



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS
MORFOFUNCIONAIS**

ERLY YICELA MERA ORTIZ

**ESTUDO DOS EFEITOS VASCULARES DA PEÇONHA DE *Tityus pachyurus* EM
RATOS WISTAR**

FORTALEZA

2025

ERLY YICELA MERA ORTIZ

**ESTUDO DOS EFEITOS VASCULARES DA PEÇONHA DE *Tityus pachyurus* EM
RATOS WISTAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em ciências morfofuncionais. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual: Morfofisiologia Cardiovascular, Renal e Metabólico.

Orientador: Prof. Dr. Richard Boarato David

Co-orientador: Prof. Dr. Jimmy Alexander Guerrero Vargas

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

089e Mera-Ortiz, Erly Yicela.

Estudo dos efeitos vasculares da peçonha de *Tityus pachyurus* em ratos wistar /Erly Yicela Mera Ortiz. – 2025.

95 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Richard Boarato David

Coorientação: Prof. Dr. Jimmy Alexander Guerrero Vargas

1. *Tityus pachyurus*. 2. Vasodilatação. 3. Veneno de escorpião. 4. Músculo Liso

ESTUDO DOS EFEITOS VASCULARES DA PEÇONHA DE *Tityus pachyurus* EM RATOS WISTAR

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Aprovada em: 29/05/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Richard Boarato David-(Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Jimmy Alexander Guerrero Vargas (Coorientador)
Universidad del Cauca-Unicauca

Prof. Dr. Rodrigo Jose Bezerra de Siqueira
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Ana Celeste Ximenes Oliveira
Universidade Federal do Ceará-UFC

Aos meus queridos, Mãe Luz Mary Ortiz Bolaños
Pai, Ruben Dario Mera Pacheco
Irmão, Marlon Alexis Mera Ortiz

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio, incentivo e colaboração de muitas pessoas e instituições, às quais expresso minha mais sincera gratidão.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante o período do mestrado (Código de Financiamento 001).

A meus pais, Luz Mary Ortiz Bolaños e Rubén Darío Mera, por seu amor incondicional, apoio constante mesmo à distância e por sempre acreditarem em mim. Suas palavras de carinho foram o combustível que me motivou a seguir em frente.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, na pessoa da professora Dra. Roberta Jeane Bezerra, agradeço pelo compromisso com a qualidade e pelo suporte essencial ao longo de todo o processo formativo. Ao professor Dr. Richard Boarato, sou grata pela orientação dedicada, e ao Dr. Ricardo de Lima, pelo aconselhamento valioso e pelas contribuições técnicas e científicas que enriqueceram este estudo.

Ao meu coorientador, Dr. Jimmy Alexander Guerrero, agradeço pelo profissionalismo acadêmico e apoio pessoal, fundamentais para a concretização deste trabalho. À minha asesora, Msc. Karen Ángel Camilo, manifesto profundo reconhecimento pelo acompanhamento contínuo, suporte emocional e troca generosa de conhecimentos, que foram pilares nesta jornada.

Agradeço sinceramente aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Jose Bezerra de Siqueira; profa Dr. Ana Celeste Ximenes de Oliveira e o prof, Dr. Jose Toribio Beltran vidal, pelas leituras atentas, sugestões pertinentes e críticas construtivas que enriqueceram significativamente esta pesquisa. Sua generosidade intelectual foi indispensável para o aprimoramento do trabalho.

Agradeço também à Universidade Federal do Ceará e ao NPDM (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos), pela infraestrutura acadêmica e científica disponibilizada, imprescindível para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidad del Cauca, minha alma mater, sou imensamente grata pelos conhecimentos adquiridos que me prepararam para esta etapa. Ao Centro de Investigación Biomédica – CIBUC, e seu diretor, agradeço pela disponibilidade das instalações e suporte técnico para o processamento do veneno utilizado neste estudo.

Ao Grupo de Investigación Herpetológica y Toxinológica – GIHT, da Universidad del Cauca, agradeço pelo respaldo, pela confiança e pela formação científica que me foi proporcionada.

Ao Laboratório de Neurociências e Comportamento Ingestivo, agradeço aos membros Maxwell, Beatriz, Ryan e demais, pela colaboração durante o período de pesquisa.

Ao Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas, deixo meus agradecimentos aos colegas Amanda, Natalia, Helyson, Simone, Patrícia, os ICs e a todos os membros do grupo, por seu apoio prático, acadêmico e humano.

A César, minha sincera admiração. Obrigada por me oferecer sua força mesmo nos momentos em que a minha faltava. Por sua voz serena nos momentos difíceis, por acreditar em mim quando eu mesma duvidava, e por me brindar confiança, carinho e motivação. Seu companheirismo fez toda a diferença nesta caminhada, tornando os dias mais leves e o percurso mais firme.

Por fim, encerro com imensa gratidão a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada gesto, palavra ou incentivo, por mais singelo que pareça, teve grande valor e significado nesta conquista.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais, para temer menos.”

Marie Curie (1867–1934)

RESUMO

Os acidentes com escorpiões afetam o mundo inteiro, com uma incidência de 1,2 milhões de picadas com mais de 3 mil casos fatais, sendo mais prevalentes em países com climas tropicais e subtropicais. Dada a importância clínica e a frequência de acidentes causados pelo *Tityus pachyurus*, uma espécie de escorpião distribuída principalmente no Vale do Magdalena Médio, na Colômbia, determinou-se estudar a ação do veneno de *Tityus pachyurus*, inicialmente avaliando qualitativamente a porcentagem de irritação (irritation score, IS) no HET-CAM, baseado em três efeitos observáveis na membrana: hemorragia, lise de vasos e coagulação do veneno sobre os vasos sanguíneos de ovos de galinha, onde foi determinado que o veneno é fortemente irritante e tem capacidade vasodilatadora sobre o tônus vascular, identificou-se mudanças na porcentagem da área vascular dos ovos em presença do VTp, indicando o efeito vasodilatador do mesmo (média de 10,43%). Para quantificar os efeitos vasculares da peçonha de *T. pachyurus* (VTp) em anéis aórticos de ratos, foi avaliado num sistema *In vitro*, utilizando a técnica de banho de órgão isolado. Foram realizadas curvas de concentração cumulativa vs. resposta do VTp (0,05 µg/ml a 60 µg/ml) com diferentes bloqueadores agrupados de acordo com sua via de ação: endotelial, ação em canais de K⁺ (TEA, 4AP, Glibenclamida), ação na via do NO (L-NAME, ODQ), e ação sobre receptores muscarínicos (ATR). VTp mostrou uma resposta vasodilatadora dependente tanto nos canais de potássio ativados por cálcio (BK) ($p=0,0261$) como nos canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) ($p=0,0014$) e também na via muscarínica dependente de receptores M₃ ($p=0,0264$). A resposta vasodilatadora do veneno foi reduzida principalmente pelos bloqueadores do NO: L-NAME ($p=0,0100$) e ODQ ($p=0,0037$). O efeito bloqueador da GLIB não foi significativo ($p=0,9907$), indicando que o veneno não tem como alvo os canais de K⁺ ATP-Dependentes. Finalmente, realizamos a construção da estrutura tridimensional proposta de três moléculas do VTp (TPA1, TPA2 e TPA3), a fim de prever quais as proteínas ou receptores podem ser afetados pelas toxinas do veneno. Este trabalho contribui para um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação do VTp e espera-se que possa contribuir para uma melhor compreensão para a administração de tratamentos médicos adequados.

Palavras-chave: *Tityus pachyurus*; Vasodilatação; Veneno de escorpião; Músculo Liso, reatividade vascular

ABSTRACT

Accidents with scorpions affect the entire world, with an incidence of 1.2 million bites with more than 3 thousand fatal cases, being more prevalent in countries with tropical and subtropical climates. Given the clinical importance and frequency of accidents caused by *Tityus pachyurus*, a species of scorpion distributed mainly in the Magdalena Médio Valley, in Colombia, the extent of the venom of *Tityus pachyurus* was determined, initially qualitatively evaluating the percentage of irritation (irritation score, IS). HET-CAM, based on three effects observed in the membrane: hemorrhage, lysis of vessels and coagulation of poison on the blood vessels of chicken eggs, where it was determined that the poison is strongly irritating and has vasodilatory capacity on the vascular tone, identified the changes in the percentage of the vascular area of the eggs in the presence VTp, indicating or vasodilator effect itself (average of 10.43%). To quantify the vascular effects of the nipple of *T. pachyurus* (VTp) in temporary aortic anesies, it was evaluated in an *In vitro* vivo system, using the isolated organ bath technique. Foram realized cumulative concentration curves vs. It responds to VTp (0.05 µg/ml to 60 µg/ml) with different blockers grouped according to its route of action: endothelial, ação in K⁺ channels (TEA, 4AP, Glibenclamida), ação in the NO via (L-NAME, ODQ), and ação on muscarinic receptors (ATR). VTp showed a vasodilatory response dependent on both calcium-activated potassium channels (BK) ($p = 0.0261$) and voltage-dependent potassium channels (Kv) ($p = 0.0014$) and also on the muscarinic pathway dependent on M₃ receptors ($p = 0.0264$). The vasodilatory response of venom was reduced mainly by NO blockers: L-NAME ($p=0.0100$) and ODQ ($p=0.0037$). The blocking effect of GLIB was not significant ($p=0.9907$), indicating that the poison is not similar to the ATP-Dependent K⁺ channels. Finally, we constructed the proposed three-dimensional structure of three VTp molecules (TPA1, TPA2 and TPA3), in order to predict which proteins or receptors could be affected by poison toxins. This work contributes to a better understanding of the mechanism of action of VTp and is expected to contribute to a better understanding of the administration of adequate medical treatments.

Keywords: *Tityus pachyurus*; Vasodilation; Scorpion Venom; Smooth Muscle; Vascular Reactivity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica e altitudinal de espécies do gênero <i>Tityus</i> . <i>T. asthenes</i> , <i>T. columbianus</i> , <i>T. forcipula</i> , <i>T. furhmanni</i> , <i>T. pachyurus</i> e <i>T. aff metuendus</i> na Colômbia. Extraído de Guerrero-Vargas et al. (2013).....	6
Figura 2. Riqueza de espécies por família da ordem Scorpiones com ocorrência no Brasil (Brazil & Porto, 2010).	7
Figura 3. Estrutura geral de um vaso sanguíneo. Retirado de: https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/sistema-circulatorio/	11
Figura 4. Regulação da contração do músculo liso vascular. DAG, diacilglicerol; IP3, inositol 1,4,5-trifosfato; PKC; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLC, cadeia leve de miosina; MP, miosina fosfatase, RS, retículo sarcoplasmático; P, fosfato (Webb, 2003)	13
Figura 5. Representação gráfica do relaxamento da musculatura lisa	15
Figura 6. 1A) Extração de VTp, método Guerrero (2002). A) Eletrodos (+ e -) B: gota de veneno coletado. Fotografia tirada no (Centro de Investigações Biológicas da Universidade do Cauca-Colômbia, 2018). 1B) Pool de Fotografia tirada no NPDM-Br	18
Figura 7. Razão de VTp em mg	20
Figura 8. Imagem do HET-CAM obtida após o pré-processamento.	23
Figura 9. Esquema do sistema de banho e montagem dos anéis aórticos na câmara de órgãos retirado de (Romero-Imbachi et al., 2021)	26
Figura 10. Representa as curvas de veneno de VTp em anéis aórticos pré-contraídos com PHE ou KCL	27
Figura 11. Resultados da ação de VTp e seus controles no HET-CAM.....	30
Figura 12. Resultados da análise da variação percentual da área vascular com VTp e seus controles no HET-CAM.	31
Figura 13. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas acumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente e sem endotélio, pré-contraídos com PHE.	33
Figura 14. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas acumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente e sem endotélio, pré-contraídos com KCl.	34
Figura 15. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas cumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente incubados com Bloqueadores de canais de K ⁺	36
Figura 16. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas cumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente incubados com Bloqueadores de NO.	37
Figura 17. Efeito do VTp em curvas acumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente incubados com Bloqueadores de MUS.	38
Figura 18. Gráfico de afinidade de ligação (kJ/mol) de três peptídeos (TPA1, TPA2 e TPA3) com as proteínas KIR e KCA	40
Figura 19. Representação das interações moleculares entre o peptídeo TPA2 e a proteína KIR	40
Figura 20. Interações moleculares entre o peptídeo TPA2 e a proteína KCA.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação clínica de acidentes por picada de escorpião na Colômbia.....	10
Tabela 2. Classificação do irritation score do Het Cam.	22
Tabela 3. Relação doses- concentracao de VTp usadas nos experimentos. Baseadas de acordo com o protocolo de (Romero-Imbachi et al., 2021)	25
Tabela 4. Classificação do índice de irritação obtido do veneno de <i>Tityus pachyurus</i> e seus respectivos controles.....	30
Tabela 5. Variação percentual da área vascular para cada substância utilizada no HET-CAM.....	31
Tabela 6. Resumo de valores de Vasodilatação Média, Erro Padrão da Média e EC50 dos experimentos de anéis aórticos realizados.	38
Tabela 7. Resumo do P-valor e IC 95% dos experimentos de anéis aórticos realizados...	39

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. ABORDAGEM DO PROBLEMA	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. OBJETIVOS	3
OBJETIVO GERAL:	3
OBJETIVO ESPECÍFICO:	3
4. REFERENCIAL TEÓRICO	4
4.1 A Toxinologia	4
4.2 . Epidemiologia e distribuição das espécies de escorpiões	5
4.3. Composição das peçonhas de escorpiões	7
4.4. Toxinas de escorpiões	8
4.5. Características clínicas e sintomatologia do escorpionismo	9
4.6. Sistema Cardiovascular	10
4.7. O mecanismo contrátil	12
4.8 Contração do músculo liso dependente de Ca^{2+}	12
4.9. Relaxamento do músculo liso	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1 Aspectos éticos	17
5.2 Veneno de escorpião	17
5.2.1 Local de coleta dos indivíduos e manutenção em cativeiro	17
5.2.2 Obtenção de veneno	17
5.2.3 Veneno total de <i>Tityus pachyurus</i>	18
5.3 AVALIAÇÃO <i>In vivo</i> DO VENENO DE <i>Tityus pachyurus</i>	20
5.3.1 Incubação de ovos e acesso à membrana corioalantóide (CAM)	20
5.3.2 Grupos experimentais	21
5.3.3 Toxicidade aguda	21
5.3.4 Comportamento vasomotor inicial mediante análise de imagens pelo GIMP	22
5.4 Avaliação <i>In vitro</i> do veneno do <i>Tityus pachyurus</i>	24
5.4.1 Obtenção de anéis aórticos	25
5.4.2 Protocolo de estabilização e teste de viabilidade	26
5.4.3 Grupos experimentais anéis de aorta	27

5.4.4 Efeito do VTp sobre o tono vascular: curvas de concentração-resposta de VTp em: contração.....	27
5.4.5 Efeito do VTp sobre o tono vascular dependente do endotélio	27
5.5 Avaliação <i>In silico</i> de toxinas do veneno <i>Tityus pachyurus</i>	28
5.5.1 Docking Molecular de duas possíveis toxinas de <i>Tityus pachyurus</i>	28
5.6 Análise estatística	29
6. RESULTADOS	30
6.1.1. Toxicidade Aguda	30
6.2.1. Potencial vasorelaxante do VTp em anéis de aorta isolado pre- contraídas com PHE	33
6.2.2. Potencial vasorelaxante do VTp em anéis de aorta isolado pre- contraídas com KCl	34
6.3 Avaliação <i>In silico</i> de toxinas do veneno <i>Tityus pachyurus</i>	39
7. DISCUSSÃO	41
8. CONCLUSÕES.....	48
9. BIBLIOGRAFIA.....	48

GLOSSÁRIO

VTp: Veneno completo de *Tityus pachyurus*

T.p: *Tityus pachyurus*

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

ANOVA: Análise de variância

EPM: Erro Padrão da Média

DC: Débito cardíaco

DL50: Dose Letal para 50% dos animais

FC: Frequência cardíaca

FE: Fração de ejeção

I.p. Intraperitoneal

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado de endotélio

γ -KTx: Gamma potasio toxina

KH: Solução de Krebs Henseleit

NO: Óxido Nítrico

α -KTx: Alfa potasio Toxina

KCl: Cloreto de potássio

PHE: Fenilefrina

TEA: Tetraetilamonio

L-NAME: (L-NG-nitro-arginina metil éster)

ODQ: (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)

GLIB: Glibenclamida

4AP: 4-Aminopiridina

ATR: Atropina

INTRODUÇÃO

1. ABORDAGEM DO PROBLEMA

Os envenenamentos causados por picadas de escorpião podem levar à morte ou causar sérios problemas de saúde, como disfunção cardíaca e insuficiência respiratória (Santos et al., 2016). Elas são consideradas problema de saúde pública em todo o mundo. Embora o número exato seja desconhecido, aproximadamente 1,2 milhão picadas ocorrem, destas picadas mais de 3 mil casos fatais (Chippaux & Goyffon, 2008). Os números são maiores em países tropicais e subtropicais (Lourenço & Ythier, 2013), razão pela qual países como a Colômbia apresentam abundância de espécies altamente venenosas ou peçonhentas (Lourenço & Ythier, 2013) e são a segunda causa de intoxicação humana no Brasil provocada por animais venenosos ou peçonhentos (De Sousa et al., 2009). No entanto, os acidentes por escorpionismo têm sido subestimados e não há estatísticas de saúde (Ismail M., 1994).

Escorpiões de importância médica no mundo (aproximadamente 50 espécies) são perigosos para os humanos e a maioria pertence à família Buthidae (Chippaux & Goyffon, 2008; Santos et al., 2016) um de seus gêneros é *Tityus*, considerados perigosas (Chippaux & Goyffon, 2008; Gómez et al., 2010). *Tityus pachyurus* é distribuído na América Central e do Sul, especificamente no Panamá, Costa Rica e Colômbia. Na Colômbia, causa a maioria das intoxicações graves, sendo que seu veneno possui toxicidade cardiovascular (Isbister & Saluba, 2014), podendo causar insuficiência cardíaca e choque circulatório (Dehesa-Dávila & Possani, 1994) que ocorre entre 1 e 3% dos casos, sendo a principal causa de mortalidade no mundo (Chippaux & Goyffon, 2008), possivelmente devido à liberação maciça de catecolaminas, dano miocárdico induzido pelo o veneno ou isquemia miocárdica (Bouaziz et al., 2008). No Brasil outras espécies como *Tityus serrulatus*, uma espécie exótica e *Tityus stigmurus*, uma espécie endêmica, é a responsável pelos acidentes da região Nordeste (Brazil & Porto, 2010).

As alterações hemodinâmicas decorrentes do escorpionismo ocorrem em dois estágios: a fase hiperdinâmica, onde a pressão arterial (PA) se eleva e há aumento da contratilidade do ventrículo esquerdo (VE), e a fase hipocinética em que a PA diminui e a função sistólica do VE é prejudicada (Elatrous et al., 2015), consequência do aumento da descarga autonômica simpática, de fatores endoteliais e de outras substâncias vasoativas (Aristizabal Ocampo et al., 2021). Devido a essas altas taxas de escorpionismo, decidiu-se estudar os efeitos de *VTp* sobre o sistema vascular em ratos para entender seu mecanismo de ação; e por meio de docking molecular, propor a interação de toxinas com possíveis “alvos” como os canais de K^+ . O estudo contribuirá com conhecimentos para compreender seu mecanismo de ação, facilitando possivelmente a tomada de decisões no setor saúde, e possibilitando a adaptação futura das estratégias ao contexto brasileiro, dada a semelhança dos problemas de saúde pública entre ambos países.

2. JUSTIFICATIVA

O escorpionismo é um problema de saúde pública, em crescimento nos últimos anos (Chippaux & Goyffon, 2008). Os países tropicais e subtropicais tendem a ser mais afetados (Lourenço & Ythier, 2013), onde são reportados números que aumentam anualmente. O Brasil, por exemplo, notificou 124.077 casos em 2017, o que representa uma incidência de 59,7 casos/100.000 habitantes (Monteiro et al., 2019). Desde então, esse valor se manteve acima desse número, representando um aumento de mais de três vezes em 10 anos, superior ao número de casos da maioria das doenças tropicais negligenciadas no país (Guerra-Duarte et al., 2023). A taxa de letalidade na Amazônia brasileira aumentou para 0,21%, sendo a população infantil a mais afetada com uma taxa estimativa de 1,3%, quatro vezes superior à da população em geral (0,3%) (Monteiro et al., 2019). Para a bacia amazônica, como Colômbia, Guianas e Venezuela, as taxas de morbidade e mortalidade são as mais altas (Chippaux & Goyffon, 2008) e muitos países que no passado não apresentavam mortes por escorpionismo, como o Equador, enfrentam atualmente esse problema (Borges et al., 2015; Borges & Roman, 2023).

