: a review. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 24, p. 8, 2018.
- DEVAUX, Christiane et al. Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin Aahl from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *European journal of biochemistry*, v. 268, n. 3, p. 694-702, 2001.
- DUARTE, Clara Guerra. Imunoquímica de toxinas escorpiônicas que afetam canais para sódio: mapeamento de epitopos descontínuos. 2011.
- DUZZI, Bruno et al. New insights into the Hypotensins from *Tityus serrulatus* venom: pro-inflammatory and vasopeptidases modulation activities. *Toxins*, v. 13, n. 12, p. 846, 2021.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: *Natural Toxins*. Pergamon, 1989. p. 139-159.
- FERREIRA, M. G. et al. Toxicity of crude and detoxified *Tityus serrulatus* venom in anti-venom-producing sheep. *Journal of Veterinary Science*, v. 17, n. 4, p. 467, 2016.

GUERRA-DUARTE, Clara et al. Scorpion envenomation in Brazil: Current scenario and perspectives for containing an increasing health problem. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 17, n. 2, p. e0011069, 2023.

GUEx N, MC PEITSCH. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18(15):2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M. A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration?. *Toxicon*, v. 26, n. 3, p. 233-256, 1988.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M. A.; MORAD, A. M. Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* influence the course of toxicity?. *Toxicon*, v. 28, n. 11, p. 1265-1284, 1990.

JHO, Yeon-Sook et al. Identification of bacteria from the oral cavity and cloaca of snakes imported from Vietnam. *Laboratory animal research*, v. 27, n. 3, p. 213-217, 2011.

KLEMENTIEV B, Li S, Korshunova I, Dmytriyeva O, Pankratova S, Walmod PS, Kjær LK, Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med*. 2001;40:346-358.

LIPPI, Giuseppe et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 46, n. 6, p. 764-772, 2008.

LENZ G. Métodos imunológicos. *Biofísica*, 2004. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/MIMUNO.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2024.

LORET, Erwann P. et al. Scorpion toxins affecting insects. In: *Methods in Neurosciences*. Academic Press, 1992. p. 381-395.

LOURENÇO, Wilson R.; YTHIER, Eric; CLOUDSLEY-THOMPSON, John L. Observations on the life history of *Chaerilus philippinus* Lourenço & Ythier, 2008 (Scorpiones, Chaerilidae) from the Philippines. *Comptes Rendus. Biologies*, v. 331, n. 11, p. 896-900, 2008.

MACHADO-DE-ÁVILA RA, M Velloso, D de Oliveira, S Stransky, A Flor-Sá, FS Schneider, G Neshich, C Chávez-Olórtegui. Prediction of the epitopes by selecting amino acid residues with specific physical-chemical and structural attributes available in Blue Star Sting database. *Immunome Res*. 2014; 10(1):1–6.

- MACHADO-DE-ÁVILA, R. A. Predição de epítomos descontínuos ou conformacionais em proteínas através da bioinformática estrutural. 2011. 151 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Bioinformática). Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- MACIEL, Márcia Cristina Gonçalves et al. VENENO DE *Tityus Serrulatus*: uma ferramenta biotecnológica na modulação do sistema imunológico. 2014.
- MARCUSSI, S. et al. Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas (FUNPEC), 2011.
- MALATHI K, Ramaiah S. Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 34, n. 2, p. 243-260, 2018.
- MEDEIROS, Arthur Sérgio Avelino de et al. Self-assembled cationic-covered nanoemulsion as a novel biocompatible immunoadjuvant for antiserum production against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 10, p. 927, 2020.
- MELO L. et al. Imunohematologia Eritrocitária. *Rev.Bras. Hematol. Hemoter. São Paulo*, v. 34, v. 3, 2012.
- MONTEIRO, W. M. et al. Perspectives and recommendations towards evidence-based health care for scorpion sting envenoming in the Brazilian Amazon: A comprehensive review. *Toxicon*, v. 169, p. 68–80, nov. 2019.
- MURO, L. F. F. et al. Relação antígeno-anticorpo. *Rev. Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 7, n. 12, 2009.
- OLIVEIRA, Isadora Sousa de et al. Understanding the complexity of *Tityus serrulatus* venom: A focus on high molecular weight components. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 30, p. e20230046, 2024.
- PENG J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 2001;36:1083-1091.
- PIMENTA, Ricardo José Gonzaga et al. Selected to survive and kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian yellow scorpion. *PloS one*, v. 14, n. 4, p. e0214075, 2019.
- PESSINI, Andréa C. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, v. 39, n. 10, p. 1495-1504, 2001.
- PIMENTA, Adriano MC et al. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones,

Buthidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 15, n. 17, p. 1562-1572, 2001.

PINHEIRO, Carlos Basílio et al. Structural analysis of Tityus serrulatus Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 59, n. 3, p. 405-415, 2003.