Na Colômbia, *T. pachyurus* é uma das espécies envolvidas em acidentes graves causando a maioria dos envenenamentos (Otero et al., 2004). Sua picada, é classificada mundialmente na classe III (Khattabi et al., 2011; Micaiah et al., 2018) e na classificação colombiana como “manifestações sistêmicas graves” (ver tabela 1.) que ameaçam a vida se não forem tratados, (Guerrero-Vargas et al., 2015). Os sintomas clínicos, precedidos de eventos cardiovasculares, e a letalidade são produzidos pela deterioração cardiovascular caracterizada por disfunção cardíaca secundária a choque cardiogênico e/ou edema pulmonar, que leva a formas graves de envenenamento (Abroug et al., 2015; Cesaretli & Ozkan, 2010; Elatrous et al., 2015). A letalidade do envenenamento varia de acordo com a espécie e se deve à alta especificidade das toxinas de escorpião (Argote-aramendiz et al., 2015). Atualmente, o tratamento específico para picadas de escorpião é a aplicação de antídoto a mais eficaz, assim como a imunoterapia (Utkin, 2015). No entanto, a baixa produção de antídoto e as reações adversas a ele dificultam o manejo dos acidentes (Gómez et al., 2017).

Os efeitos farmacológicos de todos os venenos sugerem atividades colinérgicas e adrenérgicas, assim como um efeito direto na membrana subsináptica (Sofer, 1995a). Eles podem modular a funcionalidade dos canais iônicos de células excitáveis e não excitáveis (Quintero-Hernández et al., 2013), afetar os mecanismos de ativação dos canais de sódio, produzir a abertura espontânea dos canais de sódio, afetar os canais de potássio, cloreto e cálcio tipo L (Garcia et al., 1998), desencadeando os eventos típicos de envenenamento devido a uma liberação maciça de neurotransmissores autonômicos (Cupo., et al 2015). Portanto, é essencial conhecer o mecanismo de ação do *Tp.* para oferecer evidência científica sólida para a elaboração de estratégias eficazes a casos de envenenamento.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Estudar os efeitos vasculares da peçonha de *Tityus pachyurus*.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Avaliar os efeitos do veneno de *T. pachyurus* através do ensaio HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane).
- Compreender os mecanismos de ação farmacobiológicos do veneno de *T. pachyurus* sobre o tono vascular em anéis de aorta isolados de ratos Wistar, pré-contraídos, com endotélio íntegro ou removido.
- Propor a modelagem molecular de componentes selecionados do veneno de *Tityus pachyurus* utilizando estudos de docking molecular como ferramenta de análise estrutural e predição de interações

4. REFERENCIAL TEÓRICO

A natureza tem sido uma fonte importante de produtos medicinais, tanto de origem vegetal quanto animal. Nesse contexto, os venenos de alguns animais se destacam como uma fonte promissora de agentes terapêuticos, capazes de ser aplicadas tanto na ciência básica quanto em aplicações clínicas (Utkin, 2015). Como exemplo temos: um peptídeo conhecido como Teprótide foi isolado do veneno da víbora *Bothrops jaracaca*, permitindo a síntese dos inibidores da ECA, captopril e enalapril, usados no tratamento de doenças cardiovasculares (Ferreira et al., 1970); A epibatidina, isolada da pele do sapo venenoso, *Epipedobates tricolor*, que permitiu o desenvolvimento de uma nova variedade de analgésicos potenciais (Cragg & Newman, 2013).

Os animais peçonhentos fazem parte de vários táxons do reino Animalia (Cnidária, Anfíbia, Insecta, Arthropoda etc.), que durante o processo evolutivo desenvolveram órgãos especiais para produção e injeção de veneno, mais de 220 mil espécies capazes de produzir venenos, que correspondem a um 15% da biodiversidade animal total do planeta. Os Artrópodes é o filo mais numeroso do reino animal, que em sua maioria podem produzir substâncias nocivas para os seres humanos, a classe Arachnidae, representada pelos escorpiões, é uma das mais importantes do ponto de vista toxinológico (Capó Martí et al., 2007), representando 25% da biodiversidade mundial, (possivelmente na ordem de 2000 espécies diferentes) (Quintero-Hernández et al., 2013).

O exposto acima aponta para o problema do manejo do tratamento de acidentes toxinológicos (toxinas de animais venenosos/peçonhentos), sendo, até o momento, a aplicação de antiveneno a mais eficaz. Portanto, o que garante a eficácia do tratamento, é conhecer primeiro a composição do veneno do agente causador, que por um lado, pode fornecer a chave para um melhor tratamento de mordidas e picadas e, por outro lado, pode levar à descoberta de novos medicamentos (Utkin, 2015).

4.1 A Toxinologia

Ao estudo do veneno ou peçonha é conhecido como toxinologia a "ciência que estuda as toxinas". Uma toxina é definida como "uma substância elaborada por um ser vivo que atua fora dele" (Capó Martí et al., 2007) e Redi foi considerado um dos fundadores dessa ciência (Utkin, 2015).

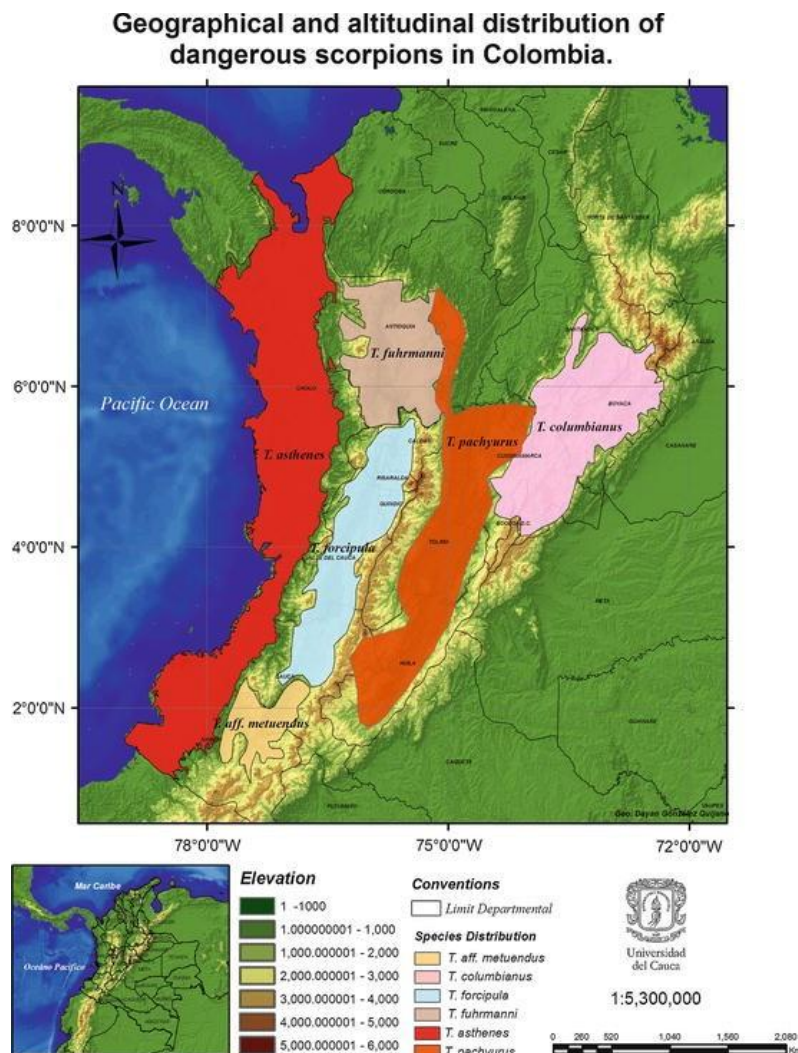
O estudo do veneno de animais remonta a mais de dois milênios, à época de Aristóteles (384-322 a.C.) mas as bases para a compreensão científica moderna surgiram a partir do estudo da peçonha de serpentes, nos séculos XVII e XVIII, pelos cientistas italianos Francesco Redi e Felice Fontana. Os estudos bioquímicos modernos sobre venenos começaram na metade do século passado, no entanto, foi apenas no final dos anos 1950 e início dos anos 1960 que os estudos se concentraram nas proteínas dos venenos (Utkin, 2015). E por volta de 1960, foram purificadas as primeiras neurotoxinas de escorpiões a partir de duas espécies:

Androctonus australis e *Buthus occitanus* (Miranda et al., 1964), o que juntamente com o progresso das ciências “ômicas” permitiu que para os anos 90 mais de 70 peptídeos, toxinas ou homólogos diferentes foram isolados do veneno de escorpião, e ainda assim, eles representam uma pequena proporção do arsenal conhecido contido nessas toxinas (Goudet et al., 2002). O anterior contribuiu significativamente para que compostos de origem natural (animal) ganhassem grande importância tanto no desenvolvimento de novos medicamentos quanto na identificação de novos alvos moleculares, que nos permitem compreender o efeito fisiológico do veneno no corpo humano.

4.2. Epidemiologia e distribuição das espécies de escorpiões

Os escorpiões habitam quase todos os continentes do planeta, porém está restrita às regiões tropicais e subtropicais (de Roodt, 2015). Das 1500 espécies de escorpiões no mundo inteiro, só trinta são potencialmente perigosas para os seres humanos. Entre os gêneros que podem causar envenenamento sistêmico, estão *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus* e *Parabuthus*, das regiões da África, Turquia, Sul e Oeste da Ásia. Para a América do Sul, *Tityus* e, no México, *Centruroides* (Chippaux & Goyffon, 2008; Sofer, 1995b). *Centruroides* na América do Norte e Central, e o gênero *Tityus* no Caribe, América Central e América do Sul (Borges & Rojas de Arias, 2019; De Roodt, 2015). Na Colômbia *T. Pachyurus* se distribuí nas florestas secas da região central do Vale do rio Magdalena (centro da Colômbia), abrangendo os departamentos de Tolima, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia e Huila (Figura 1). (Guerrero-Vargas et al., 2015).

Figura 1. Distribuição geográfica e altitudinal de espécies do gênero *Tityus*. *T. asthenes*, *T. columbianus*, *T. forcipula*, *T. fuhrmanni*, *T. pachyurus* e *T. aff metuendus* na Colômbia. Extraído de Guerrero-Vargas et al. (2013).



Fonte: elaborado pelo autor (Guerrero-Vargas et al., 2013).

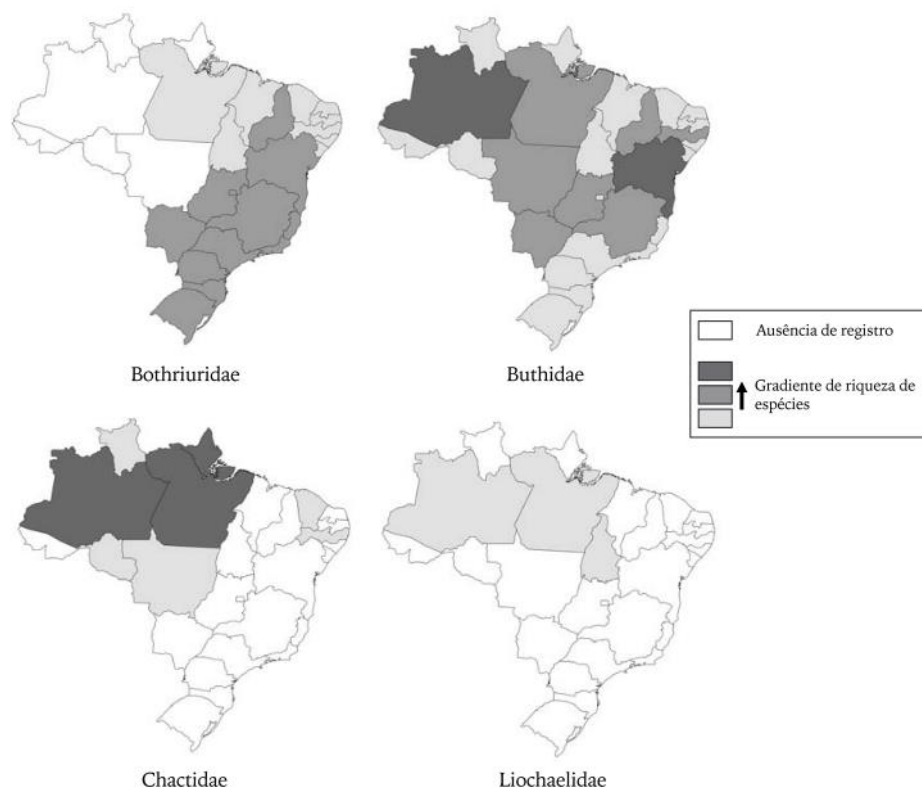
No Brasil, da família *Buthidae*, são conhecidos 10 gêneros e 106 espécies; quatro delas representam risco à saúde e podem causar acidentes graves, todas pertencentes ao gênero *Tityus*: *T. bahiensis* (escorpião marrom), *Tityus obscurus* (escorpião negro amazônico), *T. stigmurus* (escorpião amarelo do Nordeste) e *T. serrulatus* (escorpião amarelo) (Bertani et al., 2021). Este último é responsável por aproximadamente 150.000 casos de envenenamento por ano no Brasil, dos quais 10% requerem tratamento com soro antiveneno para reverter seus efeitos letais (Chiariello, 2023).

As regiões Norte e Nordeste do Brasil possuem uma elevada riqueza de espécies de escorpiões. São registradas 68 espécies para a região Norte,

representando 52% das espécies de escorpiões do país, e 34 espécies para a região Nordeste, o que representa 26% da escorpiofauna brasileira. Os estados do Amazonas e da Bahia são os que mais contribuem para essa diversidade, com 38 e 27 espécies, respectivamente (Figura 2). Apesar dos números reportados, acredita-se que a fauna de escorpiões do Brasil ainda seja subestimada, devido a carência de especialistas e incentivos para estudos na área.

Distribuição da escorpiofauna por família no Brasil

Figura 2. Riqueza de espécies por família da ordem Scorpiones com ocorrência no Brasil (Brazil & Porto, 2010).



Fonte: (Brazil & Porto, 2010).

4.3. Composição das peçonhas de escorpiões

Os venenos são misturas complexas de substâncias farmacologicamente muito ativas capazes de causar uma grande variedade de sinais e sintomas clínicos, que são específicos de cada espécie (Junghanss & Bodio, 2006). O veneno de escorpiões é uma mistura aquosa complexa que contém muco, composto por sais inorgânicos, aminoácidos livres, moléculas orgânicas de baixo peso molecular, como serotonina ou histamina, inibidores de protease, liberadores de histamina, componentes heterocíclicos, peptídeos e proteínas, principalmente enzimas (Müller, 1993; Quintero-hernández et al., 2013; Sofer, 1995b), muitas proteínas básicas

pequenas que são as neurotoxinas (massa molecular relativa < 8.000), que de fato são os componentes mais importantes do veneno (Müller, 1993). Essas neurotoxinas são formadas por polipeptídeos unidos por 4 pontes de dissulfeto (Sofer, 1995a), atuam sobre os canais iônicos das células excitáveis (músculos lisos e estriados), seja retardando a inativação de uma (toxina α) ou melhorando a ativação (toxina β) o que leva à despolarização espontânea das células excitáveis (Müller, 1993), levando em alguns casos a observar quadros semelhantes ao tétano, que embora sejam comuns de serem observados em envenenamentos experimentais com venenos de alguns *Tityus* são mais comuns em envenenamentos humanos (De Roodt, 2015). Ou podem agir como um efeito direto sobre a membrana pós-sináptica (Sofer, 1995a).

4.4. Toxinas de escorpiões

Quanto às toxinas do escorpião, a maioria são ligantes peptídicos que reconhecem e se ligam a proteínas integrais da membrana conhecidas como canais iônico (Argote-aramendiz et al., 2015), tais como canais de sódio, potássio, cloreto, além do canal de cálcio tipo L (Garcia et al., 1998). As toxinas geram a liberação massiva de neurotransmissores nas fendas sinápticas e na junção neuromuscular, desencadeando disfunção autonômica e atividade neuromuscular excessiva (Argote-aramendiz et al., 2015; Vatanpour et al., 1993).

Nas toxinas dos escorpiões específicas para os canais de potássio K^+ (KTx), os efeitos cardíacos são predominantes, seguidos de danos renais como efeito colateral da hipotensão induzida pelo veneno. Dos peptídeos que foram isolados, a maioria são peptídeos relativamente curtos que interferem na comunicação celular e prejudicam o funcionamento adequado (Hossam El-Din M.Omar, 2015).

Estes canais de potássio, com aproximadamente 70 subtipos são a maior e mais diversa família de canais iônicos (Gutman et al., 2005). Esses canais são ativados pela despolarização da membrana. (Hille, n.d.; Huang & Jan, 2014). A rigorosa seletividade desses canais se deve aos aminoácidos localizados na região dos poros, a sequência característica é T/SXGXGX (González et al., 2012). Eles estão compostos por três famílias diferentes de canais de K^+ : (a) retificadores internos, Kir; (b) a família de quatro segmentos TM de dois poros, K_{2P} ; (c) os seis canais K^+ dos segmentos TM (S1-S6) com domínio de poro (S5-P-S6) que incluem a subfamília de canais dependentes de voltagem, $K_v1.x$ a $K_v4.x$ e dentro desta família são adicionados o Slo subfamília; e a família SK ativada por Ca^{2+} (Goldstein et al., 2005; González et al., 2012; Gutman et al., 2005; Kubo et al., 2005; Moulton et al., 2016).

Foram classificados 8 tipos de toxinas que agem nos canais de íons de potássio, classificadas de acordo com o tipo de dobramento em α -hélices, com duas variantes do tipo $\alpha\alpha$, cadeias β do tipo $\beta\beta\beta$ ou uma mistura de ambos os tipos $\beta\beta$, $\alpha\beta\beta$, $\beta\alpha\beta\beta$ e $310\beta\beta\alpha$ (Mouhat et al., 2004). Das KTx foram classificados em sete subfamílias: α -KTx, β -KTx, γ -KTx, δ -KTx, ε -KTx, κ -KTx e λ -KTx (banco de dados de kalium). A família γ -KTx compreende toxinas que se ligam seletivamente aos canais de potássio ERG (Ether-à-go-go-RelatedGen), canais que são importantes para a repolarização do potencial de ação cardíaco. As alterações nesses canais são responsáveis pela síndrome congênita do QT longo, ondas T anormais e risco de morte cardíaca súbita devido a arritmias ventriculares.

O veneno de *T. pachyurus* é moderadamente tóxico LD₅₀ (4,8 mg/kg) em relação a venenos altamente tóxicos como *C. noxius* do México (0,26 mg/kg) e *Tityus serrulatus* do Brasil (1,2 mg/kg), bem como venenos de baixa toxicidade como *T. cambridgei* do Brasil (12 mg/kg). Os sintomas de envenenamento por *T. pachyurus* são semelhantes aos causados por outros escorpiões da família Buthidae que foram evidenciados em experimentos com animais, bem como em casos clínicos em humanos. Além disso o veneno é rapidamente absorvido, com os primeiros sintomas se tornando evidentes de 15 a 30 minutos após o envenenamento. Também é eliminado rapidamente, com os sintomas começando a desaparecer de 2 a 3 horas após a inoculação (Barona et al., 2004). O VTP contém proteínas menores que 14 kD até maiores que 97 kD, o que poderia corresponder a neurotoxinas encontradas em outros estudos, sendo as mais abundantes da ordem de 7 a 8 kDa, ressaltando que as toxinas da fração IV extraída por HPLC foram as mais potentes (com mais de 50 Ag por animal) (Barona e outros, 2004).

4.5. Características clínicas e sintomatologia do escorpionismo

Os envenenamentos por escorpião são geralmente classificados de acordo com a gravidade dos seus sintomas, como efeitos locais, caracterizados por dor e eritema, ou como graves, onde ocorrem eventos neurológicos, musculares, cardíacos e renais. Os sintomas de envenenamento apresentados pela picadura de *Tityus pachyurus* estão relacionados a eventos cardiovasculares (Mera-Ortiz; Guerrero-Vargas., 2022) e sua picada foi classificada mundialmente como classe III (Khattabi, Soulaymani, et al., 2011; Micaiah et al., 2018) onde tem sintomas como insuficiência cardíaca, hipotensão, arritmias e na classificação colombiana como “manifestações sistêmicas graves”; Tabela 1 (Guerrero-Vargas et al., 2015).

Geralmente o envenenamento sistêmico ocorre em 2 tempos: a fase hiperdinâmica, com aumento da pressão arterial e maior contratilidade do ventrículo esquerdo (VE), e fase hipocinética onde a pressão arterial diminui e ocorre o deterioro da função sistólica do VE (Elatrous et al., 2015). Outros sugerem que a fase inicial começa com a fase colinérgica, com sintomas como vômitos, sudorese, hipersalivação, priapismo, bradicardia e hipotensão arterial, seguida por uma fase adrenérgica, que

inclui hipertensão arterial, taquicardia e insuficiência cardíaca (Junghanss & Bodio, 2006). Alguns estudos mostraram que o edema pulmonar devido ao veneno de escorpião está associado à disfunção ventricular esquerda e dano miocárdico (Amaral et al., 1993; Junghanss & Bodio, 2006).

Guerrero-Vargas e colaboradores classificaram os sintomas para a região da Colômbia em:

Tabela 1. Classificação clínica de acidentes por picada de escorpião na Colômbia

Manifestações locais	Manifestações sistêmicas leves	Manifestações sistêmicas moderadas	Manifestações sistêmicas graves
Parestesia	Cefaleia	Confusão	Arritmias ventriculares
Dor localizada	Náuseas	Agitação	Hipotensão
Sudorese	Palidez	psicomotora	bradicardia
Equimoses	Sialorréia	Ataxia	Colapso Cardiovascular
locais (variável)	Vômitos	Diarreia	Dificuldade respiratória
Eritema	isolados	Distonia	Edema pulmonar
Hiperestesia	Rinorréia	Mioclonia	Comprometimento
Sensação de	Sudorese	Pancreatite por	Neurológico (coma)
queimação	Odinofagia	hemorragia	Estado convulsivo
Erupção	Contrações	Gastrointestinal	Comprometimento
cutânea com	locais	Broncoespasmo	neuromuscular
Bolhas		Priapismo	
(exquisito)		Vômitos	
		recorrentes	

Fonte: (Guerrero-vargas et al., 2015)

4.6. Sistema Cardiovascular

As paredes de vários órgãos e tubos do corpo são constituídas por camadas de células musculares lisas. Elas recebem inervação neural do sistema nervoso autônomo. O fenótipo contrátil do músculo liso é regulado por hormônios, capazes de atuar por meio de mecanismos autócrinos ou parácrinos, bem como por sinais físicos e químicos locais (Renna & Miatello, 2004).

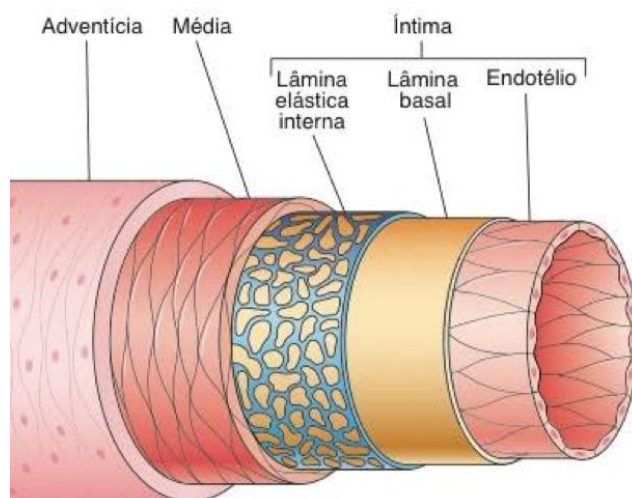
O sistema circulatório é composto por: 1. uma bomba ou motor circulatório (coração) que está ligado a outras estruturas torácicas através de grandes artérias, 2. tubos de transporte (vasos sanguíneos) que começam (artérias) e terminam (veias) no coração e 3. um fluido, sangue. Sua principal função é enviar sangue pouco oxigenado aos pulmões e sangue rico em O₂ e nutrientes aos diversos tecidos do corpo (Tresguerres et al., 2005).

Todos os vasos sanguíneos de determinado calibre são constituídos por três camadas concêntricas 1. **Túnica Interna ou Íntima:** Formada por sua vez por a) o endotélio, uma camada de células planas (células endoteliais), que recobrem o vaso internamente. b) Delicada camada subendotelial constituída por tecido conjuntivo frouxo c) A lâmina elástica interna, que é o componente mais interno da íntima, composta principalmente por elastina, que possui aberturas chamadas fenestras que permitem o transporte de substâncias para as células localizadas mais internas.

2. **Túnica média,** composta por camadas concêntricas de células musculares lisas com formato helicoidal. Quantidades variáveis de lâminas elásticas, fibras reticulares (colágeno tipo III), proteoglicanos e glicoproteínas são interpostas entre as células musculares lisas. Nas artérias, a túnica média possui uma camada elástica externa mais fina que a separa da túnica adventícia.

3. **Túnica externa ou adventícia,** formada por tecido conjuntivo frouxo, composto principalmente por fibroblastos e colágeno.

Figura 3. Estrutura geral de um vaso sanguíneo. Retirado de: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/sistema-circulatorio/>



Fonte: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/sistema-circulatorio/>

O sistema nervoso controla a circulação maioritariamente através do sistema nervoso autônomo, sendo o sistema nervoso simpático o principal regulador, embora o sistema nervoso parassimpático tenha um importante contributo na regulação da função cardíaca (Guyton & Hall, 1994). O sistema nervoso autônomo está envolvido na regulação em segundos da pressão arterial, da motilidade digestiva, das secreções gastrointestinais, do esvaziamento da bexiga urinária, da sudorese, da temperatura corporal e de outras funções (Guyton & Hall, 1994), em

quanto que a circulação periférica é regulada por mecanismos nervosos e outra parte é regulada por mecanismos específicos do sistema circulatório (Estañol et al., 2009).

4.7. O mecanismo contrátil

A contração do músculo liso começa com um processo de despolarização, seja por estímulo químico (neurotransmissores), elétrico ou mecânico. O íon cálcio (Ca^{2+}) se liga à calmodulina, ativando a fosforilação da cadeia leve da miosina. A via RhoA/Rho quinase regula a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} , bloqueando a ação da miosina fosfatase e impedindo-a de desfosforilar a cadeia leve, permitindo assim a manutenção da força de contração. Por outro lado, o relaxamento do músculo liso começa quando o Ca^{2+} é removido do citosol e a miosina fosfatase é ativada, revertendo a fosforilação (Webb, 2003).

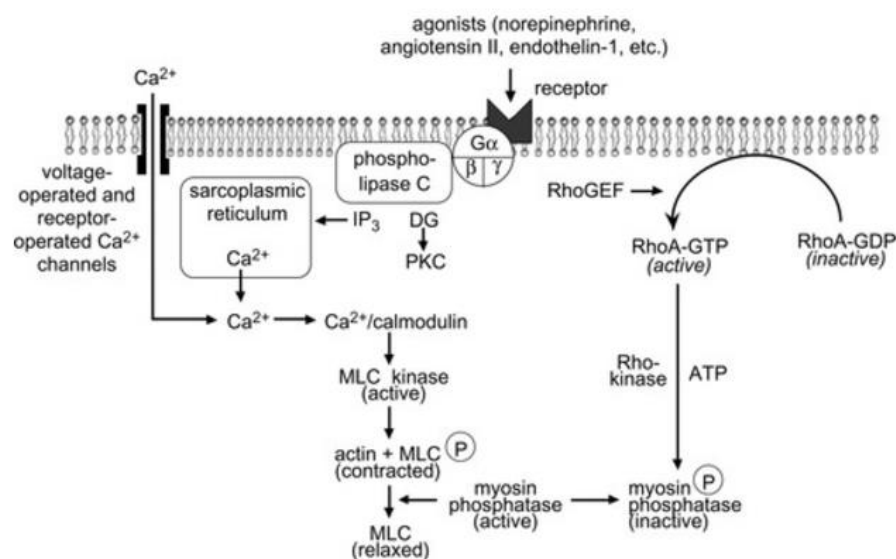
Num organismo saudável, o mecanismo de contração das células musculares lisas é controlado principalmente por estímulos mecânicos, como o estiramento, e pela ativação de receptores específicos em proteínas contráteis, como a actina e a miosina. Além disso, alterações no potencial elétrico da membrana celular, seja por potenciais de ação ou pela ativação de canais iônicos sensíveis ao estiramento, também podem desencadear contrações. Para que essa contração ocorra, a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) deve fosforilar uma cadeia leve de 20 kDa na miosina. Isso facilita a interação entre miosina e actina. A contração é impulsionada pela energia gerada pela atividade ATPase da miosina, que produz um ciclo de formação e quebra de pontes cruzadas entre ambas as proteínas. Portanto, o nível de fosforilação da cadeia leve da miosina é o fator chave que regula a atividade contrátil do músculo liso. Em certas células musculares lisas, a fosforilação da cadeia leve permanece em níveis baixos mesmo sem estímulos externos, como ativação mecânica ou de receptor. Este estado basal é conhecido como tônus da musculatura lisa, cuja intensidade pode variar dependendo das necessidades fisiológicas (Webb, 2003).

4.8 Contração do músculo liso dependente de Ca^{2+}

A contração do músculo liso começa com uma alteração nos filamentos grossos mediada por Ca^{2+} , enquanto no músculo estriado, a contração ocorre devido a modificações nos filamentos finos também induzidas por Ca^{2+} . Em resposta a certos estímulos, a concentração de Ca^{2+} dentro da célula aumenta, o que faz com que esse íon se ligue à proteína calmodulina. Essa união ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve da miosina (Figura 4). O aumento de Ca^{2+} no citosol ocorre pela liberação de Ca^{2+} dos depósitos

intracelulares (retículo sarcoplasmático) e pela entrada de Ca^{2+} do espaço extracelular através dos canais de Ca^{2+} dependentes de receptores. Agonistas como norepinefrina, angiotensina II e endotelina, ao se ligarem a receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, estimulam a atividade da fosfolipase C. Esta enzima age sobre o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato na membrana, produzindo dois segundos mensageiros: inositol trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DG). O IP_3 se liga aos receptores no retículo sarcoplasmático, resultando na liberação de Ca^{2+} no citosol. Por sua vez, o DG, junto com o Ca^{2+} , ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila proteínas-alvo específicas. Existem diferentes isoenzimas da PKC no músculo liso, cada uma com uma função particular dependendo do tipo de tecido (vascular, uterino, intestinal, entre outros). Em muitos casos, a PKC facilita a contração ao fosforilar canais de Ca^{2+} tipo L e outras proteínas que regulam o ciclo de formação de pontes cruzadas. Os ésteres de forbol, que ativam a PKC, imitam a ação do DG e causam a contração do músculo liso. Finalmente, os canais de Ca^{2+} tipo L, na membrana celular, se abrem em resposta à despolarização da membrana causada pelo estiramento da célula do músculo liso (Webb, 2003).

Figura 4. Regulação da contração do músculo liso vascular. DAG, diacilglicerol; IP_3 , inositol 1,4,5-trifosfato; PKC; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLC, cadeia leve de miosina; MP, miosina fosfatase, RS, retículo sarcoplasmático; P, fosfato (Webb, 2003)



Fonte: de (Webb, 2003)

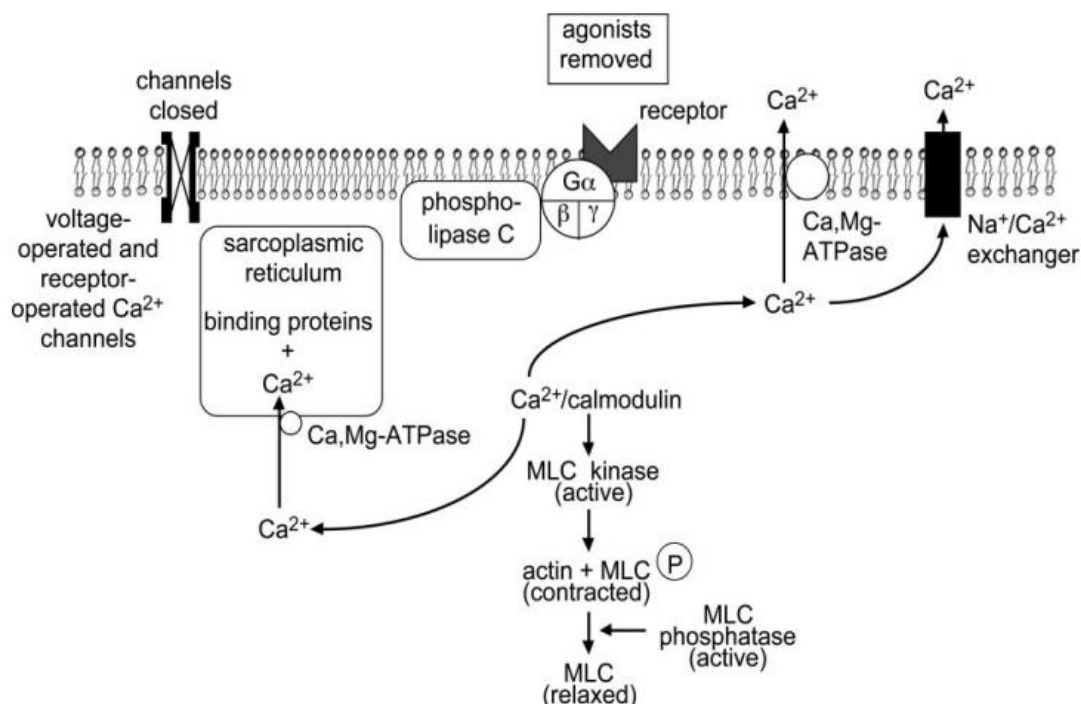
Além da ativação da MLC quinase dependente de Ca^{2+} , a fosforilação da cadeia leve da miosina também é regulada pela fosfatase MLC (ou fosfatase da miosina), que remove o fosfato de alta energia da cadeia leve, promovendo assim a suavidade relaxamento muscular. A fosfatase MLC tem três subunidades: uma

subunidade catalítica de 37 kDa, uma subunidade variável de 20 kDa e uma subunidade de ligação à miosina de 110 a 130 kDa. Quando a subunidade de ligação à miosina é fosforilada, inibe a atividade enzimática da fosfatase MLC, permitindo que a cadeia leve da miosina permaneça fosforilada e, portanto, promovendo a contração. A pequena proteína G RhoA e seu alvo, a Rho quinase, desempenham um papel crucial na regulação da fosfatase MLC. A Rho quinase, que é uma serina / treonina quinase, fosforila a subunidade de ligação à miosina da fosfatase MLC, inibindo sua atividade e promovendo assim a fosforilação da cadeia leve da miosina (Fig. 11). Os inibidores farmacológicos da Rho quinase, como o fasudil e o Y-27632, bloqueiam a sua atividade competindo com o local de ligação do ATP na enzima. A inibição da Rho quinase causa relaxamento de segmentos isolados de músculo liso que foram contraídos por vários agonistas. Em animais intactos, foi demonstrado que os inibidores farmacológicos da Rho quinase induzem o relaxamento do músculo liso nas artérias, resultando numa diminuição da pressão arterial (Webb, 2003).

4.9. Relaxamento do músculo liso

O relaxamento da musculatura lisa ocorre quando o estímulo que provoca a contração é retirado ou pela ação direta de substâncias que induzem a inibição do mecanismo contrátil (como o fator natriurético atrial, que atua como vasodilatador). De qualquer forma, esse processo requer diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} e aumento da atividade da fosfatase MLC (Figura 5). Se os mecanismos que regulam o sequestro ou eliminação do Ca^{2+} intracelular, ou aqueles que aumentam a atividade da fosfatase MLC, estiverem alterados, isso pode levar a uma resposta anormal no músculo liso (Webb, 2003).

Figura 5. Representação gráfica do relaxamento da musculatura lisa



Fonte: de (Webb, 2003)

O relaxamento das células musculares lisas ocorre quando a concentração intracelular de Ca^{2+} diminui. Este processo envolve vários mecanismos para remover o Ca^{2+} citosólico, que incluem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática. O acúmulo de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático depende da hidrólise do ATP. A Ca,Mg-ATPase do retículo sarcoplasmático, quando fosforilada, liga-se a dois íons Ca^{2+} , que se movem para o lado luminal do retículo sarcoplasmático e são liberados. O Mg^{2+} é essencial para a atividade desta enzima, pois se liga ao sítio catalítico da ATPase para facilitar a reação. Essa ATPase é inibida por diversos agentes farmacológicos, como vanadato, tpsigargina e ácido ciclopiazônico. Além disso, as proteínas de ligação ao Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, como a calsequestrina e a calreticulina, também contribuem para a redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} .

Por outro lado, a membrana plasmática também contém Ca,Mg-ATPases, que fornecem um mecanismo adicional para diminuir a concentração de Ca^{2+} na célula. Ao contrário da ATPase do retículo sarcoplasmático, esta enzima possui um domínio autoinibitório que pode se ligar à calmodulina, ativando a bomba de Ca^{2+} na membrana plasmática.

Os trocadores Na^{+}/Ca^{2+} , encontrados na membrana plasmática, também ajudam a reduzir a concentração intracelular de Ca^{2+} . Este antiportador de baixa

afinidade está intimamente relacionado aos níveis de Ca^{2+} dentro da célula e pode ser inibido por substâncias como amilorida e quinidina.

Finalmente, os canais de Ca^{2+} , que operam tanto pelos receptores quanto pela voltagem na membrana plasmática, são cruciais para a entrada de Ca^{2+} e a contração do músculo liso. A inibição desses canais pode causar relaxamento. Os antagonistas dos canais, como di-hidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas, ligam-se a locais específicos na proteína do canal e inibem a entrada de Ca^{2+} no músculo liso (Webb, 2003).

4.10. Docking molecular

O docking molecular é um método de bioinformática que permite aos sistemas computacionais prever e calcular a posição mais favorável de interação entre um ligante e um alvo (principalmente proteínas) a partir de suas representações tridimensionais. Esta ferramenta de bioinformática difere quando aplicada em todos os casos e os programas utilizados com esta funcionalidade utilizam métodos diferentes para tratar cada caso particular. Além disso, cada alvo proteico é estruturalmente diferente e a capacidade de replicar resultados experimentais e fisiológicos depende em grande parte do sistema utilizado e dos critérios do utilizador (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019).

O docking molecular foi inicialmente descrito em 1982 por Kuntz e colaboradores, tornando-se uma ferramenta central virtual para a busca, baseada na estrutura, de ligantes com atividade biológica, bem como possíveis alvos terapêuticos. Ligantes são um grande grupo de pequenas moléculas de natureza diferente, como hormônios, neurotransmissores, medicamentos ou compostos isolados de diferentes fontes naturais. Os alvos terapêuticos são geralmente moléculas grandes como ácidos nucleicos (DNA/RNA) ou proteínas, de modo que um ligante se liga ao seu alvo correspondente, podendo portanto ter atividade biológica de inibição ou ativação (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019).

Dois algoritmos separados são usados no acoplamento molecular. O primeiro prevê todas as possíveis configurações ou conformações estruturais (poses) que o ligante pode adquirir quando estabelecido dentro de um domínio ou sítio ativo na proteína alvo, e o segundo algoritmo com função de pontuação prevê as energias de ligação entre o ligante e o receptor para cada uma das configurações estabelecidas pelo primeiro algoritmo (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019). Após a interação do ligante e do alvo, uma classificação hierárquica é estabelecida de acordo com suas energias de ligação. As funções de pontuação são capazes de filtrar compostos de grandes bases de dados e a configuração de um composto com a pontuação mais alta deve corresponder à configuração com uma energia de ligação mais favorável, para que este composto possa ser considerado como um potencial semente ou chumbo (Phatak et al., 2009). No entanto, o docking molecular

também apresenta algumas fragilidades, pois não leva em consideração a natureza dinâmica da proteína alvo, considerando-a erroneamente como uma estrutura estática. Somam-se algumas limitações nos algoritmos de amostragem e imperfeições nas funções de pontuação que dão origem, em alguns casos, à geração de falsos positivos e negativos (Lill, 2011), tornando a precisão altamente dependente da proteína alvo (Warren et al., 2006). Apesar disso, é uma ferramenta que permite prever a estrutura dos complexos intermoleculares que se estabelecem entre duas moléculas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido com antecedência a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, foi aprovado sob o protocolo: 6847100823 (ID 002516) Todos os cuidados com os animais de experimentação foram regidos de acordo com as regulamentações do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI).