POLIKARPOV, Igor; DE OLIVEIRA, R. T.; ABRAHÃO-NETO, José. Preparation and preliminary X-ray diffraction studies of a new crystal form of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 55, n. 9, p. 1616-1617, 1999.

PUCCA, Manuela Berto et al. Tityus serrulatus venom—a lethal cocktail. *Toxicon*, v. 108, p. 272-284, 2015.

QUEIROZ, Wladimir Jácome de et al. O processo produtivo do soro antiofídico: da crise à superação?. 2005.

QUERIDO, S.M.R. Antígenos. Disponível em: <http://fapi.br/conteudo/conteudo_programatico/farmacia/cpsp-antigenos_guilhermesilvia.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2024.

RAMOS, Henrique Roman et al. A heterologous multiepitope DNA prime/recombinant protein boost immunisation strategy for the development of an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 3, p. e0004484, 2016.

REVELO, Mónica Patricia et al. Body distribution of Tityus serrulatus scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1119-1125, 1996.

RECKZIEGEL, Guilherme Carneiro; PINTO, Vitor Laerte. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 20, p. 02-08, 2014.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Editora ULBRA, 2003.

RUPPENTHAL, J. E. *Toxicologia*. 2013.

SCUSSEL R, Feuser PE, Luiz GP, Galvani NC, Fagundes MÍ, Gonçalves Dal-Bó A, et al. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. *ACS Appl Nano Mater*. 2022;5(1):642–53.

SEITER, Michael; STOCKMANN, Mark. The life history of the parthenogenetic scorpion *Lychas tricarinatus* (Simon, 1884) from Odisha province, India and

supplementary notes on *Tityus trivittatus Kraepelin*, 1898 (Scorpiones, Buthidae). Zoologischer Anzeiger, v. 270, p. 155-165, 2017.

SEEMANN, Taciana Mara da Silva et al. Evolution of the occurrence of *Tityus serrulatus* (LUTZ & MELLO, 1992) in the state of Santa Catarina. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 56, p. e0434-2022, 2023.

SHAMOON, Zafar et al. Scorpion toxicity. 2017.

SILVA, LFJ. Produção de soro hiperimune no Instituto Vital Brazil: Estudo de caso orientado à sustentabilidade através da avaliação do ciclo de vida. 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia do Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca. Rio de Janeiro: Centro Federal de Educação Tecnológica. 2012.

SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Genética toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SUN P, Ju H, Liu Z, Ning Q, Zhang J, Zhao X, Huang Y, Ma Z, Li Y. Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. Comput Math Methods Med. 2013;2013:1-11.

SÆBØ, Ingvill Pedersen et al. Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. International journal of molecular sciences, v. 24, n. 3, p. 2914, 2023.

TRICHES, Celiana Maria Ferrarini. Predição e caracterização de um epítipo conformacional da beta-neurotoxina Ts1 do escorpião *Tityus serrulatus*. 2017. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. 2017.

TODD, Charles. An anti-serum for scorpion venom. Epidemiology & Infection, v. 9, n. 1, p. 69-85, 1909.

VASCONCELOS, Flávio et al. Insulin-like effects of Bauhinia forficata aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. Journal of ethnopharmacology, v. 95, n. 2-3, p. 385-392, 2004.

VAN REGENMORTEL, Marc HV. Mapping epitope structure and activity: from one-dimensional prediction to four-dimensional description of antigenic specificity. Methods, v. 9, n. 3, p. 465-472, 1996.