5.2 Veneno de escorpião

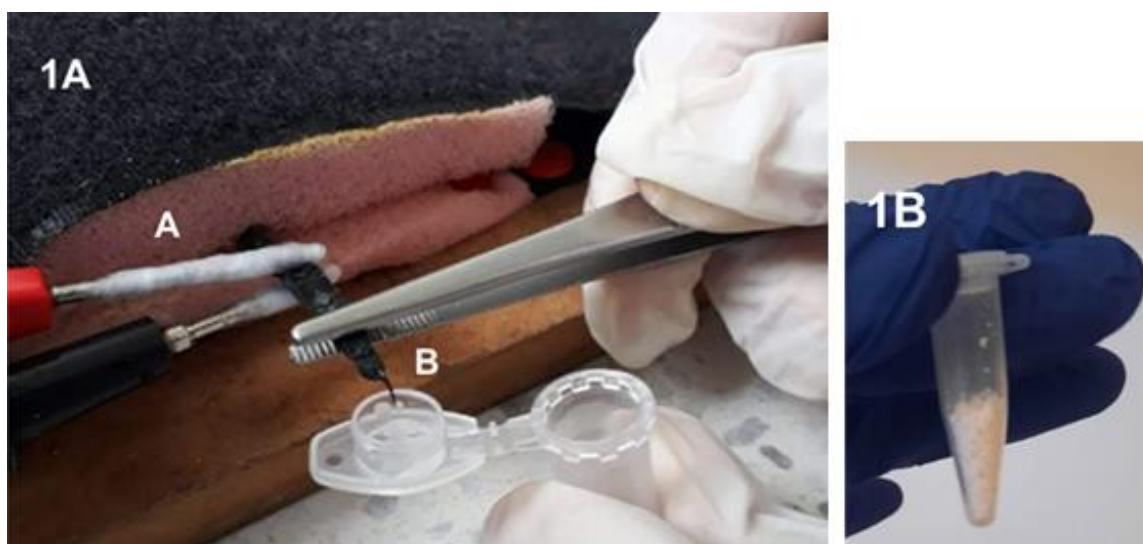
5.2.1 Local de coleta dos indivíduos e manutenção em cativeiro

A coleta foi realizada no ano 2018, no povoado Payande, município de Tolima, departamento de Cauca (Colômbia), a uma altitude de 1100 metros acima do nível do mar. A coleta foi livre realizada entre 7h da noite a 5h da manhã (autorização de coleta R0152 de 15/02/2015 da ANLA, Colômbia), os quais foram colocados em caixas coletoras com orifícios para ventilação e algodão embebido em água para hidratação. Posteriormente, foram transportados do estado de Tolima até o município do Cauca. Os espécimes foram mantidos em cativeiro no Centro de Pesquisas Biomédicas da Universidade de Cauca (CIBUC) em terrários plásticos, utilizando pedra de aquário como substrato, uma fração de favo de ovo como refúgio e água fornecida constantemente *ad libitum*. A alimentação foi realizada a cada 15 dias, fornecendo insetos vivos como grilos e baratas, um para cada indivíduo com tempo máximo de cativeiro de 7 a 8 meses. Após a coleta do veneno, os escorpiões foram sacrificados e mantidos em álcool. O veneno coletado foi tratado e armazenado até ser usado neste projeto

5.2.2 Obtenção de veneno

O veneno foi obtido de 40 escorpiões adultos da espécie *Tityus pachyurus*, realizando extrações com intervalos de 30 dias durante os meses em que permaneceram em cativeiro, ano 2018. A extração do veneno ocorreu por meio da estimulação elétrica do télson, no quarto segmento da cauda do escorpião, com o uso de um gerador de pulsos elétricos DC Square Wave 1999 (824151IS Lafayette Instrument Company), seguindo o procedimento estabelecido por Guerrero (2002). Este procedimento envolve a aplicação de estímulos elétricos mínimos através de duas pinças de carga positiva e negativa no quarto segmento da cauda do escorpião. O veneno é recolhido através de um tubo Eppendorf, conforme mostrado na Figura 1. O veneno é purificado através da centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos a 4°C, utilizando a centrífuga Labnet Hermle Z233MK-2, situada no biotério CIBUC. O sobrenadante foi selado com filme plástico perfurado e, em seguida, liofilizado em tubos Eppendorf de 1,5 ml, sendo mantido a -20°C até a hora de fazer o pool de veneno total para o projeto actual. Cinco extrações de veneno foram feitas ao longo de aproximadamente oito meses.

Figura 6. 1A) Extração de VTp, método Guerrero (2002). A) Eletrodos (+ e -) B: gota de veneno coletado. Fotografia tirada no (Centro de Investigações Biológicas da Universidade do Cauca-Colômbia, 2018). 1B) Pool de Fotografia tirada no NPDM-Br



Fonte: Elaborada pelo autor, 2025

5.2.3 Veneno total de *Tityus pachyurus*

O trabalho inicial deste projeto foi fazer o pool de veneno total partindo das as mostras coletadas (ano 2018). O pool de veneno foi obtido a partir das cinco extrações individuais previamente coletadas (no ano 2018). Para unificar as amostras, foram adicionados 150 µL de água Milli-Q a cada um dos tubos Eppendorf

contendo o veneno liofilizado. Em seguida, as soluções foram cuidadosamente homogeneizadas e transferidas para um único tubo de coleta. Esse procedimento foi repetido para cada tubo, com o objetivo de maximizar a recuperação do veneno residual aderido às paredes dos recipientes. O volume total de água Milli-Q utilizado para a reconstituição foi de 2,0 mL. A fim de quantificar a quantidade de proteína contida no pool de veneno resultante, a solução foi homogeneizada em vórtex e centrifugado a 14.000 rpm a 4°C (marca XS205 DualRange fact) durante 2 minutos, uma pequena porção do muco do veneno que impedia a homogeneização foi removida e imediatamente partindo do pool de veneno foi feita uma diluição 50x, para fazer uma leitura de absorbância em espectrofotômetro a 280 nm (NanoDrop 2000/2000c). A diluição foi realizada da seguinte maneira: 20 µl de veneno foram diluídos em 980 µl de água mili-Q ultra purificada (fator 1/50), aplicou-se a fórmula descrita abaixo para calcular a concentração de proteína total contida no pool de veneno.

Donde:

$$CFv = (A280) * (Fd)$$

CFv = Concentração do pool de veneno

$A280$ = Absorbância a 280 nanômetros (nm)

Fd = Fator de diluição.

Deu como resultado:

$$CFv = 1.216 \text{ mg/ml} * 50 = 60.8 \text{ mg/ml}$$

O que é a concentração de proteína no veneno em 1ml de água mili-Q.

Para os 2,0 ml de água que foram usados na diluição do veneno, tinha-se 121,6 mg de veneno, como mostra-se aqui:

$$\text{Absorbância } 280 \text{ nm} = 1.216 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ (factor de dilução)}$$

Absorbância 280 nm = 60.8 mg/ml. A concentração de veneno total é de 121,6 mg.

Foi deixado em 120 mg devido às perdas de veneno que permanecem nas paredes das pipetas, e aplicou-se a regra de três para saber em quantos ml estavam contidos 20 µg de proteína.

Figura 7. Razão de VTp em mg

1	→	60.8 mg
X	→	20 mg
X = 0.328 mg ≈ 0.33 (redondeo)		
0.33 ml = 330 ul		
Cada 330 ul tiene		20 mg de veneno

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025

Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 330 µl contendo 20 mg do veneno, das quais foram obtidas 5 alíquotas de 330 µl e uma alíquota com um pequeno resíduo de veneno e imediatamente foram liofilizadas (liofilizador L101). Após a secagem das amostras, foram congeladas no ultracongelador (marca SANYO modelo MDF-U5486SC) a -80°C. As alíquotas foram retiradas individualmente, conforme a necessidade de cada experimento, as demais permaneceram armazenadas até seu uso. O veneno do *Tp.* foi usado para realizar testes *In vivo* e *In vitro*

5.3 AVALIAÇÃO *In vivo* DO VENENO DE *Tityus pachyurus*

O teste HET-CAM (Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane) foi conduzido com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda e caracterizar o comportamento vasomotor inicial do VTp, previamente aos estudos de reatividade vascular. A irritabilidade do veneno de *T.p.* foi avaliado a através deste teste, utilizando embriões da espécie *Gallus gallus* no décimo dia de desenvolvimento embrionário, com o objetivo de avaliar se doses subletais do veneno do escorpião *Tityus pachyurus* provocaram irritação, como hemorragia, coagulação ou lise dos vasos sanguíneos, na membrana corioalantóica (CAM) durante um período de 5 minutos de observação (Luepke & Kemper, 1986).

O teste consistiu na remoção cuidadosa da porção da casca do ovo localizada acima da câmara de ar, expondo a superfície interna da membrana do ovo. Em seguida, a membrana corioalantóica foi delicadamente acessada e preparada para a aplicação da substância-teste. Devido à elevada vascularização da CAM, esse método permitiu uma primeira aproximação à ação do veneno nos vasos sanguíneos embrionários em tempo real para estabelecer sua ação vasoconstritora ou vasodilatadora.

5.3.1 Incubação de ovos e acesso à membrana corioalantóide (CAM)

Os ovos fecundados da espécie *Gallus gallus domesticus* foram higienizados cada um em água corrente, fazendo uma limpeza suave na casca do ovo e foram secados com papel toalha. Os ovos foram imediatamente encaminhados para a

chocadeira (Modelo IP35D, Premium Ecológico®), previamente aquecida, sob condições controladas de temperatura 37 °C e 60% de umidade.

No quarto dia, o desenvolvimento do embrião dos ovos foi verificado através de uma luz focal branca em um quarto escuro, a câmara de ar foi marcada com um círculo feito na casca imediatamente acima com um lápis comum. Os ovos embrionados, foram colocados sobre copos plásticos de 50 ml, com a marca do lápis voltada para cima e encaminhados para uma incubadora de CO₂ (Modelo MCO-17AC, Sanyo Scientific®) até o décimo dia, onde eles foram retirados cada um da incubadora para a realização do experimento.

A seguir, descreve-se o procedimento experimental adotado: A abertura da casca do ovo foi realizada fazendo uma pequena incisão por meio de uma tesoura Castroviejo na parte demarcada, a abertura foi ampliada até deixar toda a câmara de ar completamente exposta e permitir a remoção da membrana coclear e a exposição específica da membrana corioalantóica. Após a exposição, o composto teste foi administrado sobre a CAM, foi gravado e observado por meio de uma câmera ancorado a um estereomicroscópio e registrado por um tempo 5 minutos, quaisquer ações classificadas como potencialmente irritantes (hemorragia, coagulação ou lise de vasos). qualquer manifestação de um dos eventos mencionados foi registrada para posterior medição por meio do escore de irritação.

Nos tempos de 0, 30, 60, 120, 240 e 300 segundos, foram tiradas fotografias. Após a conclusão do experimento, os embriões foram eutanasiados por meio do corte dos vasos sanguíneos.

5.3.2 Grupos experimentais

O N experimental foi de 4 ovos por grupo, onde os grupos foram: 1) grupo controle de vasoconstrição (fenilefrina PHE 1mM). 2) grupo controle de Vasodilatação (acetilcolina ACh 1 µM). 3) grupo controle positivo (hidróxido de sódio NaOH 0,1M. 4) grupo controle negativo (solução salina tamponada com fosfato PBS). 5) grupo veneno de *Tiyus pachyurus* VTp, a maior dose do veneno (60 µg) (explicado abaixo no item de “doses de veneno”). Todos os grupos foram gravados com a câmera acoplada ao equipamento por 5 minutos.

5.3.3 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda foi avaliada por análise qualitativa por meio do escore de irritação (IS). O IS utilizou-se por Luepke e Kemper em 1986 em seu método HET-CAM que consistia em analisar o grau de irritabilidade de uma substância segundo três critérios observados na membrana: hemorragia, lise dos vasos e coagulação. Para caracterizar o potencial de irritação O Irritation Score é Classificado com base em quatro parâmetros análogas ao teste de Draize (Tabela 2), e é calculado através da fórmula descrita abaixo. Foram avaliados três grupos: o veneno do VTp, controle

positivo (NaOH) e controle negativo (PBS), gravado por 5 minutos e capturadas fotos em 5 momentos: antes da aplicação da substância, 30, 60, 120, 240 e cinco minutos após o tratamento, para permitir a comparação direta induzida por cada agente. Os vídeos registrados durante esse tempo ajudaram a corroborar exatamente o momento em que alguns dos três eventos já mencionados ocorreram

$$IS = 5 \left(\frac{301 - secH}{300} \right) + 7 \left(\frac{301 - secL}{300} \right) + 9 \left(\frac{301 - secC}{300} \right)$$

Onde:

H: Denotando Hemorragia

L: Denotando Lise de Vasos

C: Denotando Coagulação

Sec: Expressa o tempo inicial em segundos

5: Constante de Hemorragia que deve multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito

7: Constante de Lise vascular que multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito

9: Constante de Coagulação que multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito

300: Tempo total do experimento que deve dividir cada fração

Na tabela mencionada abaixo foi usada para fazer a classificação de irritação dos resultados obtidos de nosso experimento

Tabela 2. Classificação do irritation score do Het Cam.

Intervalo de Escore de Irritação	Classificação
0,0 – 0,9	Não irritante
1,0 – 4,9	Irritante leve
5,0 - 8,9	Irritante médio
9,0 - 21	Irritante severo

Fonte: Classificação retirada de (Frota de Lima, 2022) sendo uma adaptação do autor (Luepke & Kemper, 1986)

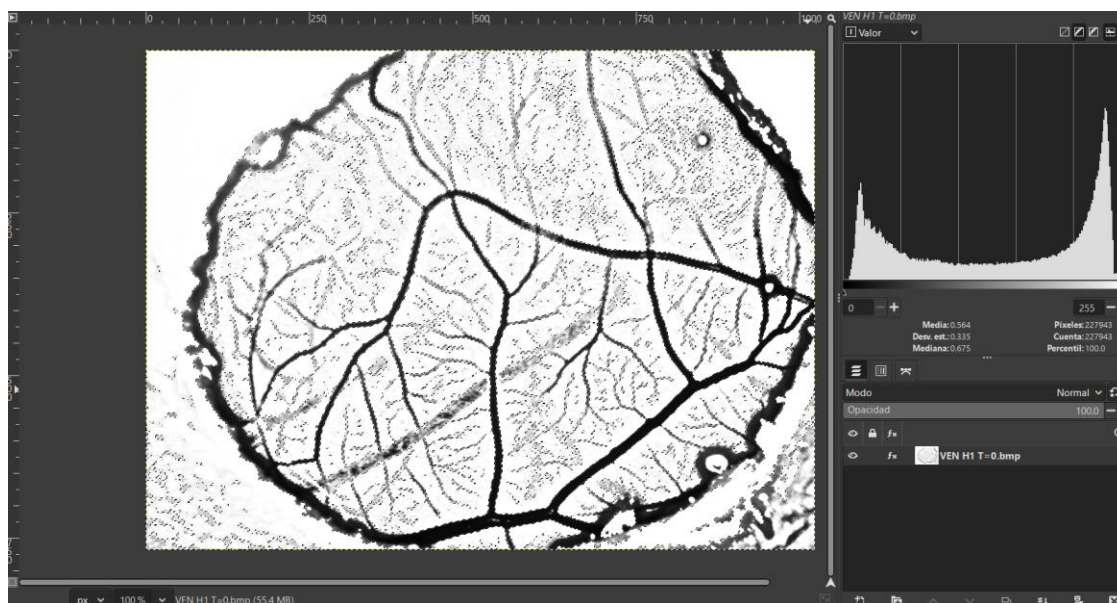
5.3.4 Comportamento vasomotor inicial mediante análise de imagens pelo GIMP

Foi realizado análise análise quantitativa de imagens com o objetivo de mensurar a área ocupada por vasos sanguíneos na membrana cório-alantóica

(HET-CAM) de embriões de galinha, a fim de avaliar o efeito vascular de diferentes substâncias aplicadas topicamente. Foram avaliados quatro (4) grupos experimentais, correspondentes às seguintes substâncias: veneno do *Tityus pachyurus* (VTp), controle de vasodilatação (acetilcolina ACh), controle de contração (fenilefrina PHE) e solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para cada condição experimental, foram utilizadas imagens obtidas de quatro ovos férteis ($n = 4$), totalizando 16 experimentos independentes. As imagens foram capturadas em 5 momentos: imediatamente antes da aplicação da substância (imagem basal), 30, 60, 120, 240 e cinco minutos após o tratamento (imagem pós-tratamento), de modo a permitir a comparação direta dos efeitos vasculares induzidos por cada agente.

As imagens foram adquiridas em formato bitmap (.BMP), o que preserva a integridade dos dados visuais devido à ausência de compressão, garantindo precisão na análise digital subsequente. O processamento e a quantificação das imagens foram realizados utilizando-se o software GIMP (GNU Image Manipulation Program), versão 3.0.2. Inicialmente, as imagens passaram por um processo de pré-processamento com aplicação do filtro “Fotocópia”, recurso que converte a imagem para tons de cinza ao mesmo tempo em que realça o contraste entre estruturas vasculares e o fundo da membrana, favorecendo a definição dos contornos dos vasos, adaptando o processo segundo a metodologia de Loidi-Castillo (2012).

Figura 8. Imagem do HET-CAM obtida após o pré-processamento.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

A seguir, procedeu-se à segmentação das estruturas vasculares por meio da ferramenta “Seleção Difusa” (também conhecida como varinha mágica), que permite a seleção automática de regiões contíguas com base em similaridade tonal. O limiar de sensibilidade da seleção foi ajustado manualmente para cada imagem,

assegurando que apenas os vasos sanguíneos fossem selecionados, excluindo áreas adjacentes não vasculares. A quantificação da área vascular foi realizada por meio da ferramenta “Histograma” do próprio GIMP, que fornece a contagem precisa do número de pixels incluídos na seleção ativa. Com base nesses dados, foi possível estimar a área ocupada pelos vasos como proporção da área total da imagem.

Para a avaliação do efeito das substâncias sobre a vasculatura, foi calculada a variação percentual da área vascular entre os tempos pré e pós-tratamento, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Variação percentual} = \left(\frac{\text{Area pos_tratamento} - \text{Area basal}}{\text{Area basal}} \right) \times 100$$

Esse procedimento permitiu determinar de forma objetiva o aumento ou redução da área vascular em resposta a cada agente testado. A metodologia adotada garantiu padronização entre os grupos, favorecendo a reprodutibilidade dos dados e a comparação estatística entre os diferentes tratamentos.

5.4 Avaliação *In vitro* do veneno do *Tityus pachyurus*

Com base nos resultados obtidos do teste de HET-CAM foram estabelecidos os parâmetros iniciais para determinar o possível efeito vasodilatador do veneno por meio do sistema do banho de órgãos, uma vez que suas propriedades farmacológicas ainda não eram conhecidas. O teste de reatividade vascular foi realizado com o objetivo de compreender mais profundamente o mecanismo de ação do veneno, antecedendo o estudo *in silico* voltadas à modelagem molecular e predição de interações.

Para avaliar o *VTp In vitro* foi usada a técnica de banho de órgão isolado. para determinar o efeito do *VTp* nos anéis aórticos, foram usados para cada um dos grupos de tratamento, pelo menos 6 anéis aórticos de três ratos para cada uma das curvas dos diferentes grupos vasoativos. As alíquotas do veneno de *Tp*. que ficaram armazenadas, foram diluídas em água milli-Q e posteriormente diluída em solução de Krebs henseleit (veículo) no mesmo dia da realização do experimento, o procedimento foi o mesmo para todos os casos. Foram realizadas curvas de concentração-resposta, que consistiram em 8 doses cumulativas de *VTp* de concentração 0,05 ; 0,1 ; 0,4 ; 1 ; 3 ; 10 ; 20 até 60 (µg/ml) (segundo tabela 3), administradas a cada 10 minutos; estas concentrações foram baseadas de acordo com o protocolo de (Romero-Imbach et al., 2021), e também foi levado em consideração a DL50 para *T.pachyurus* (DL50=4.8 mg/kg) de (Barona et al., 2006) pois nosso processo de quantificação do veneno foi extraído uma pequena parte de precipitado do “muco” do veneno, que impediu uma mistura homogênea, para

realizar a quantificação proteica. Essa etapa também foi realizada pelo autor durante o procedimento de purificação.