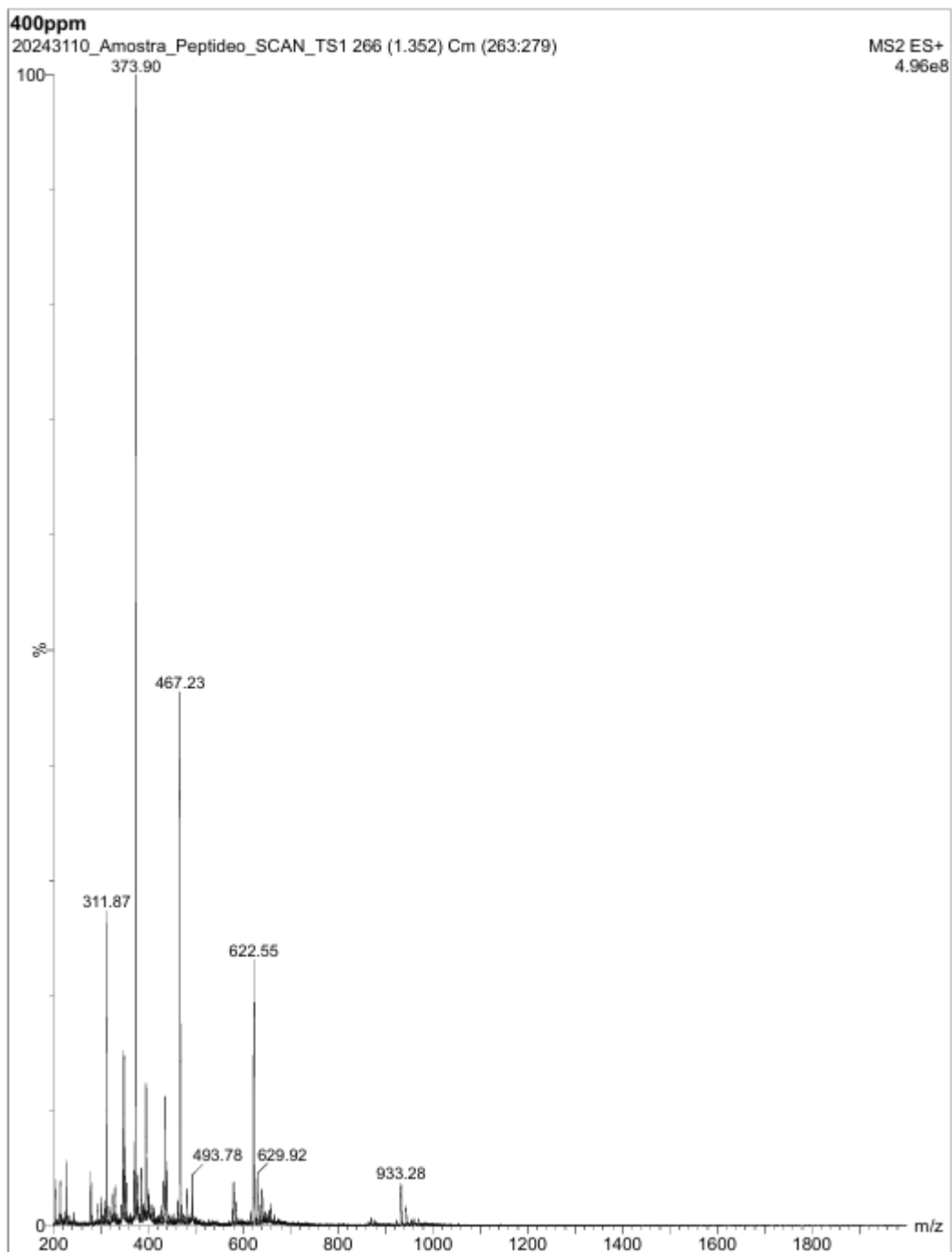
VASCONCELOS, Flávio et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 141, n. 1, p. 85-92, 2005.

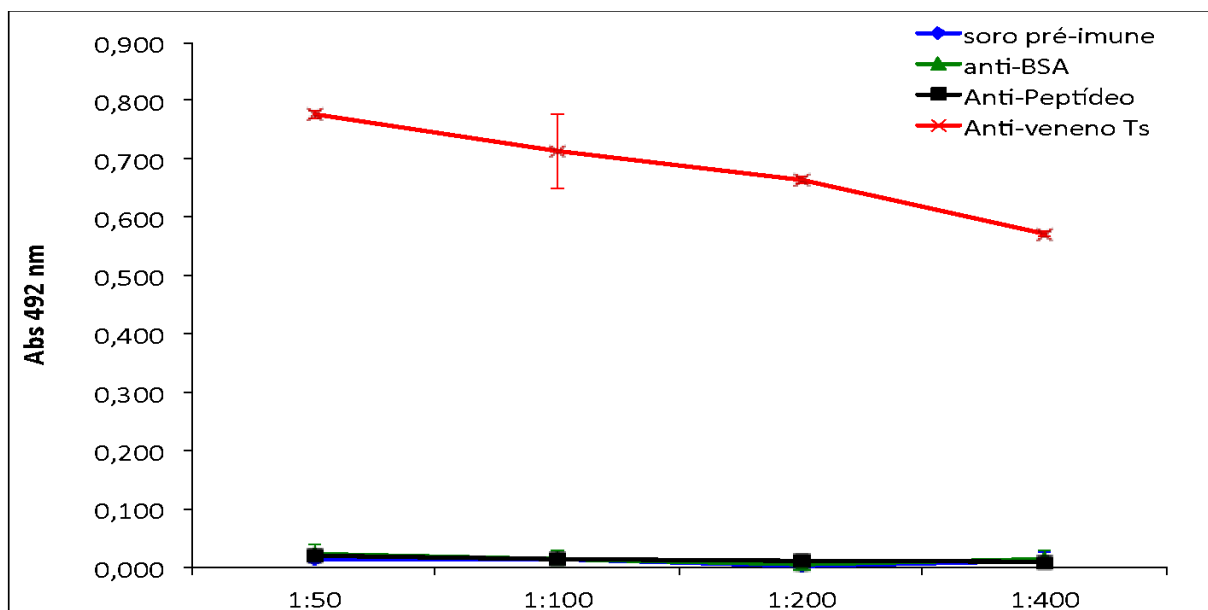
VERANO-BRAGA, Thiago et al. Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. Biochemical and biophysical research communications, v. 371, n. 3, p. 515-520, 2008.