Tabela 3. Relação doses- concentração de VTp usadas nos experimentos. Baseadas de acordo com o protocolo de (Romero-Imbach et al., 2021)

	1 ponto	2 ponto	3 ponto	4 ponto	5 ponto	6 ponto	7 ponto	8 ponto
Doses VTp (en µg) cuba 10 ml	0,5	1,5	4	10	30	100	200	600
Concentração VTp (µg/ml)	0,05	0,15	0,4	1	3	10	20	60

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Adicionalmente, foi feita um teste para avaliar se quando foi aumentado as concentrações do veneno da tabela 3 para as concentrações de 3; 10; 20; e 60, 120, 240, 480, 960 µg/ml o efeito ficava diferente, mais no teste feito corroborou-se que as curvas de concentração-resposta reagiram na mesma proporção portanto continuou-se com doses da tabela 3.

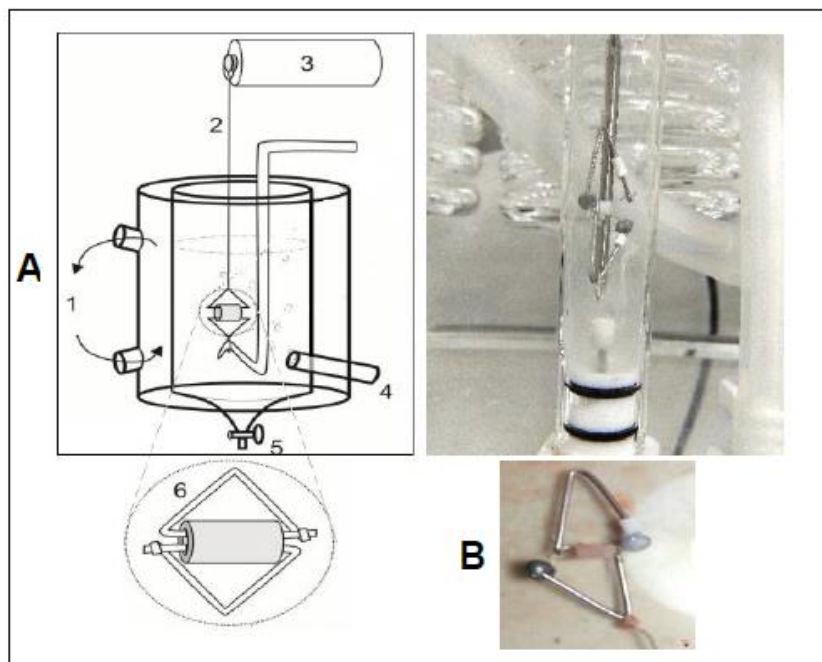
5.4.1 Obtenção de anéis aórticos

Foram utilizados *Rattus norvegicus* da cepa Wistar, machos, com peso de 300 ± 50 g, mantidas em condições de temperatura de 22 ± 2 °C, com dieta especial para roedores (*rodent diet*) e água *ad libitum*.

Foram selecionadas aleatoriamente ratos Wistar de onde foram extraídos anéis aórticos. Os indivíduos foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) por via intraperitoneal (Segura, 2007) e eutanasiados por exsanguinação na veia cava inferior através de uma incisão na cavidade abdominal. Uma vez que a morte do animal foi confirmada, foi feita uma incisão pré-esternal na cavidade torácica a fim de isolar a aorta torácica e imediatamente depois foi imersa em solução de Krebs-Henseleit à temperatura ambiente. Retirou-se cuidadosamente a camada externa, para ser cortado em segmentos de 3 a 4 mm de comprimento; de cada aorta foram obtidos 4 anéis. Foram sacrificados dois ratos por dia.

Cada anel foi suspenso por duas estruturas triangulares de fio de aço. Uma das peças triangulares foi conectada a um gancho de uma haste metálica e a outra peça foi conectada por meio de um fio sem mola a um transdutor de tensão no banho de órgão. subsequentemente foram deixados em cubas com 10 ml de solução de Krebs-Henseleit, e carbogenio (mistura de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono), a 37 °C de temperatura. A oxigenação foi verificada antes do início do protocolo e a tensão foi ajustada para 10 Newtons ou 2 gramas de peso.

Figura 9. Esquema do sistema de banho e montagem dos anéis aórticos na câmara de órgãos retirado de (Romero-Imbachi et al., 2021)



Fonte: Elaborado pelo autor (Romero-Imbachi et al., 2021)

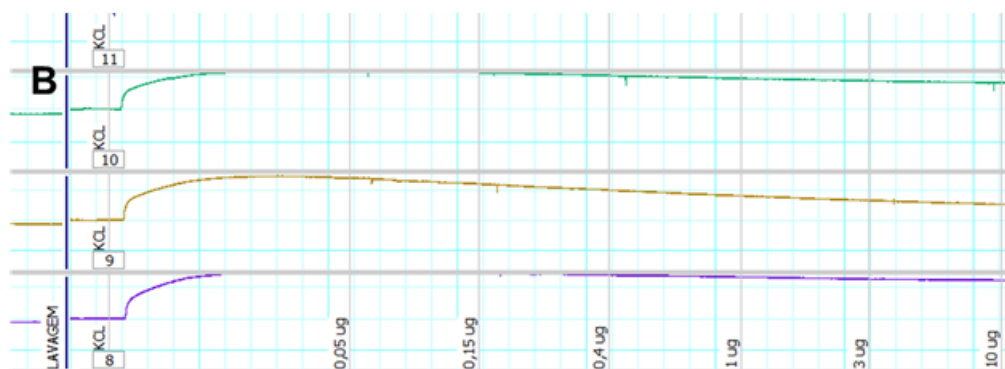
O transdutor de tensão ou de força isométrica (MLT0201/ADInstruments), monitorou a tensão exercida pelos anéis, o sinal foi Amplificada por o amplificador (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments) e acoplado a um sistema de aquisição digital de dados (Power Lab®, ML8661P, 4130, ADInstruments) para depois ser transmitido e registrado mediante o (LabChart® 8.0.1 for Windows, ADInstruments). Foram usadas duas câmaras de órgão, cada um com 4 canais.

5.4.2 Protocolo de estabilização e teste de viabilidade

Depois de fazer o montagem dos anéis aorticos na câmara do banho de órgãos, o sistema foi estabilizado trocando a solução de Krebs a cada 15 minutos e ajustando a tensão para 10 newtons. Este procedimento foi realizado durante um período de uma hora (Khanna et al., 2011). Uma vez concluída a estabilização, a viabilidade de cada anel aórtico foi avaliada, induzindo-se uma contração com cloreto de potássio (KCl) de concentração de de 60 mmol/L. Os anéis foram aprovados somente se contraíssem pelo menos 70% em relação ao seu valor basal. Os anéis aprovados passaram pelo teste de viabilidade endotelial após 4 substituições com Krebs e foram deixados nessa solução por tempo suficiente para permitir a repolarização da membrana celular. Na viabilidade endotelial, a linha de base de cada anel foi registrada e então a contração com fenilefrina (PHE, 1 µmol/L)

foi induzida, seguida de vasodilatação com acetilcolina (ACh, 10 $\mu\text{mol/L}$). Como ilustra na figura 10.

Figura 10. Representa as curvas de veneno de VTp em anéis aórticos pré-contráídos com PHE ou KCL



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.4.3 Grupos experimentais anéis de aorta

Para avaliar o VTP no comportamento vasomotor da aorta, foram realizadas preparações aórticas *In vitro* organizados nos seguintes grupos: 1) previamente contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) com endotélio (intacto) ou sem endotélio (desnudado). 2) previamente contraídas com KCl (60 mmol/L), com endotélio (intacto) ou sem endotélio. 3) grupo dos bloqueadores de potássio (K^+) todos com endotélio: TEA (1 mM), 4AP (1 mM), Glibenclamida (10 μM) e uma mistura de 50% de (TEA e 4AP 1 mM) em contração. 4) grupo bloqueadores via óxido nítrico (NO): L-name (100 μM) e ODQ (10 μM) e 5) grupo dos bloqueadores muscarínicos: Atropina (1 μM)

5.4.4 Efeito do VTp sobre o tono vascular: curvas de concentração-resposta de VTp em: contração.

Para avaliar os efeitos do veneno no comportamento vasomotor da aorta, a avaliação do relaxamento dos preparados de aorta foi realizada sob efeito do veneno de *T. pachyurus* dissolvido em solução de Krebs. foram feitas curvas de concentração-resposta com 8 pontos de concentrações: 0,05; 0,15; 0,4; 10; 3; 10; 20 e 60 ($\mu\text{g/mL}$), 10 minutos para cada concentração, com endotélio (intacto) ou sem endotélio (desnudado), em preparações *In vitro* o previamente contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (60 mmol/L), para induzir uma contração sustentada através de acoplamento farmacomecânico e eletromecânico, respectivamente, até atingir o platô da curva. Os dados foram registrados para análise.

5.4.5 Efeito do VTp sobre o tono vascular dependente do endotélio

Para avaliar se o efeito do veneno é dependente ou independente do endotélio no tônus vascular da aorta do rato, as vias endoteliais foram bloqueadas através de diferentes grupos de bloqueadores, que permitiram estabelecer as possíveis vias de ação do veneno. Foram feitas curvas *VTp* mais fatores vasoativos com endotélio que foram organizados de acordo a seu via de ação assim: 1) grupo dos bloqueadores de potássio (K⁺): TEA 1 mM (Tetraetilamonio), 4AP 1mM (4-Aminopiridina), Glibenclamida 10μM (GLIB) e uma mistura de 50% de (TEA e 4AP 1mM) em contração 2) grupo bloqueadores via óxido nítrico (NO): L-name (L-NG-nitro-arginina metil éster) 100μM e ODQ 10μM (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), 3) bloqueadores muscarínicos: Atropina 1μM, onde os anéis foram previamente incubados por 30 minutos antes de realizar a curva do veneno.

5.5 Avaliação *In silico* de toxinas do veneno *Tityus pachyurus*

A fim de compreender os efeitos farmacológicos do veneno de *Tityus pachyurus* sobre o sistema vascular, inicialmente foram conduzidos testes das respostas vasomotoras em anéis de aorta de rato, fornecendo dados experimentais essenciais sobre sua possível ação sobre o endotélio e a musculatura lisa vascular. Com base nesses achados *In vitro*, foi possível direcionar análises complementares por meio de estudos *In silico*, utilizando a técnica de docking molecular.

5.5.1 Docking Molecular de duas possíveis toxinas de *Tityus pachyurus*

Modelagem 3D dos peptídeos

Para a modelagem tridimensional dos peptídeos TPA1 (ACGSCRKKCKGPGKCINGRCKCY), TPA2 (KKEGYLVGNDGCKYSCETRPAQYCHECELKRGTDGYCYAWLACYCYNMPDHR TWSRATNRCGS) e TPA3 (ADDDLEGFSEEDLKAIKEHRAGLAA), foi utilizado o programa PEP-FOLD 4.0, uma ferramenta de modelagem de estrutura peptídica baseada em simulações de Monte Carlo restritas e aprendizagem automática. O PEP-FOLD 4.0 permite a geração de modelos estruturais de novos peptídeos a partir de sequências primárias, facilitando a obtenção de conformações energeticamente favoráveis, mesmo para peptídeos de natureza complexa (Thévenet et al., 2012).

5.5.2 Docking peptídeo-proteína

A avaliação das interações peptídeo-proteína entre TPA1, TPA2, TPA3 modeladas e os alvos canal retificador de potássio interno - KIR (PDB: 1P7B) e canal de potássio ativados por cálcio - KCa (PDB: 6CNN) foram realizados utilizando a plataforma de docking ClusPro 2.0 (Comeau et al., 2004). O procedimento de

docking envolveu a submissão das estruturas tridimensionais das proteínas de interesse, previamente obtidas a partir do Protein Data Bank (PDB), seguido pela análise das energias de interação entre as moléculas.

O algoritmo de docking utilizado pelo ClusPro é baseado em um processo de Fast Fourier Transform (FFT) que busca as poses de acoplamento mais favoráveis energeticamente, levando em consideração quatro componentes principais: forças repulsivas (Erep), forças atrativas (Eatt), interações eletrostáticas (Eelec) e o termo de afinidade baseado em Docking Atomic Coordinate System (EDARS). As energias calculadas foram ponderadas conforme a equação descrita por (Kozakov et al., 2014) Kozakov et al. (2017), onde $E = 0.40 \times E_{rep} - 0.40 \times E_{att} + 600 \times E_{elec} + 1.00 \times EDARS$, e expressas em quilocalorias por mol (kcal/mol).

Os resultados de acoplamento e vias de interação foram visualizados no LigPlot+ (Laskowski & Swindells, 2011) para confirmar a posição de ligação dos alvos e dos receptores.

5.6 Análise estatística

Análise estatística de avaliação *In vivo* do veneno de *Tityus pachyurus*: A avaliação estatística foi conduzida por meio de abordagens qualitativa e quantitativa, de acordo com a natureza dos parâmetros observados.

Para o teste de toxicidade aguda (HET-CAM), foi empregada uma análise qualitativa, baseada no cálculo do índice de irritabilidade (IS), conforme critérios estabelecidos na literatura. Esse índice considera o tempo de aparecimento de sinais como hemorragia, lise e coagulação nos vasos da membrana corioalantoide, classificando a toxicidade do composto testado em diferentes níveis.

Já para o estudo do comportamento vasomotor inicial, a análise foi quantitativa. As imagens obtidas da membrana corioalantoide, antes e após a aplicação do veneno, foram analisadas utilizando o software GIMP (GNU Image Manipulation Program), versão 3.0.2. Foi calculada a variação percentual da área vascular entre os tempos pré e pós-tratamento.

Análise estatística de avaliação *In vitro* do veneno do *Tityus pachyurus*: Foram utilizados por cada grupo um total de (n=6) segmentos aórticos de (N=2) animais, sendo 'n' minúsculo o número de segmentos de aorta utilizados e o 'N' maiúsculo o número total de animais.

Para todas as análises estatística foi usado o software estatístico GraphPad Prism® 8.0.1 (GraphPad Software, EUA). Os resultados foram expressos no formato média \pm erro padrão da média (EPM), acompanhado pelo número de amostras experimentais (n). A EC50 foi apresentada como a média e intervalo de confiança de 95% (IC95%)

Para comparar três ou mais grupos a análise de variância (ANOVA) com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Para comparar dois grupos utilizou-se o teste t para dados não pareados. Todos os grupos utilizaram o nível de significância de 0,05 (5%), o que significa que valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação *In vivo* do veneno *Tichyus pachyurus*

6.1.1. Toxicidade Aguda

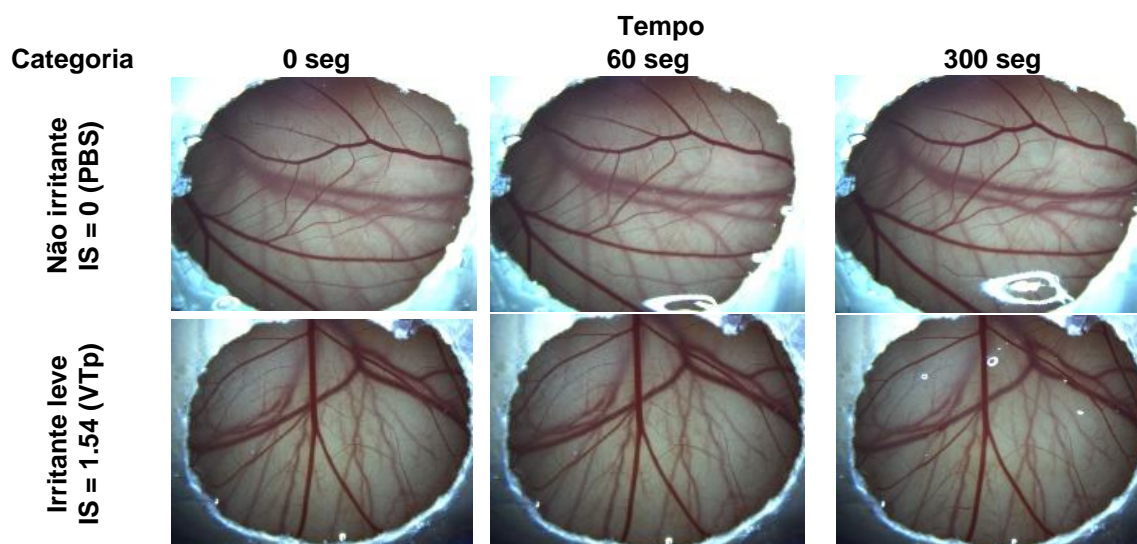
Os resultados obtidos mediante o IS o grupo de VTp apresentou um IS de 1.54 sendo classificado como uma substância que produz irritação leve. O controle PBS apresentou um IS=0, sendo considerados não irritantes. O grupo NaOH é um irritante severo (IS=15,76). Os tecidos foram deixados por 5 minutos para cada substância e as imagens podem ser vistas na figura 11.

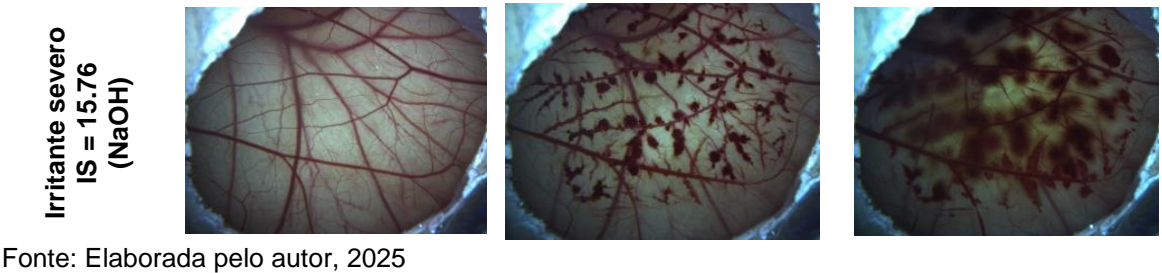
Tabela 4. Classificação do índice de irritação obtido do veneno de *Tityus pachyurus* e seus respectivos controles

Composto	IS Médio	Classificação
VTp	1.54	Irritante leve
PBS	0	Não irritante
NaOH	15.76	Irritante severo

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Figura 11. Resultados da ação de VTp e seus controles no HET-CAM





6.1.2. Comportamento Vasomotor Inicial

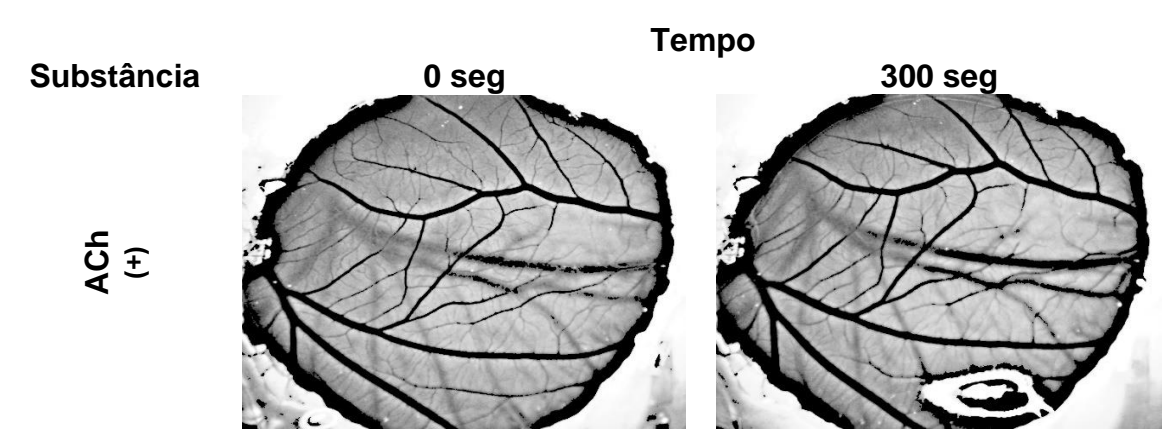
Para cada substância testada foram analisadas imagens de quatro ovos (n = 4). O VTp apresentou uma vasodilatação com uma variação percentual da área vascular de 10,43 ±1,82 com respeito aos controles. A tabela a seguir resume os resultados obtidos para a variação percentual da área vascular entre o momento inicial (t=0 seg.) e cinco minutos após o tratamento e na figura 12 podem ser observadas as imagens:

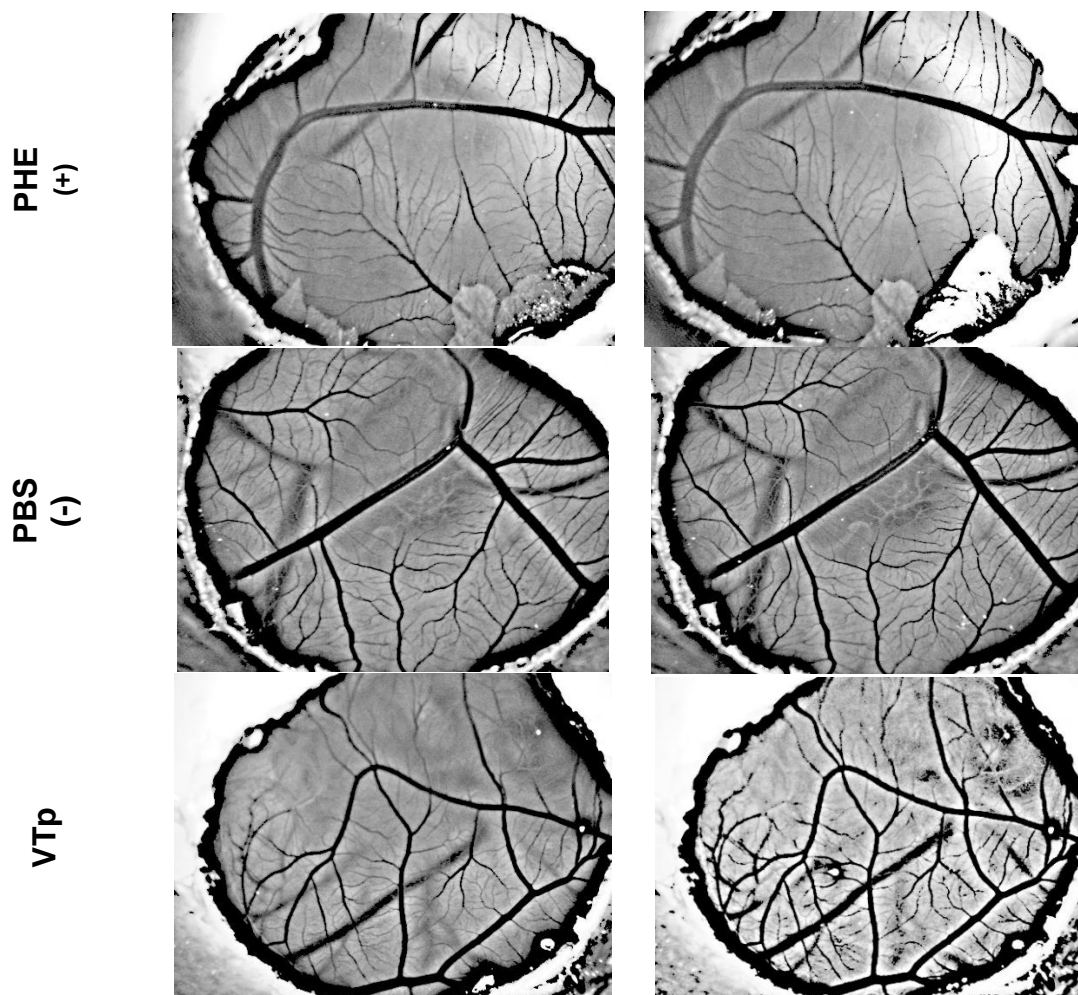
Tabela 5. Variação percentual da área vascular para cada substância utilizada no HET-CAM.

Substância	Variação Média (%)	Erro Padrão da Média (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
VTp	+10,43	±1,82	+5,52	+13,33
ACh	+1,18	± 0,24	+0,64	+1,72
PBS	+0,29	±0,62	-1,14	+1,33
PHE	-3,64	±0,69	-5,27	-2,06

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Figura 12. Resultados da análise da variação percentual da área vascular com VTp e seus controles no HET-CAM.





Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

O veneno do escorpião *Tityus pachyurus* provocou um aumento significativo na área vascular (média de 10,43%). Esse resultado indica um efeito vasodilatador relevante, possivelmente mediado por componentes peptídicos ou proteicos do veneno que atuam sobre o endotélio ou diretamente na musculatura lisa dos vasos. A resposta foi consistente entre as réplicas, o que reforça a presença de um componente ativo com ação farmacológica específica.

A acetilcolina (ACh), por sua vez, apresentou um aumento mínimo, porém consistente da área vascular (1,18% em média), em conformidade com seu perfil de agente vasodilatador dependente do endotélio. A ACh é conhecida por estimular a liberação de óxido nítrico por células endoteliais, promovendo relaxamento da musculatura lisa.

O grupo controle (PBS) exibiu uma variação praticamente nula (0,29% em média), com amplitude dentro da faixa de erro experimental, o que confirma a

ausência de efeito vascular relevante por parte do veículo. Esses dados validam a especificidade dos efeitos observados nas demais condições experimentais.

Finalmente, a fenilefrina (PHE) foi a única substância a induzir vasoconstrição, com uma redução média de 3,64% na área vascular. Esse achado é coerente com o perfil farmacológico da fenilefrina como agonista α 1-adrenérgico, que promove contração da musculatura lisa vascular.

Os resultados obtidos po VTp no IS, no entanto, deve ser considerada com cautela, devido ao caráter qualitativo do modelo HET-CAM, que depende fortemente do critério subjetivo de avaliação de cada experimentador, podendo haver variações significativas na classificação do grau de lesão vascular observada.

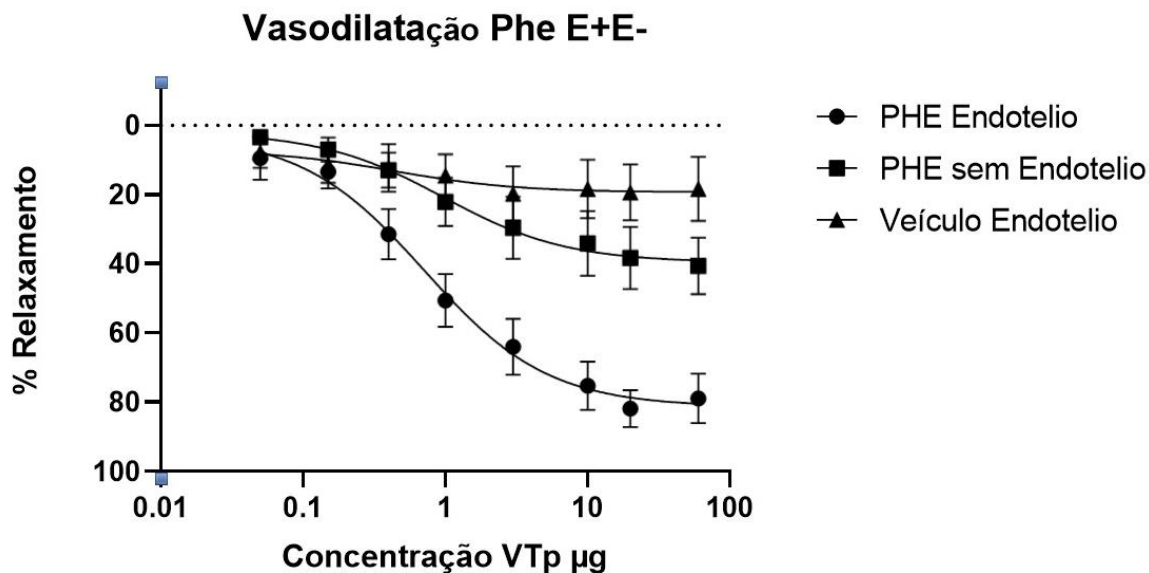
6.2. Avaliação *In vitro* do veneno do *Tityus pachyurus*

6.2.1. Potencial vasorelaxante do VTp em anéis de aorta isolado pré-contráídos com PHE

Foram obtidos resultados que refletem o efeito vasorelaxante significativo de VTp em presença de endotélio (E+) quando comprado com o veículo ($p= 0,0035$) e quando comparado com o grupo sem endotélio (E-) ($p= 0,0250$), o que permite comprovar que o efeito vasodilatador de VTp é mediado pelo endotélio.

O grupo PHE com endotélio apresentou um porcentagem de vasodilatação médio de $(50,65 \pm 10,36)$, o qual foi maior quando comparado com o grupo de PHE sem endotélio $(23,55 \pm 5,092)$, o que sugere possivelmente que o acoplamento farmacomecânico está envolvido. O veneno causa vasodilatação para grupos com endotélio íntegro a partir de $0,71 \mu\text{g}$ e para grupos com endotélio lesado de $0.97 \mu\text{g}$ a $60 \mu\text{g}$ de veneno. A partir de $10 \mu\text{g}$ de veneno o anel começa a saturar e a resposta vasodilatadora não tem efeito adicional.

Figura 13. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas acumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente e sem endotélio, pré-contráídos com PHE.



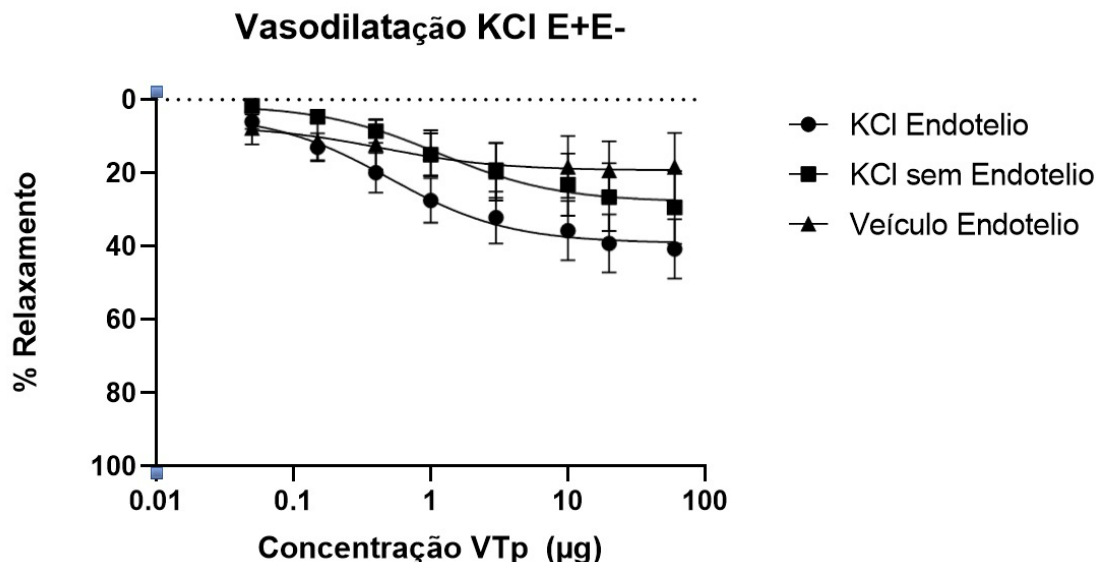
Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. n= 6 anéis por grupo.

6.2.2. Potencial vasorelaxante do VTP em anéis de aorta isolado pre-contráidas com KCl

Os resultados obtidos refletem que o VTP não teve um efeito vasorelaxante significativo ao comparar com o veículo, tanto em presença de endotélio ($p=0,067$) quanto comparado com o grupo sem endotélio ($p=0,983$), e também quando foram comparados ambos os grupos de tratamento ($p=0,0954$), o que significa que o veneno não afeta significativamente mecanismos de despolarização direta da membrana, como os induzidos pelo KCl.

O grupo KCl com endotélio apresentou um porcentagem de vasodilatação médio de $(26,84 \pm 4,492)$, o qual foi maior quando comparado com o grupo de KCl sem endotélio ($16,10 \pm 3,644$). O veneno causa vasodilatação para grupos com KCl com endotélio íntegro a partir de $0,50 \mu\text{g}$ e para grupos com endotélio lesado de $1,15 \mu\text{g}$ a $60 \mu\text{g}$ de veneno.

Figura 14. Efeito vasorelaxante do VTP em curvas acumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente e sem endotélio, pré-contráídos com KCl.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

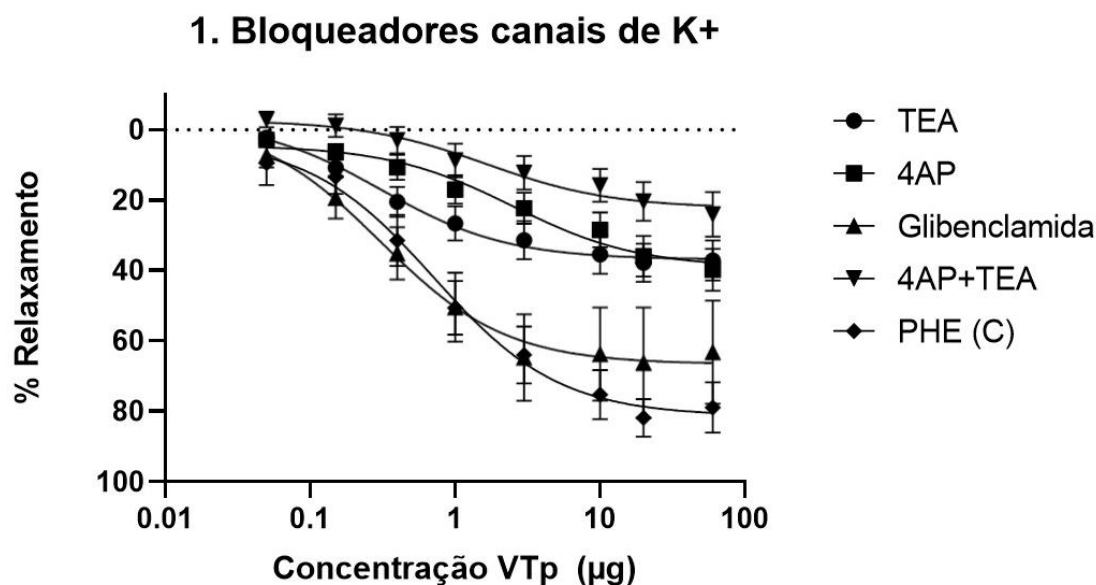
Os resultados apresentados dos grupos a partir deste momento foram todos realizados com anéis pré-contraídos com PHE e com endotélio íntegro.

6.2.3 Potencial vasorelaxante do VTp em anéis de aorta isolado pre-contraídas com PHE incubados com bloqueadores de K⁺: TEA, 4AP, GLIB, 4AP+TEA

Os resultados obtidos refletem o efeito bloqueador significativo das seguintes substâncias quando comparadas ao grupo controle em presença do VTp: 4AP ($p=0,0261$), e 4AP + TEA ($p=0,0014$), o que indica que o veneno está agindo sobre canais de potássio regulados por voltagem (Kv). Também se observou uma diferença significativa do grupo GLIB quando comparado com o grupo 4AP+TEA ($p=0,0051$), o que permite inferir que o efeito de VTp é independente do bloqueio de canais de K⁺ dependentes do ATP, agindo principalmente em outros canais de K⁺ (Kv, BKCa).

O grupo TEA embora não tenha apresentado diferença estatística, teve uma porcentagem de vasodilatação média de $(25,25 \pm 4,639)$, sendo semelhante quando comparado com o grupo de 4AP $(20,42 \pm 4,823)$. A ausência de significância se atribui a que o efeito de bloqueio de TEA foi menor em doses de veneno na faixa 0,1 µg até 1 µg quando comparado aos outros bloqueadores (ver Figura. 13). O grupo 4AP+TEA apresentou uma melhora no efeito de bloqueio com respeito aos grupos sem mistura, com uma porcentagem de vasodilatação médio de $(10,01 \pm 3,493)$, o grupo de GLIB apresentou baixo efeito de bloqueio, com uma porcentagem de vasodilatação média de $(46,27 \pm 8,142)$, ficando próximo do grupo controle que apresentou uma porcentagem de vasodilatação médio de $(50,65 \pm 10,36)$. O veneno causa vasodilatação para grupos de TEA, 4AP e 4AP+TEA a partir de 0,31; 2,52 e 1,64 µg respectivamente.

Figura 15. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas cumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente incubados com Bloqueadores de canais de K⁺



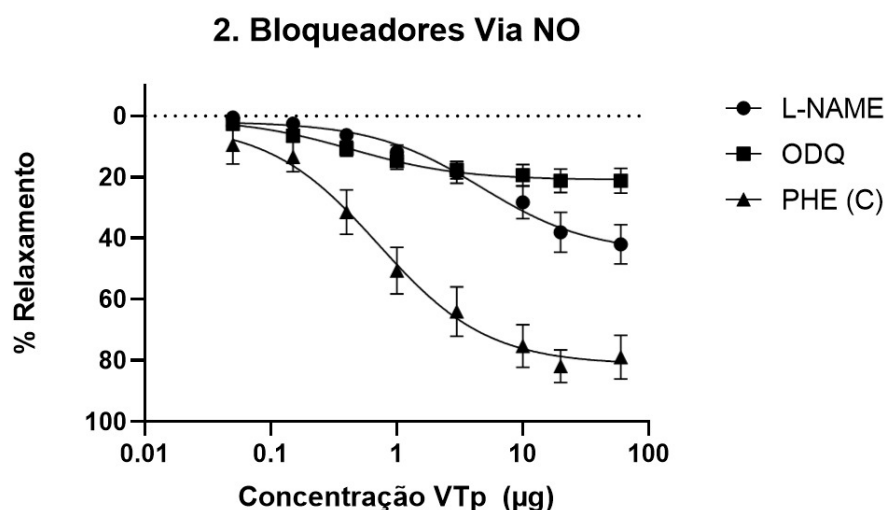
Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

6.2.4 Potencial vasorelaxante do VTp em anéis de aorta isolado pré-contráidas com PHE incubados com bloqueadores via óxido nítrico NO: L-NAME, ODQ

Foram obtidos resultados que refletem o efeito bloqueador significativo de VTp pré-incubado com L-NAME na presença de endotélio quando comparado com o controle ($p=0,010$) e de o grupo ODQ quando comparado com o controle ($p=0,0037$), o que permite comprovar que a vasodilatação induzida pelo veneno de *Tityus pachyurus* depende da ativação da via do óxido nítrico (NO/sGC/GMPc).

O grupo L-NAME apresentou um porcentagem de vasodilatação médio de $(18,50 \pm 5,674)$, sendo semelhante com o grupo de ODQ $(14,26 \pm 2,485)$. No entanto, os resultados diferiram quando comparados com a IC₅₀, o veneno causa vasodilatação para os grupos L-NAME e ODQ a partir de 4,66 e 0,43 µg respectivamente. Este achado permite elucidar que o VTp estimula a produção de NO no endotélio, como também ativa a sGC nas células do músculo liso, levando à produção de GMPc.

Figura 16. Efeito vasorelaxante do VTp em curvas cumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente incubados com Bloqueadores de NO.



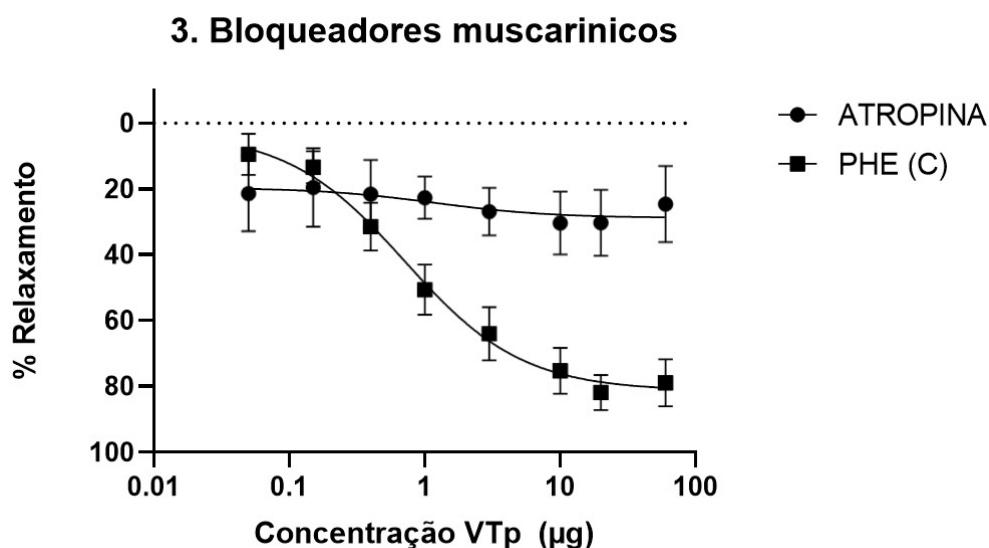
Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

6.2.5 Efeito vasorelaxante de VTp em anéis pre-contraindidos com PHE preincubados com bloqueadores muscarínicos: ATROPINA (ATR)

Foram obtidos resultados que refletem o efeito bloqueador significativo nos anéis incubados com ATR quando comparado com o controle ($p = 0,0264$), os resultados indicam que a ação de VTp ativa os receptores muscarínicos endoteliais direta ou indiretamente, promovendo a liberação de NO e induzindo vasodilatação.