WEBB B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinf. 2016;54:561-567.

APÊNDICE 1



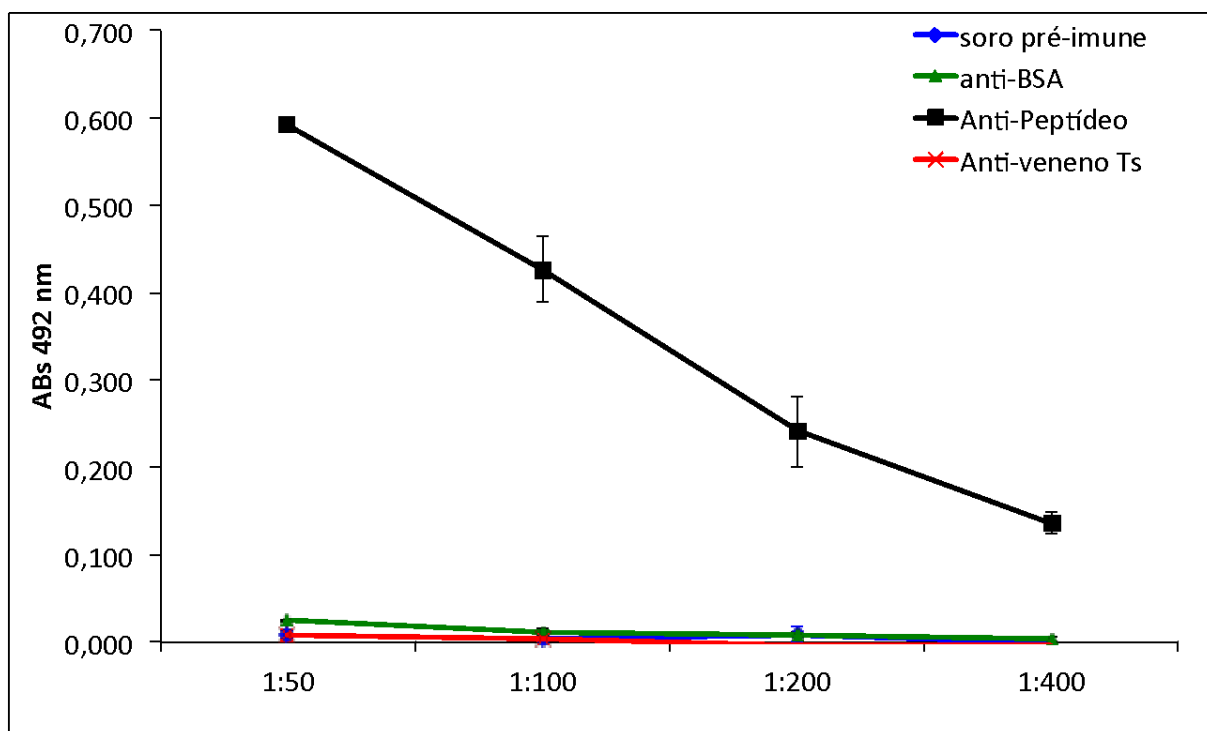
ANEXO 1



Anexo 1 - ELISA Indireto da reatividade do veneno de *Tityus serrulatus* contra os soros antiveneno (controle positivo), anti-BSA (controle negativo), pré-imune (controle negativo) e antipeptídeo.

Fonte: TRICHES, 2017.

ANEXO 2



Anexo 2 - ELISA Indireta da reatividade do peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH contra os soros antiveneno (controle positivo), anti-BSA (controle negativo), pré-imune (controle negativo) e antipeptídeo.

Fonte: TRICHES, 2017.

ANEXO 3

Anexo 3 – Resultados da Neutralização *in vivo*. Animais imunizados com BSA (grupo controle negativo), veneno de *Tityus serrulatus* (controle positivo) e peptídeo, foram desafiados com a injeção subcutânea no valor correspondente a duas DL-50 (3,6mg/kg) e foi contabilizado o número de sobrevivente após 48 horas.

Grupos imunizados	Número sobreviventes	% de animais que tiveram o veneno neutralizado
Grupo PBS (controle negativo)	0/4	0 %
Grupo Veneno <i>Tityus serrulatus</i> (controle positivo)	4/4	100 %
Grupo peptídeo	3/4	75%

Fonte: TRICHES, 2017.