O grupo ATR apresentou um porcentagem de vasodilatação médio de $(24,67 \pm 1,465)$, comparado com o grupo controle $(50,65 \pm 10,36)$. O veneno causa vasodilatação para o grupo ATR a partir de $1,18 \mu\text{g}$.

Figura 17. Efeito do VTp em curvas acumulativas de concentração-resposta em anéis aórticos de rato com endotélio presente incubados com Bloqueadores de MUS.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Apresenta-se as seguintes tabelas para comparação dos diferentes efeitos do veneno, com o resumo de: 1) Vasodilatação Média, Erro Padrão da Média e EC50; 2) P-valor e IC 95%

Tabela 6. Resumo de valores de Vasodilatação Média, Erro Padrão da Média e EC50 dos experimentos de anéis aórticos realizados.

Substância	Vasodilatação Média (%)	Erro Padrão da Média (%)	EC50 (µg)
PHE E+	50,65	± 10,36	0.714
PHE E-	23,55	± 5,092	0.970
Veículo	15,25	± 1,560	0.439
KCL E+	26,84	± 4,492	0.502
KCL E-	16,10	± 3,644	1.151
TEA	25,25	± 4,639	0.311
4AP	20,42	± 4,823	2.521
4AP+TEA	10,01	± 3,493	1.648
GLIB	46,27	± 8,142	0.306
L-NAME	18,50	± 5,674	4.667
ODQ	14,26	± 2,485	0.436
ATR	24,67	±1,465	1.185

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Tabela 7.Resumo do P-valor e IC 95% dos experimentos de anéis aórticos realizados.

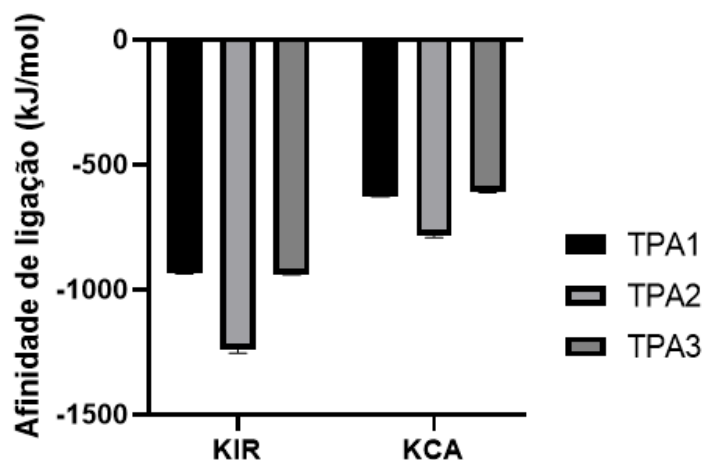
Grupo	P-valor	IC 95%
PHE E+ vs. PHE E-	0,0250	(3,12; 51,08)
PHE E+ vs. Veículo	0,0035	(11,43; 59,38)
PHE E- vs. Veículo	0,6628	(-15,67;32,28)
KCI E+ vs. KCI E-	0,0954	(-1,593; 23,07)
KCI E+ vs. Veículo	0,0679	(-0,7410; 23,92)
KCI E- vs. Veículo	0,9834	(-11,48; 13,18)
TEA vs. 4AP	0,9866	(-22,79; 32,44)
TEA vs. GLIB	0,2076	(-48,64; 6,592)
TEA vs. 4AP+TEA	0,5160	(-12,38; 42,85)
TEA vs. PHE (C)	0,0838	(-53,02; 2,211)
4AP vs. GLIB	0,0758	(-53,46; 1,768)
4AP vs. 4AP+TEA	0,8136	(-17,21; 38,03)
4AP vs. PHE (C)	0,0261	(-57,84; -2,612)
GLIB vs. 4AP+TEA	0,0051	(8,641; 63,87)
GLIB vs. PHE (C)	0,9907	(-32,00; 23,24)
4AP+TEA vs. PHE (C)	0,0014	(-68,25; -13,02)
L-NAME vs PHE (C)	0,0100	(-57,00; -7,305)
ODQ vs PHE (C)	0,0037	(-61,24; -11,54)
ATR vs PHE (C)	0,0264	(3,531; 48,43)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

6.3 Avaliação *In silico* de toxinas do veneno *Tityus pachyurus*

A Figura 18 apresenta os resultados de uma análise de docking molecular cego entre diferentes peptídeos (TPA1, TPA2 e TPA3) e duas proteínas (KIR e KCA), com as afinidades de ligação quantificadas em kJ/mol. Observando os dados, notamos que para a proteína KIR, o peptídeo TPA2 apresenta a maior afinidade de ligação, com um valor médio de $1233,4 \pm 14,2$ kJ/mol, indicando uma maior variabilidade nas interações. Em seguida, o peptídeo TPA1 demonstra uma afinidade média de $930,5 \pm 4,1$ kJ/mol, sugerindo uma interação relativamente estável. O peptídeo TPA3 exibe uma afinidade de $940 \pm 1,7$ kJ/mol, indicando uma interação ainda mais estável e com menor variabilidade.

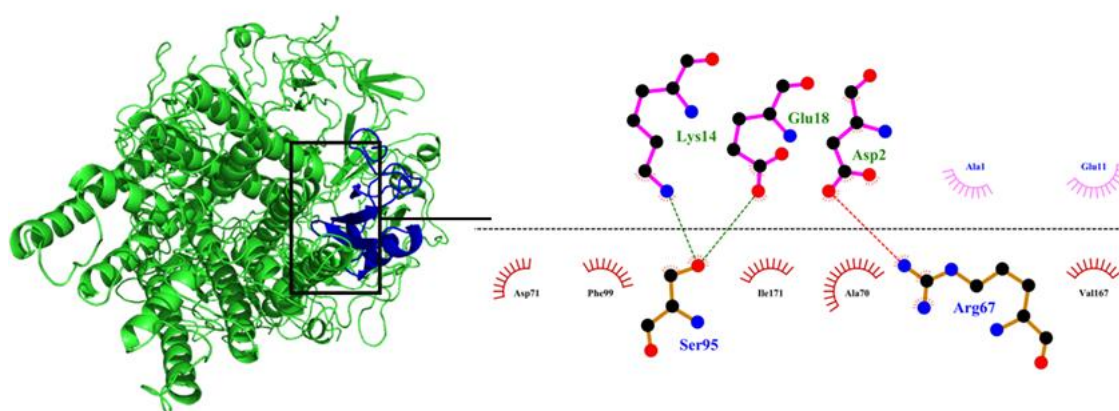
Figura 18. Gráfico de afinidade de ligação (kJ/mol) de três peptídeos (TPA1, TPA2 e TPA3) com as proteínas KIR e KCA



Para a proteína KCA, as afinidades de ligação são consideravelmente mais baixas em comparação com KIR. O peptídeo TPA2 mantém a maior afinidade, com um valor médio de $781,1 \pm 6,9$ kJ/mol, refletindo uma interação relativamente consistente. O TPA3 apresenta uma afinidade de $608,5 \pm 2,5$ kJ/mol, enquanto o TPA1 exibe uma afinidade de $625,7 \pm 2,4$ kJ/mol, ambos indicando interações com menor variabilidade e estabilidade relativamente alta.

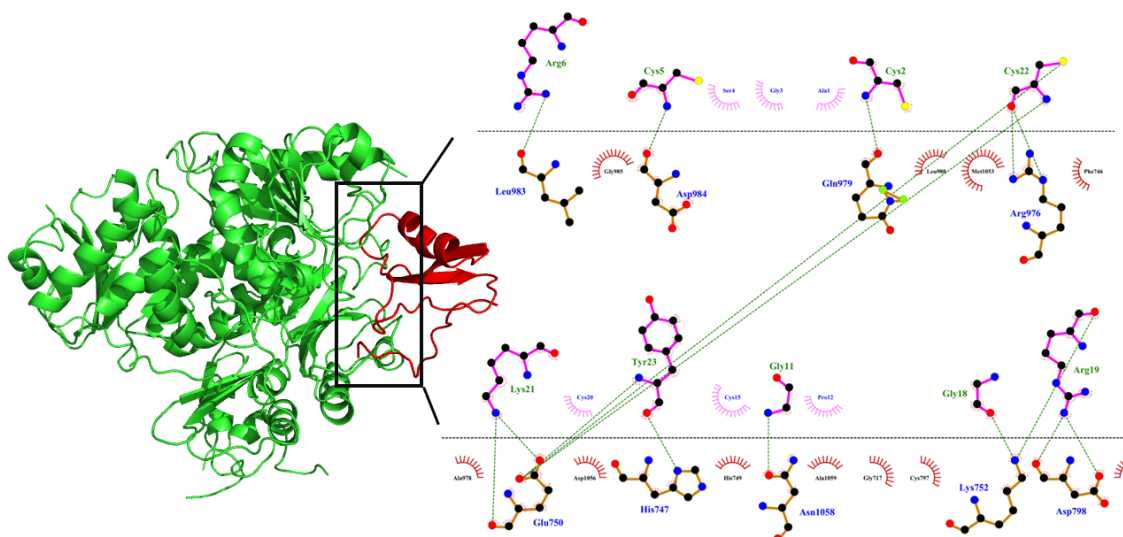
A maior afinidade de TPA2 com ambas as proteínas sugere que este peptídeo possui características estruturais favoráveis para a interação, sendo um candidato promissor para estudos futuros.

Figura 19. Representação das interações moleculares entre o peptídeo TPA2 e a proteína KIR



Na figura 19, o peptídeo TPA2 interage com a proteína KIR. Observa-se a formação de várias ligações de hidrogênio, que desempenham um papel importante na estabilização da interação entre o peptídeo e a proteína. Os resíduos Lys14, Glu18 e Asp2 no peptídeo TPA2 estabelecem ligações de hidrogênio com a proteína, contribuindo para a afinidade de ligação. Além disso, são observadas interações hidrofóbicas com resíduos como Phe99, Ile171 e Ala70, o que indica que as regiões hidrofóbicas da superfície de ligação também contribuem para a estabilidade da interação. A presença de resíduos como Arg67 sugere que interações eletrostáticas podem complementar as ligações de hidrogênio e hidrofóbicas, reforçando a ligação do peptídeo à superfície de KIR.

Figura 20. Interações moleculares entre o peptídeo TPA2 e a proteína KCA



Na figura 20, o peptídeo TPA2 interage com a proteína KCA, mostrando um padrão de interação diferente. Resíduos como Cys5, Asp984, e Arg6 formam ligações de hidrogênio com a proteína, proporcionando uma base para a afinidade de ligação. Além disso, outros resíduos, como Gln979 e Arg976, também estão envolvidos em ligações de hidrogênio, contribuindo para a estabilidade da interação. Diferente da interação com KIR, a ligação com KCA envolve mais interações entre resíduos polares e menos interações hidrofóbicas, como indicado pela participação de resíduos polares como Lys21 e Glu750. Esta diferença sugere que a natureza da superfície de KCA favorece interações eletrostáticas e polares.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação *In vivo* do veneno *Tityus pachyurus* HET-CAM para o ensaio de toxicidade aguda devem-se levar em consideração porque

na literatura os estudos foram realizados majoritariamente com venenos de serpentes e até o momento não foram registrados estudos com venenos de escorpiões. Os resultados podem variar devido a que os venenos de algumas cobras, como a *Bothrops*, têm efeito hemorrágico (De Roodt et al., 2005), o que pode resultar em um efeito fortemente irritante nos vasos sanguíneos dos ovos. Embora os resultados do índice de irritação em ovos sejam de irritação leve, isso não significa que o VTp não seja um veneno capaz de causar danos graves ao sistema vascular.

O valor do IS de VTp difere dos efeitos observados com venenos botrópicos, como os de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops erythromelas*, que apresentaram Índices de Irritabilidade significativamente mais elevados, associados a danos extensos na membrana corioalantóica, incluindo hemorragias abundantes, coagulação intravascular e lise capilar (Frota de Lima, 2022). Estes efeitos exacerbados são coerentes com o potencial hemorrágico de muitos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, e é plausível que esse mecanismo esteja diretamente relacionado aos resultados relatados por Lima (2022), considerando que esses venenos possuem metaloproteínases e outras enzimas pró-hemorrágicas bem caracterizadas. Este modelo experimental é amplamente reconhecido como uma alternativa ética e eficaz para avaliar a toxicidade local de substâncias sem a necessidade de uso de mamíferos em experimentação animal, baseando-se principalmente na observação de hemorragia, coagulação e lise vascular na membrana corioalantóica de ovos embrionados de galinha.

No comportamento Vasomotor inicial, na análise gráfica das imagens por meio do software GIMP, as respostas se alinham com achados já descritos na literatura para venenos de escorpiões do gênero *Tityus*, particularmente no que se refere à ação de peptídeos vasoativos. Rocha-Resende et al. (2016), por exemplo, demonstraram que peptídeos derivados do veneno de *Tityus serrulatus*, como Ts10 e Ts31-14[C12S], promovem vasodilatação endotelial dependente de NO, sem induzir danos vasculares diretos. De modo semelhante, Verano-Braga et al. (2008) descreveram que os *Tityus Hypotensins*, ainda que não inibam a enzima conversora de angiotensina (ECA), aumentam a perfusão vascular por vias NO-dependentes, induzindo relaxamento da musculatura lisa.

Além disso, esses achados são coerentes com resultados obtidos previamente em estudos com anéis de aorta e preparações *Ex vivo*, como os descritos por Machado et al. (2015), que observaram vasorelaxamento endotelial dependente de NO promovido por peptídeos do veneno de *Tityus stigmurus*. A presença de uma irritação leve do veneno no modelo HET-CAM, portanto, reforça a hipótese de que *T. pachyurus* apresenta uma composição com potencial vasoativo funcional, o que pode torná-lo interessante para investigação farmacológica futura, especialmente em estudos sobre regulação do tônus vascular ou desenvolvimento de agentes anti-hipertensivos derivados de toxinas. Entretanto, cabe ressaltar que o HET-CAM poderia começar a ser utilizado como primeira abordagem para a ação de um veneno no tônus vascular, quando seu mecanismo vascular ainda não é

conhecido, como ocorreu no caso do VTp, com os resultados obtidos do HET-CAM, a reatividade vascular foi introduzida uma vez conhecido seu efeito vasodilatador.

No teste da avaliação *In vitro* do veneno *Tityus pachyurus* com anéis de aorta, observa-se que, o veneno de *Tityus pachyurus* (VTp) possui uma ação vasodilatadora significativa em anéis de aorta em condições de pré-contração com fenilefrina (PHE, 1 μ M). Isso acontece porque o VTp pode induzir a liberação de Óxido Nítrico (NO). A ação da PHE, além de ter efeito vasoconstritor mediado pela ativação de receptores alfa adrenérgicos, também possui capacidade redox (atuando como agente redutor) (Renata Galvão de Lima., 2014). Alguns peptídeos VTp bloqueiam canais de K⁺. O TPA1, um peptídeo que reconhece canais de K⁺, tem uma sequência muito semelhante à do OsK2 de *T. cambridgei* com uma variação na posição 12 (Barona et al., 2006), o que significa que o TPA1 não parece estabelecer contatos importantes com o canal de potássio dependente de voltagem Kv1.1, como o TC1 faz (Liu & Lin, 2004).

No teste com anéis de aorta de rato, observou-se que, o veneno de *Tityus pachyurus* (VTp) possui uma ação vasorrelaxante significativa em anéis de aorta de rato. Esses achados reforçam a hipótese de que o VTp atua por mecanismos mediados pelo endotélio, estimulando a liberação de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). A diferença de até 27,10% no grau de relaxamento entre os grupos com e sem endotélio, no contexto de PHE, destaca o papel central do endotélio na mediação da resposta vasodilatadora. Além disso, a ausência de resposta significativa na ausência do endotélio sugere que o veneno não exerce ação direta sobre o músculo liso vascular, mas sim por meio de substâncias produzidas e secretadas pelas células endoteliais. A fenilefrina, um agonista α_1 -adrenérgico, induz contração ao ativar receptores específicos do músculo liso vascular. Contudo, na presença do VTp, observou-se um efeito vasorrelaxante robusto, o que indica que o veneno contrabalança a ação vasoconstritora da PHE. Isso muito provavelmente ocorre por meio da ativação do endotélio e subsequente liberação de NO, que neutraliza a contração induzida por PHE (Alessandri-Haber et al., 1999).

Estudos prévios corroboram esse mecanismo. No artigo de Beltrán-Vidal et al. (2021), foi descrita uma toxina γ -KTx isolada de *Centruroides margaritatus* com potente ação bloqueadora sobre o canal hERG1, o qual regula a repolarização cardíaca. De modo semelhante, de Roodt et al. (2003) identificaram toxinas de *Tityus trivittatus* que atuam sobre canais de potássio do tipo Shaker, promovendo arritmias e hipertensão. Essas evidências são complementadas por (Rasmusson et al., 1998), que demonstraram o papel de subunidades β na modulação da inativação de canais Kv1.4, afetando diretamente a excitabilidade e a função cardiovascular.

Os resultados obtidos com a utilização de cloreto de potássio (KCl) 60 mM em anéis aórticos de ratos demonstram efeitos distintos na vasodilatação, dependendo da integridade do endotélio. Anéis com endotélio apresentaram um

percentual de relaxamento significativamente maior (26,84%) quando comparados aos anéis sem endotélio (16,10%) e ao grupo controle (7,154%).

Estes dados sugerem que a presença do endotélio é um fator crucial para a modulação da resposta relaxante frente à despolarização induzida pelo KCl, já que a função do KCl é produzir uma contração sustentada na membrana das células musculares lisas vasculares, (Wang et al., 1994). Em anéis com endotélio íntegro, a liberação de fatores vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) pode contrabalançar esse efeito, resultando em maior capacidade de relaxamento. Por outro lado, a remoção do endotélio elimina essa via de sinalização, intensificando o efeito contrátil do KCl.

Além disso, é importante considerar que em situações onde há exposição a toxinas escorpiônicas, como as presentes no veneno de *Tityus serrulatus* ou *Buthus martensii*, a vasodilatação pode ser ainda mais comprometida. Tais toxinas são conhecidas por bloquear canais de potássio, prolongando o estado despolarizado e aumentando o influxo de cálcio, o que favorece o tônus contrátil (Quintero-Hernández et al., 2013; Tytgat et al., 1999; Srinivasan et al., 2002). Esses efeitos são potencializados na ausência de endotélio, pois não há compensação endotelial suficiente para neutralizar o estímulo contrátil promovido tanto pelo KCl quanto pelas toxinas.

Além disso, os mecanismos mediados por receptores adrenérgicos também podem estar implicados, como demonstrado por Wang et al. (1994), que observaram aumento da contratilidade arterial e da pressão arterial após administração de veneno de escorpião, efeito este mediado por receptores α_1 -adrenérgicos. Tais interações podem contribuir para a redução da vasodilatação, especialmente em condições de despolarização sustentada.

Entre os mecanismos endoteliais investigados, destaca-se a via do óxido nítrico (NO) como principal mediadora da vasodilatação induzida pelo veneno. O bloqueio da síntese de NO pela L-NAME ($p = 0,0100$) e da guanilato ciclase solúvel por ODC (p = 0,0037), reduziu significativamente a resposta vasodilatadora, evidenciando que a cascata NO–cGMP é essencial para a atividade do veneno. Esta via envolve a ativação da NO sintase endotelial (eNOS), produção e difusão de NO para o músculo liso, ativação da guanilato ciclase solúvel, aumento de GMPc e ativação da proteína quinase G (PKG), culminando na diminuição da concentração de cálcio intracelular e relaxamento vascular.

Esses resultados são consistentes com estudos de Rocha-Resende et al. (2016) e Verano-Braga et al., (2008), que relataram ação vasodilatadora de peptídeos derivados do veneno de *Tityus serrulatus*, como Ts10, Ts3(1–14) e TsHpt-I, todos atuando por mecanismos dependentes de NO, sem inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). De forma semelhante, Machado et al. (2015) descreveram a identificação de uma hipotensina em *Tityus stigmurus* com potente efeito vasodilatador endotelial, também dependente da via do NO, e com

atividade potencializadora da bradicinina, o que pode estar presente de forma análoga no veneno de *T. pachyurus*.

Para o grupo dos bloqueadores de potássio: TEA (bloqueadores não específicos de canais de K^+), 4AP (bloqueador seletivo de dois canais de K^+ operados por voltagem KV) e GLIBENCLAMIDA (bloqueador de canais de K^+ sensível ao ATP), e a mistura de 4AP+TEA, os resultados apontam para um importante papel desses canais na mediação da vasodilatação induzida pelo veneno de *Tityus pachyurus*. A análise comparativa entre os grupos experimentais revelou diferenças estatisticamente significativas que permitem inferir sobre os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na resposta vascular frente ao veneno escorpiônico.

A incubação dos anéis aórticos com TEA resultou em uma redução significativa da resposta relaxante (25,25%), sugerindo que os canais de K^+ desempenham papel crucial na vasodilatação induzida pelo veneno. Essa observação é compatível com dados da literatura, que indicam que os canais de potássio são fundamentais para a hiperpolarização da membrana e consequente fechamento dos canais de cálcio voltagem-dependentes, levando à redução do influxo de Ca^{2+} e ao relaxamento muscular (Srinivasan et al., 2002; Salkoff et al., 2005).

Quando se comparou o grupo tratado com glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de K^+ sensíveis ao ATP, observou-se um aumento expressivo na vasodilatador (46,27%), com uma diferença de 21,02% em relação ao grupo tratado com TEA ($p < 0,05$). Este dado indica que os canais de K^+ sensíveis ao ATP não são os principais alvos do veneno, uma vez que seu bloqueio não reduziu, mas sim potencializou a resposta relaxante. Isso sugere que o veneno pode não agir diretamente sobre esses canais, ou que o bloqueio destes desencadeie mecanismos compensatórios de vasodilatação mediados por outros tipos de canais de potássio, como os BK (canais de potássio ativados por cálcio), cujos efeitos são modulados de maneira distinta (Quintero-Hernández et al., 2013; Tytgat et al., 1999).

Além disso, a comparação entre os grupos tratados com 4-aminopiridina (4AP), um bloqueador seletivo de canais de K^+ dependentes de voltagem (Kv), e glibenclamida revelou uma diferença altamente significativa ($p < 0,01$), com percentual de relaxamento de 20,42% para 4AP e 46,27% para glibenclamida. Este achado indica que a vasodilatação é consideravelmente inibida quando os canais K_v são bloqueados, o que reforça a hipótese de que o veneno de *Tityus pachyurus* pode interagir funcionalmente com esses canais, favorecendo a hiperpolarização e o subsequente relaxamento vascular (Srinivasan et al., 2002).

Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com TEA e 4AP ($p = 0,9591$), ambos apresentando níveis similares de vasodilatação reduzida (25,25% e 20,42%, respectivamente). Esse resultado

evidencia que tanto os canais de potássio bloqueados por TEA quanto os Kv bloqueados por 4AP são relevantes na mediação do efeito relaxante do veneno, o que sugere uma atuação conjunta ou sobrepostos desses canais na fisiologia vascular afetada pela toxina.

A atuação de toxinas escorpiônicas sobre canais iônicos, especialmente os de potássio, está bem documentada. Em especial, toxinas como as KTxs podem agir como bloqueadoras de canais K_v , reduzindo a saída de potássio e, com isso, prolongando o estado de despolarização e favorecendo a contração muscular (Quintero-Hernández et al., 2013; Tytgat et al., 1999). No entanto, a resposta de vasodilatação observada nos anéis tratados com veneno e bloqueadores indica que, no caso de *T. pachyurus*, a toxina pode exercer efeito contrário, o qual é revertido quando tais canais são farmacologicamente bloqueados.

Além da via do óxido nítrico, o envolvimento dos receptores muscarínicos na resposta ao veneno foi evidenciado pela significativa redução da vasodilatação observada com o uso de atropina ($p = 0,0264$), um antagonista muscarínico de amplo espectro. A atropina atua bloqueando todos os subtipos de receptores muscarínicos (M1–M5), sendo particularmente eficaz contra o subtipo M3. Os receptores muscarínicos tipo M3 são os principais responsáveis por mediar o aumento do cálcio intracelular em células endoteliais, o qual ativa a eNOS e desencadeia a produção de NO.

A inibição da resposta ao veneno por atropina, indica que a ativação de receptores muscarínicos é um evento importante na cascata vasodilatadora. Essa ativação parece ser essencial para o acionamento subsequente da via NO–cGMP. Esses achados são compatíveis com os resultados de Rocha-Resende et al. (2016), que demonstraram que os peptídeos Ts10 e Ts3(1–14) do veneno de *T. serrulatus* induzem vasodilatação dependente de receptores muscarínicos, sendo que Ts31-14[C12S] atua por meio de M2 e M3, enquanto Ts10 depende apenas de M2.

O bloqueio muscarínico por atropina reforça a ideia de que o veneno de *T. pachyurus* atua de forma semelhante aos peptídeos bioativos identificados em outras espécies do gênero, com ação iniciada na ativação colinérgica endotelial e consequente liberação de NO. A identificação de compostos com essa propriedade em *T. pachyurus* é relevante, pois destaca a possibilidade de existência de criptídeos miméticos da muscarina ou potencializadores da bradicinina no veneno, como hipotensinas ou análogos funcionais.

A interação entre peptídeos derivados de toxinas escorpiônicas e canais iônicos simulada mediante o docking molecular tem se mostrado uma abordagem promissora tanto na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do escorpionismo quanto na prospecção de novas moléculas bioativas com potencial terapêutico. Neste estudo, foi possível observar que o peptídeo TPA2 apresentou as maiores afinidades de ligação com os canais de potássio do tipo KIR e KCa, conforme análise realizada com a ferramenta ClusPro 2.0 (Kozakov et al., 2013; Comeau et al., 2004). Com valores médios de afinidade de $1233,4 \pm 14,2$ kJ/mol

para KIR e $781,1 \pm 6,9$ kJ/mol para KCa, TPA2 destacou-se como o peptídeo com maior potencial de interação e estabilidade conformacional nas regiões ativas dos canais.

Estudos prévios demonstraram que escorpiões do gênero *Tityus*, como *Tityus pachyurus* e *Tityus macrochirus*, produzem peptídeos com atividade significativa sobre canais de sódio e potássio, sendo estes últimos de particular interesse no controle do tônus vascular e excitabilidade celular (Guerrero-Vargas, 2012; Andrade, 2022). A caracterização tridimensional dos peptídeos TPA1, TPA2 e TPA3 utilizando o servidor PEP-FOLD 4.0 permitiu prever conformações favoráveis ao acoplamento com os canais, revelando interações moleculares estáveis, mediadas por ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas com resíduos conservados nas superfícies dos canais KIR e KCa (Thevenet et al., 2012).

Corroborando com esses achados, o trabalho de Barek et al. (2003) com a toxina Pi4, isolada de *Pandinus imperator*, demonstrou que toxinas escorpiônicas de pequeno porte, estruturadas por pontes dissulfeto e pertencentes à subfamília α KTX, são capazes de inibir canais Kv1.2 com altíssima afinidade (IC50 na faixa de picomolar). Essa especificidade e potência são atribuídas a interações críticas com resíduos funcionais como Arg10, Lys26 e Tyr35, semelhantes às interações observadas para o TPA2 com resíduos carregados nas superfícies dos canais modelados no presente estudo.

Em quanto aos resultados *In silico* das toxinas do veneno *Tichyus pachyurus*, do ponto de vista metodológico, destaca-se que os estudos de docking molecular são sensíveis à acurácia das estruturas utilizadas e ao critério interpretativo do pesquisador, como relatado por Ballón e Grados (2019). A variação no estado de protonação dos resíduos, a presença de moléculas de água e a flexibilidade das cadeias laterais são fatores que influenciam fortemente a energia de interação prevista, o que justifica a integração de análises energéticas com representações gráficas das interações, como feito neste trabalho com o uso do LigPlot+ (Laskowski; Swindells, 2011).

Além disso, o estudo realizado por Andrade (2022) sobre o peptídeo Tma1, oriundo de *Tityus macrochirus*, reforça a aplicabilidade do acoplamento molecular na predição de interações com proteínas da família Bcl-2, com potencial atividade antitumoral por indução de apoptose. Esses dados sugerem que, além da atuação neurotóxica clássica, os peptídeos escorpiônicos também podem modular vias intracelulares envolvidas na morte celular programada.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados demonstram que o peptídeo TPA2 possui elevado potencial de interação com canais K⁺, especialmente com o canal KIR, sugerindo uma atuação relevante sobre a excitabilidade e regulação do potencial de membrana em tecidos excitáveis. A diversidade estrutural e funcional das toxinas escorpiônicas, aliada ao avanço das ferramentas de bioinformática estrutural, como a modelagem e o docking molecular, abre caminho para o

desenvolvimento racional de peptídeos terapêuticos com alvos bem definidos, como canais iônicos, receptores e proteínas reguladoras intracelulares.

8. CONCLUSÕES

O veneno de *Tityus pachyurus* induz vasodilatação significativa somente na presença de endotélio funcional, o que indica que sua ação requer a integridade da camada endotelial para exercer efeito sobre o tônus vascular.

A vasodilatação é mediada predominantemente pela via clássica do óxido nítrico (NO). A inibição da NOS (com L-NAME) e da guanilato ciclase solúvel (com ODQ) reduziu de forma significativa o efeito do veneno, comprovando a dependência da cascata NO–cGMP.

A redução da vasodilatação após tratamento com Atropina sugere que o veneno ativa receptores muscarínicos (mAChRs) endoteliais, possivelmente M2 e M3, desencadeando a liberação de NO.

A inibição do efeito do veneno por 4AP e pela combinação 4AP+TEA revela a participação de canais de potássio voltagem-dependentes (Kv) na modulação do tônus vascular. Os canais KATP, por outro lado, não estão envolvidos, como mostrado pela ausência de efeito da Glibenclamida.

O HET-CAM poderia começar a ser utilizado como primeira abordagem para a ação de um veneno no tônus vascular, quando seu mecanismo vascular ainda não é conhecido.

9. BIBLIOGRAFIA

ABROUG, Fekri et al. Scorpion-related cardiomyopathy: clinical characteristics, pathophysiology, and treatment. **Clinical toxicology**, v. 53, n. 6, p. 511-518, 2015.

ALESSANDRI-HABER, Nicole et al. Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3: clues to design analogs with enhanced selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 50, p. 35653-35661, 1999.

AMARAL, Carlos Faria Santos; DE REZENDE, Nilton Alves; FREIRE-MAIA, Lineu. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **The American journal of cardiology**, v. 71, n. 2, p. 242-245, 1993.

ARISTIZABAL OCAMPO, D. et al. Hipertensión arterial sistémica. **Pediatrica Integral**, [S.l.], v. 25, n. 8, p. 426.e1–426.e14, 2021.

BALLÓN PAUCARA, Wendy Guadalupe; GRADOS TORREZ, Ricardo Enrique. Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. **Conciencia (La Paz)**, p. 55-72, 2019.

BAREK, Sarrah et al. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels. **European journal of biochemistry**, v. 270, n. 17, p. 3583-3592, 2003.

BARONA, Jacqueline et al. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺-and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 1, p. 76-84, 2006.

BELTRÁN-VIDAL, José et al. Colombian scorpion *Centruroides margaritatus*: Purification and characterization of a gamma potassium toxin with full-block activity on the hERG1 channel. **Toxins**, v. 13, n. 6, p. 407, 2021.

BERTANI, R. **ESCORPIÕES DO BRASIL**. Disponível em:
<https://ecoevo.com.br/publicacoes/pesquisadores/rogerio_bertani/pdf%20escorpioes%20do%20brasil%2030_06_2023.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2025.

BONAVENTURA, Daniella et al. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁺ channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **Life sciences**, v. 89, n. 17-18, p. 595-602, 2011.

BORGES, Adolfo et al. Scorpionism in Ecuador: First report of severe and fatal envenoming cases from northern Manabí by *Tityus asthenes* Pocock. **Toxicon**, v. 105, p. 56-61, 2015.

BORGES, Adolfo et al. El Accidente por Escorpiones Tóxicos en el Paraguay: Mito y Realidad en el contexto de la Emergencia por Escorpionismo en el Sudeste de la América del Sur. **Revista de la Sociedad Científica del Paraguay**, v. 24, n. 1, p.

27-35, 2019.

BORGES, Adolfo; ROMÁN, Juan P. Case report: Fatal scorpion envenomation in a Shuar child by *Tityus cisandinus* from Amazonian Ecuador: A call for specific antivenom availability in the Amazon Basin. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 4, p. 807, 2023.

BOUAZIZ, Mounir et al. Epidemiological, clinical characteristics and outcome of severe scorpion envenomation in South Tunisia: multivariate analysis of 951 cases. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 918-926, 2008.

BRAZIL, Tania Kobler; PORTO, Tiago Jordão. **Os escorpiões**. Edufba, 2010.

CAPÓ MARTÍ, Miguel Andrés. **Toxinología clínica, alimentaria y ambiental**. Editorial Complutense, 2007.

CESARETLI, Yildirim; OZKAN, Ozcan. Picadas de escorpião na Turquia: aspectos epidemiológicos e clínicos entre os anos de 1995 e 2004. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 4, p. 215-220, 2010.

CHIARIELLO, Thiago M. et al. Optimizing Scorpion Venom Extraction for Antivenom Production (Video)| JoVE. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 200, p. e65737, 2023.

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

COMEAU, Stephen R. et al. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 45-50, 2004.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DE ROODT, Adolfo Rafael. Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 49, n. 1, p. 55-71,

2015.

DE SOUSA, Leonardo et al. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en ratones C57BL/6. **SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente**, v. 21, n. 1, p. 47-59, 2009.

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

ELATROUS, Souheil et al. Study of severe scorpion envenoming following subcutaneous venom injection into dogs: hemodynamic and concentration/effect analysis. **Toxicon**, v. 104, p. 1-6, 2015.

ERICSSON, Charles D. et al. Medically important venomous animals: biology, prevention, first aid, and clinical management. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. 10, p. 1309-1317, 2006.

ESTAÑOL, Bruno et al. Control neural de la circulación periférica y de la presión arterial. **Archivos de cardiología de México**, v. 79, p. 109-116, 2009.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, Jesus A. et al. **Fisiología humana**. 5. ed. Madrid: McGraw-Hill Education, 2020.

FERREIRA, Sergio H.; BARTELT, Diana C.; GREENE, Lewis J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.

LIMA, Daniel Frota de. **Inibição dos efeitos locais de venenos botrópicos com agentes antioxidantes na membrana corioalantóica de galinhas (HETCAM)**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará. 2022.

GARCIA, Maria L.; HANNER, Markus; KACZOROWSKI, Gregory J. Scorpion toxins: tools for studying K⁺ channels. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1641-1650, 1998.

GOLDSTEIN, Steve AN et al. International Union of Pharmacology. LV.

Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 527-540, 2005.

GÓMEZ, Juan P. et al. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. **Biomédica**, v. 30, n. 1, p. 126-139, 2010.

GÓMEZ JP, Gómez C, Gómez ML. Sueros antiofídicos en Colombia: análisis de la producción, abastecimiento y recomendaciones para el mejoramiento de la red de producción. Revista **Biosalud** 2017; 16(2): 96-116.

GONZÁLEZ, Carlos et al. K⁺ channels: function-structural overview. **Comprehensive physiology**, v. 2, n. 3, p. 2087-2149, 2012.

GOUDET, Cyril; CHI, Cheng-Wu; TYTGAT, Jan. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1239-1258, 2002.

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.

GUERRERO-VARGAS, Jimmy Alexander et al. Scorpionism and dangerous species of Colombia. **Scorpion Venom**, v. 4, p. 245-72, 2015.

GUTMAN, George A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E.; MORENO, Ma José. **Tratado de fisiología médica**. México: Interamericana, 1994.

HUANG, Xi; JAN, Lily Yeh. Targeting potassium channels in cancer. **Journal of Cell Biology**, v. 206, n. 2, p. 151-162, 2014.

ISBISTER, Geoffrey K.; BAWASKAR, Himmatrao Saluba. Scorpion envenomation. **New England journal of medicine**, v. 371, n. 5, p. 457-463, 2014.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**, v. 33, n. 7, p. 825-858, 1995.

KHANNA, Vivek et al. Vasomodulatory effect of novel peroxovanadate compounds on rat aorta: role of rho kinase and nitric oxide/cGMP pathway. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 3, p. 274-282, 2011.

KHATTABI, Asmae et al. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 7, p. 364-369, 2011.

KOZAKOV, Dima et al. How good is automated protein docking?. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 81, n. 12, p. 2159-2166, 2013.

KUBO, Yoshihiro et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 509-526, 2005.

LASKOWSKI, Roman et al. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.

LOIDI-CASTILLO, Amaya; GIL GARCÍA, Julio. **Estudio de los vasos extraembrionarios en el embrión de pollo (Gallus gallus domesticus)**. Dissertação (Mestrado em Saúde Global: Integração a Saúde Ambiental, Humana e Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade de Zaragoza, Zaragoza, 2012.

LOURENÇO, Wilson R.; YTHIER, Eric. The remarkable scorpion diversity in the Ecuadorian Andes and description of a new species of Tityus CL Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). **ZooKeys**, n. 307, p. 1, 2013.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6-7, p. 495-496, 1986.

MIRANDA, François; ROCHAT, Hervé; LISSITZKY, Serge. Sur les neurotoxines de deux especes de scorpions nord-africains. II—Proprietes des neurotoxines (Scorpamines) d'Androctonus australis (L.) et de Buthus occitanus (Am.). **Toxicon**,

v. 2, n. 2, p. 113-121, 1964.

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

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

MOULTON, G. et al. Phylogenomic analysis and evolution of the potassium channel gene family. **Receptors and Channels**, v. 9, n. 6, p. 363-377, 2003.

MÜLLER, G. J. Scorpionism in South Africa: a report of 42 serious scorpion envenomations. **South African Medical Journal**, v. 83, n. 6, p. 405-411, 1993.

OMAR, H. E. D. M. The biological and medical significance of poisonous animals. **J Biol Earth Sci**, v. 3, n. 1, p. M25-M41, 2013.

OTERO, R. et al. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 12, p. 742-750, 2004.

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

RASMUSSEN, Randall L. et al. Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. **Circulation research**, v. 82, n. 7, p. 739-750, 1998.

RENNA, Nicolas Federico; MIATELLO, Roberto Miguel. Fisiología del músculo liso vascular. In: GÓMEZ LLAMBÍ, H.; PISKORZ, D. **Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica**. Buenos Aires: Inter-Médica, p. 172–175, 2013.

ROMERO-IMBACHI, Margarita Rosa et al. *Centruroides margaritatus* scorpion complete venom exerts cardiovascular effects through alpha-1 adrenergic receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 240, p. 108939, 2021.

SALKOFF, Lawrence B. et al. Potassium channels in *C. elegans*. **WormBook**. p. 1-15, 2005. https://digitalcommons.wustl.edu/open_access_pubs/3481

SANTOS, Maria SV et al. Clinical and epidemiological aspects of scorpionism in the world: a systematic review. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 27, n. 4, p. 504-518, 2016.

SEGURA, Ignacio A.G.d. Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. In: TUR MARÍ, Josep Antoni; MARTÍN, Jesús; ORELLANA MURIANA, José María. **Ciencia y tecnología del animal de laboratorio**, Vol. 2. ISBN 978-84-8138-785-8, p. 97-128, 2013.

SOFER, Shaul. Scorpion envenomation. **Intensive care medicine**, v. 21, p. 626-628, 1995.

THEVENET, Pierre et al. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W288-W293, 2012.

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

UTKIN, Yuri N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. **World journal of biological chemistry**, v. 6, n. 2, p. 28, 2015.

VATANPOUR, H.; ROWAN, E. G.; HARVEY, A. L. Effects of scorpion (*Buthus tamulus*) venom on neuromuscular transmission in vitro. **Toxicon**, v. 31, n. 11, p. 1373-1384, 1993.

WARD, Micaiah J.; ELLSWORTH, Schyler A.; NYSTROM, Gunnar S. A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. **Toxicon**, v. 151, p. 137-155, 2018.

WEBB, R. Clinton. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

ANEXOS



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA PEÇONHA DE *Tityus pachyurus* EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 6847100823 (ID 002516), sob a responsabilidade de **Prof. Richard Boarato David e equipe; Eryl Yicela Mera Ortiz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 19/09/2023.

We certify that the proposal "STUDY OF THE CARDIOVASCULAR EFFECTS OF *Tityus pachyurus* VENOM IN WISTAR RATS", utilizing 199 Heterogenics rats (199 males), protocol number CEUA 6847100823 (ID 002516), under the responsibility of **Prof. Richard Boarato David and team; Eryl Yicela Mera Ortiz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 09/19/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2023 a 06/2025 Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 4 semanas

Quantidade: 199

Linhagem: Wistar

Peso: 100 a 200 g

Fortaleza, 19 de setembro de 2023

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará