



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA
TOXINA Tf1a PURIFICADA DA PEÇONHA DO
ESCORPIÃO *Tityus fasciolatus***

Autor: Daniel Oliveira da Mata

Brasília - DF
Fevereiro, 2018

Daniel Oliveira da Mata

**CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TOXINA
Tf1a PURIFICADA DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus
fasciolatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília, fevereiro de 2018

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a toda a minha família, namorada e amigos que me deram forças todos os dias para seguir nessa nova jornada do conhecimento.

Agradeço a minha orientadora Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz por todo o suporte, conhecimento e ensinamentos passados durante todo esse tempo, sem tudo isso nada seria possível.

Agradeço ao Dr. Leandro Ambrósio e Diogo Tibery por todos os ensinamentos passados e apoio para a realização dos experimentos no *patch clamp*.

Agradeço ao técnico Adolfo Souza pelo auxílio e na realização dos ensaios no MALDI-TOF.

Agradeço a Dra. Thalita Camargos pelo fornecimento do material e todo o auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao professor Dr. Jan Tytgat e ao Dr. Steve Peigneur pela realização dos ensaios em canais de sódio de insetos e aracnídeo.

Agradeço ao professor Dr. Ernesto Ortiz por todas as discussões e ensinamentos passados durante a suas estadas no Brasil.

Agradeço a todos os companheiros e amigos do laboratório de eletrofisiologia que estavam sempre dando suporte para a realização de toda essa jornada.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade.

Agradeço a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro dado durante o período deste projeto.

Resumo

Os escorpiões, pertencentes ao filo Arthropoda, representam aproximadamente 1,5% das espécies presentes na classe dos aracnídeos. No Brasil, existem diversas espécies de escorpiões presentes em todas as regiões, dentre eles os que mais se destacam são os pertencentes ao gênero *Tityus* devido à sua grande distribuição geográfica e importância médica. Dentre eles, uma espécie que se destaca é o *Tityus fasciolatus* mais presente na região central do Brasil. Essa espécie de escorpião, assim como as outras, possui uma peçonha extremamente complexa formada por uma série de compostos, e dentre eles estão os peptídeos conhecidos como neurotoxinas capazes de interagir e afetar o funcionamento dos canais de sódio dependentes de voltagem, responsáveis pela iniciação e propagação dos potenciais de ação. A peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* foi coletada e submetida ao fracionamento utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). As frações obtidas foram analisadas em espectrômetro de massa (MALDI-TOF) a fim de identificar o peptídeo de interesse, que teve sua sequência determinada e sua atividade testada nos sete subtipos de canais de sódio de mamíferos e em canais de sódio de inseto e aracnídeo por meio da técnica de *patch-clamp* em configuração *voltage clamp*. O peptídeo purificado denominado Tf1a foi capaz de alterar a cinética de todos os subtipos de canais de mamífero e, ainda, agir sobre os canais de inseto e de aranha modificando também seu funcionamento. O efeito observado permite classificar a toxina Tf1a como uma β -toxina escorpiônica do tipo *like*. Sendo assim esse trabalho foi capaz de descrever uma nova neurotoxina purificada da peçonha de um escorpião e caracterizar a sua atividade em diversos tipos de canais iônicos, colaborando assim com o entendimento da ação destes peptídeos.

Abstract

Scorpions, belonging to the Arthropoda phylum, represent approximately 1.5% of the species present in the Arachnidae class. There are several species of scorpions present in all regions of Brazil, among them the ones that stand out most are those belonging to the genus *Tityus* thanks to its great geographic distribution and medical importance. Between them, one species that stands out is the *Tityus fasciolatus* most present in the central region of Brazil. This species of scorpion, like the others, has an extremely complex venom formed by a several compounds. Among them are the peptides also known as neurotoxins capable of interacting and affect the functioning of the voltage-gated sodium channels, responsible for the initiation and propagation of the action potential. The venom of the scorpion *Tityus fasciolatus* was collected and submitted to fractionation using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) technique. The fractions obtained were analyzed by mass spectrometer (MALDI-TOF) to identify the peptide of interest, which had its sequence determined and its activity tested on the seven subtypes of mammalian sodium channels and on insect and arachnid sodium channels by the use of the *patch-clamp* technique in *voltage clamp* configuration. The purified peptide named Tf1a was able to change the kinetics of all subtypes of mammalian channels and also act on the insect and arachnid channels, modifying their normal functioning. The effects caused allows us to classify the toxin Tf1a as a β -like scorpion toxin. Thus, this work was able to describe a new neurotoxin purified from the venom of a scorpion and characterize its activity in several types of ion channels, thus collaborating with the understanding of the action of these peptides.

Abreviaturas

Na⁺ - Sódio

K⁺ - Potássio

Cl⁻ - Cloreto

Ca²⁺ - Cálcio

TFA - Ácido Trifluoroacético

PBS – Tampão salina fosfato

HCCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

DAN - 1,5 diaminonaftaleno

cDNA – DNA complementar

NDBPs - Peptídeos sem ponte de sulfeto

DBPs - Peptídeos com ponte de sulfeto

NaScTx - Toxinas que atuam em canais de sódio

α -NaScTx - Toxinas que atuam em canais de sódio do tipo alfa

β -NaScTx - Toxinas que atuam em canais de sódio do tipo beta

Nav – Canais de sódio voltagem dependentes

HEK – Rim embrionário humano

CHO – Ovário de hamster chinês

FPLC - Cromatografia líquida Rápida de proteína

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

MALDI/TOF – Ionização em Matriz Assistida por Dessorção a laser/Tempo de voo

ISD - *In Source Decay*

MS - Espectrômetro de massa

S4 – Sensor de voltagem

Po - Probabilidade de abertura

Fu – Fração não inibida

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. ESCORPIÕES	15
1.1.1 Tityus fasciolatus	16
1.2. TOXINAS ESCORPIÔNICAS.....	19
1.3. TOXINAS COM ATIVIDADES EM CANAIS DE SÓDIO (NaScTx).....	20
1.4. CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VGSCs)	23
1.4.1 Estrutura dos Canais de sódio	23
1.4.2 Cinética dos canais de sódio.....	25
1.4.3 Subtipos de canais de sódio	26
1.4.3 Sítios de interação.....	28
1.5. AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA.....	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVO GERAL.....	33
4. MATERIAS	34
4.1. Soluções para HPLC.....	34
4.2. Meios e soluções para cultura de células	34
4.3. Soluções para ensaios eletrofisiológicos	35
5. MÉTODOS	36
5.1 Purificação do peptídeo	36
5.2. Avaliação da Massa Molecular (MW).....	36
5.3. Sequenciamento Parcial do peptídeo	36
5.4. Quantificação do peptídeo	37
5.5 Caracterização Eletrofisiológica.....	37
5.5.1 Cultura de células para canais de humano	37
5.5.2 Ensaios Eletrofisiológicos em canais de humano.....	38
5.5.3 Análise dos Dados dos canais de humano	39
5.5.4 Cultura de células usadas nos ensaios com canais de inseto e aracnídeo	40
5.5.5 Ensaios Eletrofisiológicos em canais de inseto e aracnídeo	40
5.5.6 Análise dos Dados obtidos nos ensaios com canais de inseto e aracnídeo	41

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 <i>Perfil Cromatográfico e purificação</i>	42
6.2 <i>Avaliação da massa molecular e sequenciamento parcial do peptídeo</i> ..	43
6.3 <i>Caracterização Eletrofisiológica da Tf1a em canais de sódio de humano</i>	49
6.3.1 <i>Geração da I/V e análise da fração não inibida da corrente (Fu)</i>	49
6.3.2 <i>Avaliação do Shift de voltagem ou probabilidade de abertura (Po)</i> ..	53
6.3.3 <i>Recuperação da Inativação Lenta</i>	59
6.4 <i>Caracterização Eletrofisiológica da Tf1a em canais de inseto e aracnídeo</i>	60
7. CONCLUSÃO	67
8. PERSPECTIVAS	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE A	73

Índice de Figuras

Figura 1 Escorpião <i>Tityus fasciolatus</i> . Foto: Gustavo Guimarães	17
Figura 2 Distribuição geográfica da espécie de escorpião <i>Tityus fasciolatus</i> no Brasil. Em destaque com triângulos vermelhos estão demarcadas as regiões brasileiras nas quais foram encontrados registros da espécie de escorpião <i>Tityus fasciolatus</i> . Dados obtidos do Ministério da Saúde.....	17
Figura 3 Ilustração da interação de β -toxinas com o canal de sódio dependentes de voltagem. Nesta imagem está ilustrado a interação da toxina Ts1, uma β –toxina escorpiônica, com o seu sítio de interação nos canais de sódio (sensor de voltagem (S4) do domínio 2). Em destaque, estão mostrados no centro o poro do canal com seu filtro de seletividade e a localização dos sensores de voltagem. Imagem: Daniel Oliveira da Mata	23
Figura 4 Estrutura do canal de sódio dependentes de voltagem. Ilustração da estrutura principal (subunidade α) dos canais de sódio voltagem dependentes. Em colorido, estão mostrados os quatro domínios existentes, cada um com sua cor, com sua subdivisão em seis subunidades. Além disso, os pequenos traços representam os <i>loops</i> que interconectam as regiões principais do canal. O círculo preto representa o portão/sítio de inativação responsável pela inativação do canal e em cinza temos a região formadora do poro, que em conjunto na estrutura tridimensional formam a região por onde os íons fluem. Imagem: Daniel Oliveira da Mata. Baseado em (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).....	25
Figura 5 Cinética de ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Estão mostrados os três estágios básicos do canal de sódio (fechado, aberto e inativado). A despolarização da membrana acarreta no movimento inicial dos sensores de voltagem dos domínios I, II e III tornando o canal aberto. Rapidamente o sensor de voltagem do domínio IV se move e modifica o canal de modo facilitar a interação com o sítio de inativação tornando-o inativado. Imagem: Daniel Oliveira da Mata. Baseado em (GOLDSCHEN-OHM et al., 2013).	26
Figura 6 Esquema básico da estrutura de um <i>patch clamp</i> . Demonstração da estrutura e partes de um <i>patch clamp</i> . (A) Micropipeta preenchida com solução interna que interage com a célula banhada por solução externa em uma placa; (B) pré-amplificador com o eletrodo capaz de gerar os estímulos conectado a	

um micro-manipulador; (C) amplificador que capta e gera o sinal; (D) computador que recebe os resultados obtidos mostrando os registros. Imagem: Daniel Oliveira da Mata. Baseado em (KORNREICH, 2007).	31
Figura 7 Protocolo de estímulo utilizando para realização dos ensaios eletrofisiológicos.....	38
Figura 8 Protocolo de estímulo utilizado nos ensaios em canais de inseto e aracnídeo.(A) Protocolo para a avaliação da Inibição de corrente. (B) Protocolo para a obtenção da relação corrente/voltagem (I/V) da ativação. (C) Protocolo para relação I/V da inativação.	41
Figura 9 Perfil cromatográfico da peçonha bruta de <i>Tityus fasciolatus</i> . Em destaque o peptídeo de interesse (Tf1a). (A) Primeiro passo de recromatografia (B) Segundo passo de recromatografia (C) Terceiro passo de recromatografia e purificação da toxina Tf1a.	42
Figura 10 Massa molecular média [M+H ⁺] obtida da fração de interesse purificada da peçonha de <i>Tityus fasciolatus</i> utilizando a técnica de espectrometria de massa (MS) no modo linear.....	43
Figura 11 Sequência parcial do peptídeo obtida por meio da técnica de espectrometria de massa (MS) pelo método de <i>In Source Decay</i> (ISD).	44
Figura 12 Sequência nucleotídica do precursor de uma provável toxina de sódio (NaScTx) obtida do transcrito de <i>Tityus fasciolatus</i> (CAMARGOS, 2014) e sequência peptídica correspondente. Em cinza está mostrado o peptídeo sinal, sublinhado a sequência do peptídeo maduro e em azul o sinal de amidação..	45
Figura 13 Comparação/alinhamento das sequências peptídicas. Em preto podemos observar a sequência obtida do transcrito da glândula de peçonha do escorpião <i>Tityus fasciolatus</i> . Em vermelho, a sequência parcial do peptídeo purificado e obtida por meio do uso do espectrometria de massa (MS).....	45
Figura 14 Alinhamento de sequência da Tf1a com outras toxinas descritas de peçonhas de espécies do gênero <i>Tityus</i> utilizando o programa ClustalW e grau de identidade das sequências com o peptídeo estudado. As setas representam os locais das cisteínas e suas devidas ligações e formação das pontes dissulfeto. ID%: porcentagem de identidade. (*) resíduos de aminoácidos idênticos;(;) substituição conservativa;(.) substituição semi-conservativa. Vermelho: resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (-Y); Azul: resíduos de	

aminoácidos ácidos (carregados negativamente); Rosa: resíduos de aminoácidos básicos (carregados positivamente) (-H); Verde: resíduos de aminoácidos polares. Quadrado azul: região conservada da região farmacofórica; Quadrado vermelho: região conservada de resíduos de aminoácidos aromáticos na posição C terminal.	47
Figura 15 Representação da estrutura terciária da toxina Ts1 purificada da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> . PDB:1B7D.	48
Figura 16 Fração não inibida da corrente na ativação. Os dados da média da fração não inibida da corrente de cada subtipo foram coletadas e foi gerado um gráfico de barras e o seu devido erro padrão representado.n=4.....	50
Figura 17 Gráficos de I/V obtidos para os sete subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem testados (Nav 1.1 a 1.7). Preto – controle; Vermelho – toxina 100nM. Os gráficos foram gerados com a corrente média normalizada e a voltagem (mV).	51
Figura 18 Traços Brutos das correntes de Na ⁺ do controle e na presença da Tf1a (100nM). Foram coletados os dados de cada subtipo de canal na voltagem onde eram atingidas as correntes máximas: Nav 1.1 (-10mV), Nav 1.2 (0mV), Nav 1.3 (5mV), Nav 1.4 (10mV),Nav 1.5 (-25mV), Nav 1.6 (-5mV) e Nav 1.7 (0mV).....	52
Figura 19 Gráficos da probabilidade de abertura na fase da ativação de todos os subtipos de canais de sódio testados gerados através da função de Boltzmann em ensaios com pré-pulso. Os gráficos foram gerados utilizando-se a probabilidade de abertura (P _o) pela voltagem (mV).	55
Figura 20 Gráficos da probabilidade de abertura na fase da inativação de todos os subtipos de canais de sódio testados gerados por meio da função de Boltzmann. Todos os gráficos foram gerados por meio do uso dos dados de corrente (A) por voltagem (mV).	57
Figura 21 Gráfico da recuperação da inativação lenta dos subtipos de canais de sódio. Triângulos pretos – toxina 100nM, triângulos brancos – controle. Os gráficos foram gerados com a relação da fração de canais recuperados em função do tempo de estímulo e recuperação (ms).	60
Figura 22 Resultado dos ensaios eletrofisiológicos realizados com a Tf1a em canais de inseto e aracnídeo. (A) traços brutos dos ensaios realizados.	

Vermelho – Toxina 100nM; Preto – controle. (B) Gráfico do *shift* de voltagem da ativação gerado por meio do uso da função de Boltzmann. Foram utilizados os dados de condutância normalizados e voltagem (G/V) para a realização dos cálculos. (C) Gráfico do *shift* de voltagem da inativação gerado por meio do uso da função de Boltzmann. Foram utilizados os dados de corrente normalizados e voltagem (G/V) para a realização dos cálculos. 62

Índice de Tabelas

Tabela 1 Dados da fração não inibida da corrente (F_u). Foram calculadas as médias de cada subtipo utilizando os dados de corrente máxima de cada célula testada; $n=4$	49
Tabela 2 Valores das médias de $V_{1/2}$ da ativação de canais de Na^+ de humano com pré-pulso. Foram coletados dados de todos os subtipos testados tanto do controle quanto na presença da toxina. Para a obtenção dos valores, foram utilizadas as médias de todas as células testadas de cada subtipo. $n=4$	53
Tabela 3 Valores das médias de $V_{1/2}$ da ativação de canais de Na^+ de humano sem pré-pulso. Foram coletados dados de todos os subtipos testados tanto do controle quanto na presença da toxina. Para a obtenção dos valores, foram utilizadas as médias de todas as células testadas de cada subtipo. $n=4$	54
Tabela 4 Valores das médias de $V_{1/2}$ da inativação de canais de Na^+ de humano. Foram coletados dados de todos os subtipos testados tanto do controle quanto na presença da toxina. Para a obtenção dos valores, foram utilizadas as médias de todas as células testadas de cada subtipo.	56
Tabela 5 Fator de inclinação da reta (k) ou sensibilidade a voltagem das isoformas de canais de sódio testados na fase da ativação, mostrando as médias do controle e na presença da toxina a 100 nM.	58
Tabela 6 Fator de inclinação da reta (k_h) ou sensibilidade à voltagem das isoformas de canais de sódio testados na fase inativação, mostrando as médias do controle e na presença da toxina a 100 nM.	58
Tabela 7 Dados de tau (τ) da inativação lenta. Média dos dados do tau da inativação lenta de todos os subtipos de canais de sódio testados. Estão mostrados os valores de tau na ausência (controle) e na presença da toxina (100 nM), junto com a sua variação.	59
Tabela 8 Valores das médias de $V_{1/2}$ na fase da ativação em células de inseto e aracnídeo.	61
Tabela 9 Valores das médias de $V_{1/2}$ na fase da inativação em células de inseto e aracnídeo.	61

Índice de Quadros

Quadro 1 Classe das toxinas e os resíduos conservados das β -toxinas. X representa aminoácidos que podem variar e os números representam a quantidade de resíduos presentes naquela região. Adaptado de (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013)	21
Quadro 2 Isoformas de Canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Em destaque estão mostrados os genes responsáveis pela geração destes canais e a localização no sistema humano de cada subtipo conhecido. Baseado em (CATTERALL, 2012)	27
Quadro 3 Subtipos de canais de sódio, genes associados e doenças relacionadas à cada subtipo. Baseado em (HUANG et al., 2017).....	28
Quadro 4 Sítios de interação das neurotoxinas nos canais de sódio. Demonstrados os locais de interação de cada sítio nos canais de sódio, as neurotoxinas mais conhecidas que agem em cada local e o efeito causados nestes canais. Modificado de (CATTERALL, 1986).	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESCORPIÕES

Pertencentes ao filo Arthropoda e à classe Arachnidia, os escorpiões, também conhecidos como lacraus, surgiram a mais de 450 milhões de anos no ambiente aquático, porém têm os seus primeiros registros no ambiente terrestre apenas entre 325 e 350 milhões de anos atrás. Os escorpiões estão contidos na ordem Scorpiones, representando aproximadamente 1,5% das espécies conhecidas na classe dos aracnídeos (BRAZIL; PORTO, 2010). Estes animais estão presentes em quase todas as áreas geográficas do planeta, sendo organismos extremamente versáteis quanto às suas condições de sobrevivência, só não estando presente nos polos devido às baixas temperaturas. Dentre a classe dos escorpiões, a família mais significativa e a mais estudada é a família Buthidae, graças à sua distribuição geográfica diversa, à grande quantidade de espécies existentes e a sua grande importância médica por possuir o maior número de espécies causadoras de acidente (RODRIGUEZ; REGINA, 2008; TORQUATO et al., 2005).

A família Buthidae possui aproximadamente 100 gêneros de escorpiões diferentes, com mais de 1000 espécies, o que corresponde a cerca de 50% dos escorpiões existentes (LOURENÇO, 2015). No Brasil, o gênero que mais se destaca dentro da família Buthidae é o gênero *Tityus*. São registradas 54 espécies de *Tityus* no Brasil, distribuídos em quase todas as regiões do país (BRAZIL; PORTO, 2010). Dentre os que mais se destacam, graças ao grande número de acidentes causados são *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigimurus* e o *Tityus obscurus* (RODRIGUEZ; REGINA, 2008). São animais de tamanhos e colorações muito diversos, possuindo características diferentes com relações a hábitos de vida e comportamento (BRAZIL; PORTO, 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2016 foram registrados mais de 800 mil casos de acidentes com escorpiões, e mais de 1100 mortes, o que demonstra a grande importância médica que estes animais possuem no país (Ministério da Saúde, 2018).

Algumas características são bem destacadas nos escorpiões, como seus hábitos alimentares, hábitos de vida e reprodução. Os escorpiões são animais carnívoros, se alimentando basicamente de pequenos artrópodes

como baratas, grilos e até mesmo outros escorpiões (BRAZIL; PORTO, 2010). Levando isso em conta, a peçonha produzida por estes animais tem um papel extremamente importante na captura das suas presas. Ao localizar a presa, os escorpiões inicialmente tentam capturá-la utilizando apenas o seu aparato corporal, como as pinças e palpos, porém algumas vezes esta ação não é suficiente levando então à utilização do seu ferrão para injetar a peçonha e paralisar a presa (RODRIGUEZ; REGINA, 2008).

Com relação aos seus hábitos comportamentais, escorpiões são animais noturnos e, durante o dia, tendem a permanecer escondidos em pedras e galerias a fim de preservarem-se de seus predadores. Porém, com os crescimento urbano, muitos destes animais passaram a habitar espaços urbanos em locais com lixo, entulhos e restos de construção (TORQUATO et al., 2005), favorecendo assim o aumento no número de acidentes provenientes de picadas de escorpião. Já com relação à sua reprodução, fato interessante é a capacidade de algumas espécies, como a de *Tityus serrulatus*, de realizar partenogênese, ou seja a geração de novos indivíduos sem a necessidade de um macho para esse processo, o que facilita assim o processo de geração de novos animais (TORQUATO et al., 2005).

Todos os escorpiões são considerados peçonhentos, porém apenas uma pequena parte (cerca de 2%) é capaz de gerar algum tipo de acidente grave em humanos (BRAZIL; PORTO, 2010).

1.1.1 *Tityus fasciolatus*

Dentre as espécies de escorpiões de interesse médico presentes no Brasil está o *Tityus fasciolatus* (**Figura 1**). Este escorpião se encontra mais presente na região central do Brasil, mais precisamente nos estados de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal (LOURENÇO,1996)(MENDES et al., 2015). Possui uma coloração predominante amarelada com detalhes em marrom, podendo ter de 4 a 7 cm de comprimento (RAFAEL, 2009). É uma espécie com hábitos rurais, vivendo muitas vezes associado a cupinzeiros, e vem se tornando fruto de diversos estudos a fim de avaliar tanto os efeitos de sua picada quanto o potencial dos compostos presentes em sua peçonha (MENDES et al., 2015; RAFAEL, 2009).



Figura 1 Escorpião *Tityus fasciolatus*. Foto: Gustavo Guimarães



Figura 2 Distribuição geográfica da espécie de escorpião *Tityus fasciolatus* no Brasil. Em desataque com triângulos vermelhos estão demarcadas as regiões brasileiras nas quais foram encontrados registros da espécie de escorpião *Tityus fasciolatus*. Dados obtidos do Ministério da Saúde.

O primeiro trabalho reportado utilizando a peçonha de *Tityus fasciolatus* foi realizado por (WAGNER et al., 2003). Neste trabalho, a peçonha bruta foi purificada utilizando a técnica de filtração em gel FPLC, obtendo aproximadamente 20 frações, e as frações de interesse foram então recromatografadas a partir da técnica de RP-HPLC. Um dos peptídeos obtidos teve sua massa molecular avaliada, sua sequência determinada e sua estrutura simulada *in silico*. Esse peptídeo possuía uma massa de 6614Da e foi denominado de Tf4. Além disso, ensaios de letalidade em ratos com o uso da peçonha bruta de *Tityus fasciolatus* e ensaio de “single sucrose gap” utilizando nervos de sapo, rato e caranguejo resultaram na $LD_{50} = 3,646 \text{ mg kg}^{-1}$ por rato, se mostrando assim menos tóxico que as peçonhas de *T. stigmurus*, *T. bahiensis*, *T. serrulatus* e *T. costatus*, porém mais que a de *T. obscurus*. Os ensaios de “single sucrose gap” mostraram que a toxina Tf4 prolongou o potencial de ação em nervos de sapo a $53\mu\text{M}$, porém não teve efeito em nervos de caranguejo e rato, sugerindo assim um efeito característico das α -toxinas de escorpião.

Outros ensaios também chegaram a ser realizados com a peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*.(GUIMARÃES; PINTO; MELO, 2011) foram capazes de demonstrar a toxicidade e os efeitos causados pela injeção da peçonha bruta de *Tityus fasciolatus* em ratos. Foi demonstrado que a peçonha bruta de *Tityus fasciolatus* na dose de $24 \mu\text{g}$ causou uma serie de efeitos nos animais tais como comportamentos nociceptivos, secreções oral e nasal, dispneia e diversas alterações hematológicas, efeitos bastante similares aos causados pelo envenenamento de *Tityus serrulatus* (GUIMARÃES; PINTO; MELO, 2011). Já (MENDES et al., 2015) identificaram três toxinas (Tf1, Tf3 e Tf4a) através do uso de técnicas de identificação molecular e realizaram o mapeamento da atividade da peçonha em células do tipo B.

Ademais (CAMARGOS et al., 2015) foram capazes de demonstrar a atividade da toxina denominada Tf2 de *Tityus fasciolatus* em oito isoformas de canais iônicos de sódio (Nav 1.1-1.8) através do uso da técnica de *voltage clamp*. Esta toxina foi capaz de alterar a cinética da isoforma Nav 1.3 afetando a sua abertura para potencias mais negativos. Duas outras toxinas (Tf3 e Tf4) também tiveram a sua caracterização eletrofisiológica realizadas nas oito

isoformas. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as toxinas foram classificadas como α toxinas, uma vez que foram capazes de aumentar a corrente e afetar a inativação rápida dos canais de sódio. A toxina Tf3 teve atividade nos subtipos Nav 1.1 à 1.7, enquanto a toxina Tf4 agiu apenas nos subtipos Nav 1.2 e 1.7 (CAMARGOS, 2014).

1.2. TOXINAS ESCORPIÔNICAS

Peçonhas de escorpião são misturas que contêm uma série de componentes tais como enzimas, nucleotídeos, lipídios, aminas biogênicas e algumas substâncias ainda não conhecidas, cada um com um ação e atividade específica (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Mesmo presente na Terra há milhões de anos, o estudo dos componentes presentes na peçonha dos escorpiões é algo recente, sendo conhecido aproximadamente 1% dos compostos presentes nesse complexo (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). O propósito inicial para a produção dessas substâncias pelos animais peçonhentos parece ter sido o ataque e imobilização das suas presas, se mostrando uma mistura complexa quanto à sua composição, e com componentes específicos de acordo com a presa a ser capturada (GWEE et al., 2002).

Dentre os componentes melhor estudados presentes na peçonha dos escorpiões estão os peptídeos, graças à sua atividade sobre uma série de canais iônicos presentes em diversas espécies (BOSMANS; TYTGAT, 2007). Tais peptídeos são capazes de interagir com canais específicos como Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} (POSSANI et al., 2000) e podem ser divididos em peptídeos de cadeia curta (28 a 46 aminoácidos), capazes de interagir com maior especificidade com canais de potássio, e de cadeia longa (61 a 76 aminoácidos) capazes de modificar os canais de sódio (ESCALON; POSSANI, 2013). Além da classificação quanto ao seu tamanho, os peptídeos escorpiônicos também passaram a ser divididos com relação à presença de pontes dissulfeto em sua estrutura. Os peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBPs) são mais conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana, hemolítica e também podem atuar como imuno-moduladores. Já os peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs) são os responsáveis pela ação neurotóxica, já

que são capazes de modular as atividades dos canais iônicos (GUERRERO-VARGAS et al., 2012).

Ao longo dos anos e observando o grande potencial dessas substâncias, uma série de pesquisas começaram a ser realizadas a fim de entender melhor as características destes peptídeos e como estes interagem com os canais iônicos. Inicialmente, buscou-se entender os efeitos da picada destes animais e também como melhor como tratá-las. Entretanto, a partir da caracterização dos componentes das peçonhas, e com o maior estudo dos seus compostos observou-se que estes são capazes de interferir em diversas atividades biológicas, podendo funcionar como ferramentas biotecnológicas. Dentre elas, estão as toxinas que capazes de interagir e modular especificamente os canais de sódio, as chamadas NaScTx.

1.3. TOXINAS COM ATIVIDADES EM CANAIS DE SÓDIO (NaScTx)

Toxinas de escorpião que agem em canais de sódio (NaScTx) são toxinas de cadeia longa (55-75 resíduos de aminoácidos) com três ou quatro pontes dissulfeto (GUERRERO-VARGAS et al., 2012) e com massas moleculares aproximadas entre 6500-8500Da (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Além disso, essas toxinas possuem em sua grande maioria estruturas tridimensionais e sequências muito semelhantes. Sua estrutura tende a ser formada por uma α -hélice e três ou quatro folhas- β antiparalelas que são estabilizadas graças à formação das pontes dissulfeto, que são conservadas nessas toxinas (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005)(QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Levando em consideração as características das suas atividades, as NaScTx foram subdividas em duas classes: as alfa (α) e beta (β) toxinas. As α -NaScTxs foram inicialmente descritas em escorpiões do velho mundo (África e Ásia), mas também são encontradas em escorpiões presentes nas Américas (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). As α -NaScTxs são subdividas em três diferentes grupos: **1)** As α -toxinas clássicas que são capazes de interagir apenas com canais de sódio de mamíferos, **2)** As α -NaScTxs inseticidas que agem apenas contra insetos e **3)** As α -like toxinas que agem tanto em mamíferos como em insetos (GUERRERO-VARGAS et al., 2012; QUINTERO-

HERNÁNDEZ et al., 2013)(POSSANI et al., 1999; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005)(GORDON et al., 1998a). Já as β -NaScTx foram subdivididas em 4 grupos : **1)** As anti-mamíferos, que são específicas para mamíferos **2)** As anti-insetos depressoras, **3)** As anti-insetos excitatórias e **4)** As que são capazes de agir tanto em canais de sódios de inseto quanto de mamíferos (POSSANI et al., 1999)(GORDON et al., 1998a).

Quadro 1 Classe das toxinas e os resíduos conservados das β -toxinas. X representa aminoácidos que podem variar e os números representam a quantidade de resíduos presentes naquela região. Adaptado de (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013)

Classe	Resíduos conservados
Anti-mamíferos	KxGYxVx(4)GCKxxCxxLGxNxxCxxECx(9)GYCYxFxCxCxxLx(7)PlxxKxC
Anti-inseto excitatória	KKxGxxxDxxGKxxECx(4,9)YCxxxCTKVxYAxxGYCCxxxCYCxGLxDDKx(9)KxxCD
Anti-inseto depressora	DGY[IP][KR]x(2) [DNS]GC[KR]x[ADS]Cx(2,3)Nx(2,3)Cx(3)Cx(3)G[AG]x[FY]GYCW[AGT] WGL ACWC[EQ][GN]LP[ADE]
Anti-mamífero/inseto	GCK[FLV]xC[FV][IP][NR][NP][AES][EGS]x[CGN]

As β toxinas possuem quatro regiões conservadas em sua sequência peptídica essas regiões são importante para a diferenciação destas toxinas e proferem características chave para a interação e atividade destes peptídeos (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013) sendo elas:

- I)** A região conhecida com fármaco-poro central, situada na α -hélice, onde estão localizados resíduos de aminoácidos carregados negativamente, rodeados por uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos. Esta seção parece estar diretamente relacionada com a ligação destas toxinas com os canais de sódio.
- II)** Uma região constituída de diversos grupos aromáticos presente entre as fitas β_2 e β_3 . Tal seção esta relacionada com a atividade destas toxinas.
- III)** Resíduos de aminoácidos localizados na região “*N-groove*” responsáveis pelo aprisionamento do sensor de voltagem

IV) Resíduos específicos presentes na região C-terminal que aumentam a afinidade destas toxinas pelos canais de sódio(ESCALON; POSSANI, 2013)(QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

As α e β toxinas interagem em diferentes regiões dos canais de sódio e são capazes de causar efeitos diferentes. As α -toxinas interagem com o sítio 3 do canal de sódio, localizado no *loop* externo entre as subunidades S3-S4 presentes no domínio IV, e também com as subunidades S5-S6 do domínio I. Graças a essas interações, as α -toxinas são capazes de inibir a inativação rápida, prolongando a despolarização do canal, causando assim uma série de efeitos interessantes para o estudo destas toxinas (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Com relação às β -toxinas, sua interação ocorre no sítio 4 do canal de sódio (S3-S4; S1-S2 do domínio II) (**Figura 3**), o que gera um aumento na ativação do canal. Essa interação é capaz de reduzir a amplitude da corrente e alterar o $V_{1/2}$ para patamares mais hiperpolarizados, facilitando assim a abertura destes canais (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

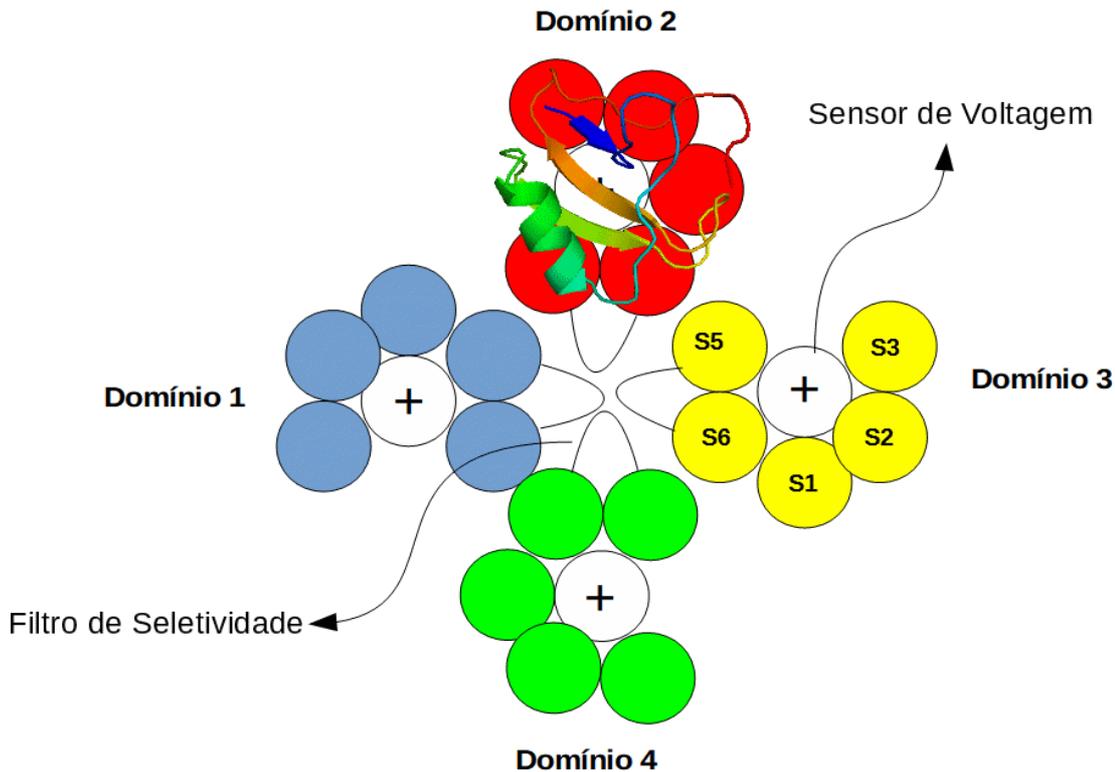


Figura 3 Ilustração da interação de β -toxinas com o canal de sódio dependentes de voltagem. Nesta imagem está ilustrado a interação da toxina Ts1, uma β -toxina escorpioniça, com o seu sítio de interação nos canais de sódio (sensor de voltagem (S4) do domínio 2). Em destaque, estão mostrados no centro o poro do canal com seu filtro de seletividade e a localização dos sensores de voltagem. Imagem: Daniel Oliveira da Mata

Já foram descritas mais de 60 toxinas de escorpião comprovadamente capazes de agir sobre canais de sódio dependentes de voltagem (HOUSLEY et al., 2016). Dentre elas cerca de 17 foram obtidas de animais pertencentes ao gênero *Tityus*, sendo quatro destas classificadas e comprovadas como α toxinas e treze como β toxinas. As que mais se destacam são as toxinas Ts2 e Ts1 (α e β respectivamente) purificadas de *Tityus serrulatus*, devido a sua grande variabilidade de ensaios e caracterizações realizadas.

1.4. CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VGSCs)

1.4.1 Estrutura dos Canais de sódio

Os canais de sódio são estruturas fundamentais para a propagação de potenciais de ação tanto nos músculos como nos nervos. Desta forma, compreender a estrutura e funcionalidade destes canais tem sido considerado extremamente importante. Tendo em vista a alta afinidade e especificidade das

neurotoxinas em sua interação com os canais de sódio, estes componentes tornaram-se peças chave para a elucidação das características desses canais (CATTERALL, 1986).

Os canais de sódio são proteínas transmembrânicas, formadas por duas estruturas principais, a subunidade α (260kDa) e as subunidades β que são estruturas auxiliares à subunidade α . A subunidade α é formada por quatro domínios homólogos (I-IV), onde cada domínio é subdividido em seis segmentos transmembrânicos (S1-S6). Dentre estes segmentos, o S4 compreende o sensor de voltagem desta estrutura. O segmento S4 inclui de 4 a 8 resíduos de aminoácidos carregados positivamente intercalados, tais como lisina e arginina, distanciados por três resíduos de aminoácidos diferentes. Graças à despolarização da membrana, ocorre uma alteração no campo elétrico, fazendo com que haja um movimento desta estrutura para o lado externo da membrana, causando assim a abertura destes canais e possibilitando a passagem dos íons de sódio através do poro iônico (CESTÈLE et al., 1998) **(Figura 4)**.

Os segmentos entre S5 e S6 de todos os domínios formam, em conjunto, um poro iônico que permite a passagem dos íons para a região interna da célula. Além destas regiões, há a formação de *loops* que interconectam alguns segmentos dos canais, como o *loop* entre o domínio III e IV responsável pela inativação rápida do canal, e o *loop* entre S5 e S6 formador do filtro de seletividade do canal **(Figura 4)**(CATTERALL, 1986)(CESTÈLE; CATTERALL, 2000)(GOLDSCHEN-OHM et al., 2013). Tal filtro de seletividade é formado por duas regiões principais mais conhecidas como anéis. O anel externo é formado basicamente pela sequência de aminoácidos EEDD ou EEMD, desempenhando o papel de controle no fluxo de íons. Já o anel interno é composto por resíduos conservados (DEKA) presentes em todos os domínios, tendo essa região o papel fundamental na seletividade do canal ao íon específico (ZHANG et al., 2013).

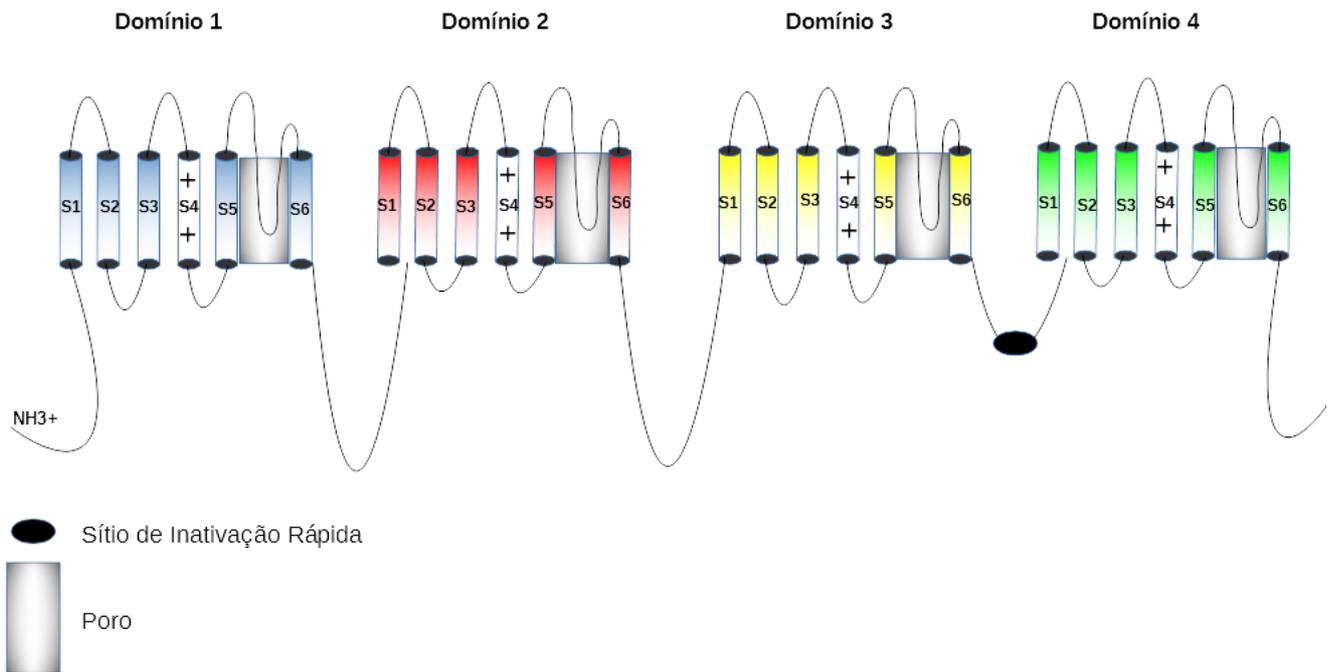


Figura 4 Estrutura do canal de sódio dependentes de voltagem. Ilustração da estrutura principal (subunidade α) dos canais de sódio voltagem dependentes. Em colorido, estão mostrados os quatro domínios existentes, cada um com sua cor, com sua subdivisão em seis subunidades. Além disso, os pequenos traços representam os *loops* que interconectam as regiões principais do canal. O círculo preto representa o portão/sítio de inativação responsável pela inativação do canal e em cinza temos a região formadora do poro, que em conjunto na estrutura tridimensional formam a região por onde os íons fluem. Imagem: Daniel Oliveira da Mata. Baseado em (CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

1.4.2 Cinética dos canais de sódio

Além de sua estrutura bastante complexa, os canais de sódio possuem uma cinética bastante particular para realização de suas ações. Para a ativação destes canais e permeabilidade dos íons, inicialmente ocorre uma despolarização que permite que os sensores de voltagem (S4) sejam movimentados para a parte externa da membrana. Porém, no primeiro momento, apenas os sensores de voltagem presentes no domínio I, II e III tendem a se descolar, gerando assim uma mudança de conformação na estrutura do canal tornando-o agora aberto e permeável ao íon sódio. Subsequentemente, ocorre o movimento do sensor de voltagem do domínio IV. Esse movimento gera novamente uma mudança de conformação na estrutura do canal, que permite uma rápida interação do sítio/portão de inativação,

fazendo assim com que o canal se feche e tornando-o inativo. Após o movimento destes quatro sensores de voltagem, os mesmos tendem a retornar ao seu estado e localização natural, possibilitando assim que o canal possa ser ativado novamente e desempenhar seu papel na propagação dos sinais. Sendo assim, os sensores de voltagem presentes nos domínios I,II e III são responsáveis e fundamentais para a abertura destes canais, já o sensor de voltagem do domínio IV parece ser responsável pela inativação rápida destes canais (**Figura 5**)(GOLDSCHEN-OHM et al., 2013).

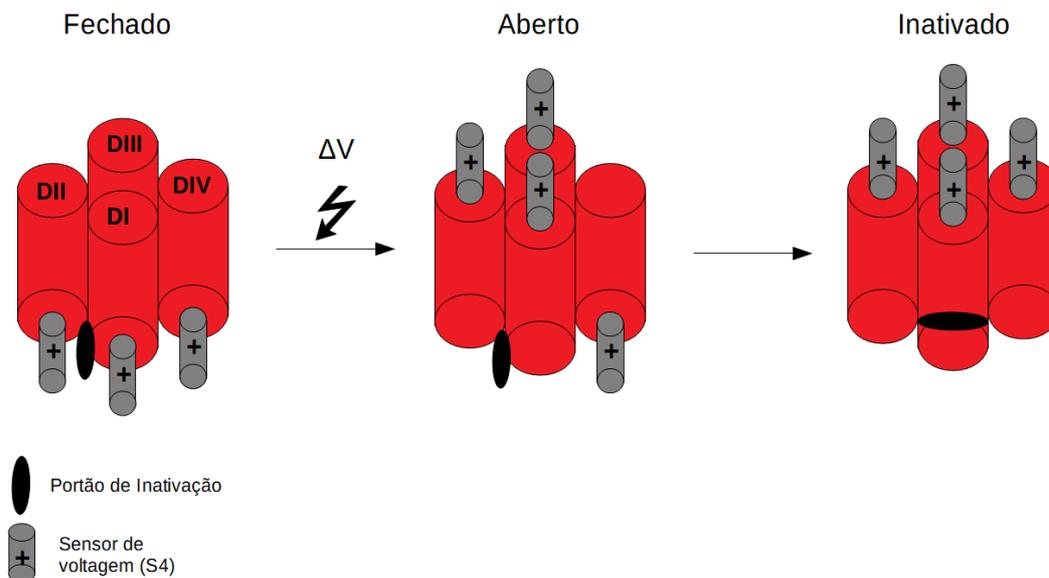


Figura 5 Cinética de ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Estão mostrados os três estágios básicos do canal de sódio (fechado, aberto e inativado). A despolarização da membrana acarreta no movimento inicial dos sensores de voltagem dos domínios I, II e III tornando o canal aberto. Rapidamente o sensor de voltagem do domínio IV se move e modifica o canal de modo facilitar a interação com o sítio de inativação tornando-o inativado. Imagem: Daniel Oliveira da Mata. Baseado em (GOLDSCHEN-OHM et al., 2013).

1.4.3 Subtipos de canais de sódio

Até hoje, foram encontrados nove subtipos de canais de sódio em mamíferos e mais de 100 tipos em insetos, graças a uma série de modificações no seu código genético (BAGAL et al., 2015; ESCALON; POSSANI, 2013). Nos mamíferos, os canais de sódio estão divididos em nove isoformas, cada uma com uma ação e localização específicas. As isoformas $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ e $Na_v1.6$ são expressas em maior quantidade no Sistema Nervoso Central

(SNC), o subtipo $Na_v1.4$ nos músculos esqueléticos, $Na_v1.5$ no músculo cardíaco e os subtipos $Na_v 1.7-1.9$ em nervos do Sistema Nervoso Periférico (SNP)(GOLDIN, 2001)(CATTERALL, 2012)(**Quadro 2**). Essas isoformas se diferenciam graças a pequenas modificações nas sequências de aminoácidos, o que proporciona uma característica diferenciada a cada subtipo.

Quadro 2 Isoformas de Canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Em destaque estão mostrados os genes responsáveis pela geração destes canais e a localização no sistema humano de cada subtipo conhecido. Baseado em (CATTERALL, 2012)

Subtipo de Canal	Gene associado	Localização
Nav 1.1	SCN1A	Sistema Nervoso Central
Nav 1.2	SCN2A	Sistema Nervoso Central
Nav 1.3	SCN3A	Sistema Nervoso Central
Nav 1.4	SCN4A	Musculo Esquelético
Nav 1.5	SCN5A	Musculo Cardíaco
Nav 1.6	SCN8A	Sistema Nervoso Central
Nav 1.7	SCN9A	Sistema Nervoso Periférico
Nav 1.8	SCN10A	Sistema Nervoso Periférico
Nav 1.9	SCN11A	Sistema Nervoso Periférico

Uma série de doenças estão relacionadas a mutações nos genes responsáveis pela expressão desses canais, conhecidas como canalopatias, o que gerou mais interesse no estudo do funcionamento e interação de diversos compostos com estes canais. Entre as canalopatias, estão os casos de epilepsias relacionadas aos subtipos Nav 1.1, 1.2, 1.3 e 1.6, os casos de paralisias musculares com subtipo Nav 1.4, os problemas cardíacos relacionados ao Nav 1.5 e as dores extremas associadas a mutações no subtipo Nav 1.7 (HUANG et al., 2017). Além disso, diversas neuropatias

também estão associadas a mutações em Nav 1.8 (CATTERALL, 2012)(HUANG et al., 2017).

Quadro 3 Subtipos de canais de sódio, genes associados e doenças relacionadas à cada subtipo. Baseado em (HUANG et al., 2017)

Subtipo de Canal	Genes Mutados	Doenças Relacionadas
Nav 1.1	SCN1A	-Epilepsia Generalizada com convulsões febris, encefalopatia epilética, epilepsia infantil tônico crônica, enxaqueca e convulsões febris
Nav 1.2	SCN2A	-Convulsões, encefalopatia epilética, epilepsia mioclônica grave da infância e Síndrome de Dravet
Nav 1.3	SCN3A	-Epilepsia parcial criptogênica
Nav 1.4	SCN4A	-Paramitomia congênita de von Eulenburg, paralisia periódica, miotonia, Síndrome Miastênica
Nav 1.5	SCN5A	-Bloqueio cardíaco familiar progressivo, Síndrome do QT longo, Síndrome de Brugada, Síndrome do nó sinusal, fibrilação ventricular, Síndrome da morte súbita infantil, paralisia atrial, cardiomiopatias, fibrilação atrial e Contração prematura multifocal ectópica (MEPPC)
Nav 1.6	SCN8A	-Encefalopatia epilética
Nav 1.7	SCN9A	-Eritermalgia primária, dor extrema paroxística, Síndrome de Dravet
Nav 1.8	SCN10A	-Neuropatia das pequenas fibras
Nav 1.9	SCN11A	-Síndrome da dor familiar episódica

1.4.3 Sítios de interação

Com o conhecimento da estrutura do canal de sódio obtido nos anos 80 e 90 (CATTERALL, 1986; MARBAN, 1998), passou-se a buscar os alvos das neurotoxinas que tanto auxiliaram na elucidação das características estruturais destes canais, e buscar uma aplicação para estes compostos (BAGAL et al., 2015). Inicialmente, foram demonstrados quatro sítios de interação, porém, com o passar dos anos, com o surgimento de novas toxinas e com o

desenvolvimento e aprimoramento das técnicas para a avaliação de suas atividades, novos locais de interação passaram a ser descritos.

O sítio 1 é a região de ação das toxinas conhecidas como guanidinas heterocíclicas, como a tetrodoxina (TTX) e a saxitoxina (STX). Essas toxinas são capazes de se ligar no canal de sódio na parte extracelular da membrana e causar o bloqueio na condutância deste canal (CESTÈLE; CATTERALL, 2000). O sítio 2 é onde ocorre a interação das toxinas lipossolúveis, como a veratridina e a batracotoxina. Essas toxinas são capazes de manter os canais de sódio abertos por mais tempo, deixando-os ativados, graças a um bloqueio na região de inativação do canal, alterando assim a dependência de voltagem do canal para potenciais mais negativos (CATTERALL, 1986; CESTÈLE; CATTERALL, 2000)(STEVENS; PEIGNEUR; TYTGAT, 2011).

O sítio 3 é alvo dos polipeptídios como as α -toxinas escorpiônicas e as toxinas de anêmonas. Essas toxinas agem diminuindo ou bloqueando a inativação rápida do canal de sódio. Já o sítio 4 é alvo de uma classe de toxinas consideradas mais recentes, que são as β -toxinas de escorpião. Essas toxinas tendem a alterar a dependência de voltagem da membrana, o que dificulta a abertura do canal e reduz a amplitude da condutância ao sódio (CATTERALL, 1986; CESTÈLE; CATTERALL, 2000) (STEVENS; PEIGNEUR; TYTGAT, 2011).

Os sítios de interação 5 e 6 foram mostrados e conhecidos recentemente, o que resulta em poucas informações sobre os mesmos. As toxinas que agem no sítio 5, como as toxinas de dinoflagelados marinhos, são capazes de alterar a ativação dos canais para potenciais mais negativos e ainda reprimir a inativação dos mesmos. Por outro lado, o sítio 6 é alvo das δ -conotoxinas, agindo sobre o S4 domínio IV são capazes de diminuir a inibição dos canais de sódio (CATTERALL, 1986; CESTÈLE; CATTERALL, 2000; STEVENS; PEIGNEUR; TYTGAT, 2011)(STEVENS; PEIGNEUR; TYTGAT, 2011).

Quadro 4 Sítios de interação das neurotoxinas nos canais de sódio. Demonstrados os locais de interação de cada sítio nos canais de sódio, as neurotoxinas mais conhecidas que agem em cada local e o efeito causados nestes canais. Modificado de (CATTERALL, 1986).

Sítio de interação	Neurotoxinas	Ação das neurotoxinas
1 (loop S5-S6)	Tetrodotoxinas, Saxitoxinas	-Bloqueio na condutância do canal
2 (S6 DI-DII)	Veratridina, Batracotoxina.	-Manutenção da abertura do canal
3 (S3-S4 DIV)	α -toxinas escorpiônicas	-Bloqueio na inativação do canal
4 (S1-S2; S3-S4 DII)	β -toxinas escorpiônicas	-Redução na amplitude do pico da corrente de sódio -Alteração na voltagem da membrana
5 (S6 DI)	Brevetoxinas (PbTx) e ciguatoxinas	-Mudança nos potenciais de ação para mais negativos
6 (S4 DIV)	δ -conotoxinas	-Repressão da inativação -Inibição na inativação dos canais de sódio neuronais (BARBIER et al., 2004)

1.5. AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

A elucidação do processo de excitabilidade elétrica das células foi algo desejado por diversos cientistas, porém, apenas em 1952, Hodkin e Huxley foram capazes de descrever tal processo, o que facilitou o entendimento do processo de propagação do potencial de ação, explicado pelo papel fundamental dos canais de sódio e potássio (HODGKIN; HUXLEY, 1990). Com

a descoberta de neurotoxinas capazes de agir sobre estas estruturas, os estudos começaram a se intensificar e revelar novas características como a seletividade e fluxo por íons, e afinidade destas toxinas por canais iônicos(CATTERALL, 2000, 1986).

Com o intuito de analisar a atividade das neurotoxinas sobre os canais iônicos, uma série de técnicas e metodologias foram desenvolvidas, entre elas a técnica de *patch clamp*. Primeiramente citada em 1976 por Erwin Neher e Bert Sakmann, a técnica de *patch clamp* tornou-se um marco na comunidade científica, rendendo a esses dois pesquisadores o Prêmio Nobel de medicina em 1991. Esta técnica permite, por meio do uso de uma pequena pipeta de vidro e um amplificador, isolar uma pequena fração da membrana, estimular e captar os estímulos elétricos gerados com o auxílio de soluções eletrolíticas(KORNREICH, 2007; OGDEN; STANFIELD, 1981). Desde de então, o uso desta técnica vem se tornando fundamental e imprescindível para a elucidação de inúmeros compostos capazes de interagir com canais iônicos presentes na membrana plasmática.

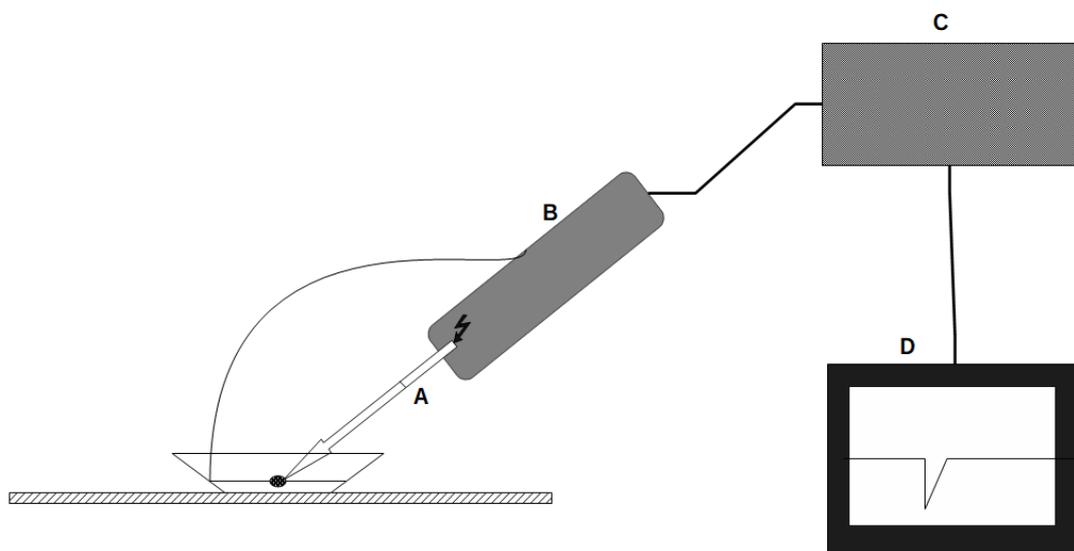


Figura 6 Esquema básico da estrutura de um *patch clamp*. Demonstração da estrutura e partes de um *patch clamp*. (A) Micropipeta preenchida com solução interna que interage com a célula banhada por solução externa em uma placa; (B) pré-amplificador com o eletrodo capaz de gerar os estímulos conectado a um micro-manipulador; (C) amplificador que capta e gera o sinal; (D) computador que recebe os resultados obtidos mostrando os registros. Imagem: Daniel Oliveira da Mata. Baseado em (KORNREICH, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Cada vez mais vem crescendo o interesse por novos compostos capazes de auxiliar e melhorar os fármacos e produtos já existentes. Há bastante tempo se conhece que escorpiões, aranhas e anfíbios possuem em suas peçonhas e secreções substâncias altamente poderosas que precisariam ser estudadas com maior atenção, a fim de descrever os seus alvos moleculares, saber seus mecanismos de ação e os efeitos que as mesmas eram capazes de causar.

Diversas doenças são acarretadas devido ao mal funcionamento de canais iônicos, sendo estas doenças conhecidas como canalopatias. Com relação aos canais de sódio, defeitos em diferentes subtipos de canais podem levar a diferentes tipos de doenças tais como epilepsias (Nav 1.1 e 1.2), arritmias cardíacas (Nav 1.5), paralisias temporárias (Nav 1.4), doenças relacionadas a dor (1.3, 1.7, 1.8 e 1.9) e ainda algumas doenças cerebrais (Nav 1.6), que atingem inúmeras pessoas ao redor do mundo (BAGAL et al., 2015).

Com isso, o estudo de toxinas capazes de interferir no funcionamento de diversos subtipos de canais iônicos vem se tornado cada dia mais importante, uma vez que elas podem auxiliar tanto na elucidação do modo como estas toxinas se ligam nestes canais, quanto quais os efeitos esses peptídeos podem causar a estes canais, auxiliando assim no melhor entendimento destas doenças e na provável geração de novos tratamentos.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar a atividade eletrofisiológica da toxina Tf1a isolada da peçonha de *Tityus fasciolatus* em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) de humanos, inseto e aracnídeo utilizando a técnica de *patch clamp* nos modos *whole cell* e *Two-electrode voltage-clamp*.

Objetivos específicos:

- Identificar e analisar a toxina Tf1a purificada da peçonha de *Tityus fasciolatus*;
- Caracterizar a atividade da toxina Tf1a sobre sete subtipos canais de sódio dependentes de voltagem de humano (Nav 1.1 a 1.7) utilizando a técnica de *patch clamp* no modo *whole-cell*;
- Caracterizar a atividade da toxina Tf1a sobre os subtipos canais de sódio BgNav1 (*Blattella germanica*) e VdNav1 (*Varroa destructor*) utilizando a técnica de *Two-electrode voltage-clamp*.

4. MATERIAS

4.1. Soluções para HPLC

- 4.1.1 - Solvente B (solução de Acetonitrila)
 - Acetonitrila grau HPLC (JT Baker) a temperatura ambiente.
 - 0,1% de TFA (JT Baker) grau HPLC a temperatura ambiente.

- 4.1.2 - Solvente A (H₂O + TFA)
 - Água Deionizada (Milli-Q)
 - 0,12% de TFA grau HPLC (JT Baker) a temperatura ambiente.

4.2. Meios e soluções para cultura de células

- 4.2.1 - Meio para células HEK (*Human Embryonic Kidney*)
 - Meio DMEM (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*)
 - 4,5% de Glicose,
 - 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab)
 - 1% de MEM (*Non Essential Aminoacids*)
 - Antibiótico G418 (0,4 mg/mL) (Sigma).

- 4.2.2 - Meio para células CHO (*Chinese Hamster Ovary*)
 - Meio DMEM (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*)
 - 4,5% de Glicose
 - 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab)
 - Antibiótico G418 (0,5mg/mL) (Sigma).

- 4.2.3 - Meio para oócitos de *Xenopus laevis*
 - NaCl 96 mM
 - KCl 2 mM
 - CaCl₂ 1,8 mM
 - MgCl₂ 2mM
 - HEPES 5mM
 - 50 µg/mL sulfato de gentamicina.

pH 7,4

- 4.2.4 - PBS
 - NaCl 137 mM
 - KCl 2,7 mM
 - Na₂HPO₄.2H₂O 10 mM
 - KH₂PO₄ 2 mM

pH 7,4

- 4.3.5 - Tripsina-EDTA

- Tripsina 2,5 g
 - EDTA 0,2 %
- pH 7,4

- Os compostos foram diluídos em 1L de PBS.

4.3. Soluções para ensaios eletrofisiológicos

- 4.3.1 - Solução Interna usada nos testes em canais de humanos

- CsF 105 mM
 - CsCl 27 mM
 - NaCl 5 mM
 - MgCl₂ 2 mM
 - EGTA 1 mM
 - HEPES 10 mM
- pH 7,3 corrigido com CsOH.

- 4.3.2 - Solução Externa usada nos testes em canais de humanos

- NaCl 130 mM
 - KCl 5 mM
 - CaCl₂ 2 mM
 - MgCl₂ 2 mM
 - HEPES 10 mM
 - Glicose 10 mM
- pH 7,4 corrigido com NaOH.

- 4.3.3 - Solução Externa usada nos testes em canais de inseto e aracnídeo

- NaCl 96 mM
 - KCl 2 mM
 - CaCl₂ 1,8 mM
 - MgCl₂ 2 mM
 - HEPES 5 mM
- pH 7,4 corrigido com NaOH.

- 4.3.4 - Solução Interna usada nos testes em canais de inseto e aracnídeo

- KCl 2 mM

5. MÉTODOS

5.1 Purificação do peptídeo

Foram coletados cerca de 30 indivíduos de *Tityus fasciolatus* da região do Setor de Mansões do Lago Norte, Brasília, DF sob licença do IBAMA nº 19138-1. Estes animais eram mantidos em cativeiro no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, onde receberam água *ad libitum* e foram alimentados periodicamente com baratas (CAMARGOS, 2014).

Foram então realizadas extrações periódicas da peçonha bruta por meio de estimulação elétrica do telson e a peçonha, após centrifugada, foi fracionada utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,60 mm, 4 micron, Phenomenex Inc., USA). A separação foi feita utilizando um gradiente linear de solução A e B de 0 a 60%, com um fluxo de 1mL/min por 60 minutos e todas as frações foram manualmente coletadas e secas a vácuo (CAMARGOS, 2014).

Com o intuito de obter o peptídeo de interesse puro, foram realizados três passos de recromatografia, sendo o primeiro utilizando um gradiente de 0,5 %/min, o segundo um gradiente de 0,5 %/min a 45°C, e por último um gradiente de 0,3 %/min a 45°C (CAMARGOS, 2014). Todas as frações obtidas foram secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

5.2. Avaliação da Massa Molecular (MW)

A fração obtida das etapas de recromatografia que correspondia à toxina de interesse (Tf1a) foi aplicada em placa de MALDI Anchorchip (600 mm) utilizando ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) diluído em uma solução de acetonitrila/água Milli-Q/TFA 3%; 5:4:1 (v:v:v) nas proporções 1:1 e 1:3. A massa molecular média da amostra foi obtida em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) no modo linear positivo e analisadas por meio do *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

5.3. Sequenciamento Parcial do peptídeo

O sequenciamento parcial do peptídeo foi realizado utilizando o MALDI-TOF-TOF com o método de *In Source Decay* (ISD). Para isso, a amostra foi colocada em uma solução/matriz redutora de 1,5-diaminonaphtaleno (DAN) e colocada sobre a placa de MALDI. A massa molecular e a sequência parcial

obtidas foram comparadas às sequências obtidas da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *Tityus fasciolatus* (Camargos, 2014).

5.4. Quantificação do peptídeo

A quantificação do material obtido foi realizada utilizando espectrofotômetro (UV 1800, Shimadzu). O peptídeo foi ressuspenso em 1mL de H₂O deionizada e então colocada em uma cubeta de quartzo. Foi então a 280nm a fim de obter a absorbância do material e então calcular a quantidade de material obtido (µg/mL), utilizando a fórmula demonstrada abaixo:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Abs280}}{E \times B}$$

No qual Abs 280 é igual a absorbância lida a 280nm, B é o caminho ótico percorrido, que neste caso é 1, e E é o coeficiente de extinção molecular da amostra obtido através do site *Expasy/protparam* (<https://www.expasy.org/>).

5.5 Caracterização Eletrofisiológica

5.5.1 Cultura de células para canais de humano

Foram utilizadas células do tipo HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) expressando canais iônicos Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.4, Na_v1.5 e Na_v1.6. Estas células eram descongeladas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de MEM (*Non Essential Aminoacids*) e antibiótico G418 (0,4 mg/mL). Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) expressando canais iônicos Na_v1.7 também foram utilizadas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e antibiótico G418 (0,5 mg/mL). As células eram então incubadas em uma estufa com 5% de CO₂, a temperatura constante de 37 °C. A cada 48 horas, o meio de cultura era retirado, as células eram lavadas com solução de PBS, e em seguida desaderidas com solução de tripsina. Em seguida as células eram passadas para um novo frasco de cultivo, com meio novo.

5.5.2 Ensaios Eletrofisiológicos em canais de humano

A fim de avaliar a atividade de toxina Tf1a foi utilizada a técnica de *patch clamp* no modo *whole cell* (HEKA Patch clamp EPC 10) à temperatura ambiente (21 a 25°C). As micropipetas utilizadas nos experimentos eram constituídas de vidro borosilicato e possuíam uma resistência entre 1,5-3 MΩ. As mesmas eram preenchidas com solução interna (item 4.3.1) e o banho extracelular era preenchido com 200 μL de solução externa (item 4.3.2). Foi utilizado um filtro de 5 kHz nos registros de corrente iônicas, uma compensação da resistência em série de 70% em todos os experimentos e as correntes capacitivas também foram compensadas durante os registros.

Para a avaliação da probabilidade de abertura do canal durante ativação e inativação e inibição de corrente, foi utilizando um protocolo no qual o potencial de repouso foi estipulado em -100 mV e então era realizado um protocolo de estímulo no qual eram gerados pulsos com diferentes voltagens (-90 até 15 mV) em intervalos de 2 s e um estímulo final de -10 mV por um período de 10 ms. Com o intuito de avaliar a dependência de pré-pulso (30 mV) para a ação nestes canais, foram realizados ensaios tanto na presença quanto na ausência do pré-pulso (**Figura 7**).

Para a avaliação da recuperação da inativação lenta, foi realizado um protocolo utilizando dois pulsos de mesma voltagem (-10 mV) de 20 a 60 ciclos, no qual a cada ciclo ocorre um acréscimo de 2ms em cada pulso, resultando ao final de intervalo máximo entre os pulsos de aproximadamente 120 ms.

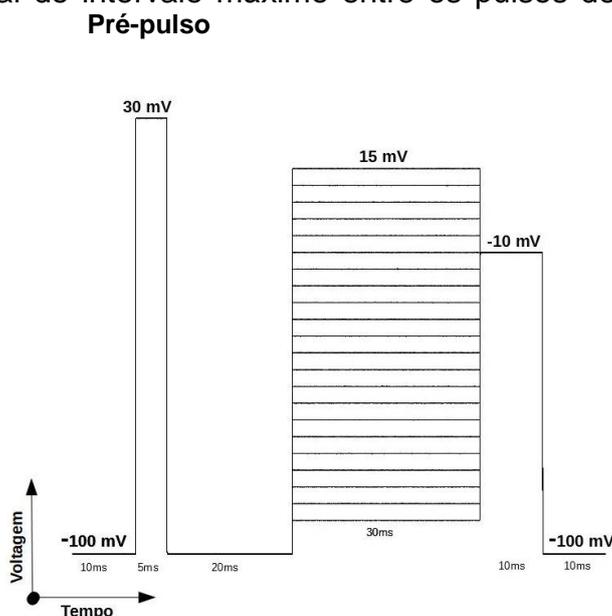


Figura 7 Protocolo de estímulo utilizando para realização dos ensaios eletrofisiológicos.

5.5.3 Análise dos Dados dos canais de humano

Os dados obtidos dos ensaios eletrofisiológicos foram inicialmente avaliados utilizando o *software* FitMaster (Heka Eletronik). Após a análise inicial dos dados, todos os cálculos e gráficos foram realizados utilizando o programa *Origin8* (Originlab, Northampton, MA, USA) Foram avaliados diversos parâmetros tais como a fração não inibida da corrente, alteração na probabilidade de abertura (P_o) ou *shift* de voltagem tanto na ativação quanto na inativação lenta dos canais e a recuperação lenta destes canais (τ).

Para analisar a alteração na probabilidade de aberturas (P_o) na ativação, os dados de corrente por voltagem (I/V) obtidos foram convertidos em condutância por voltagem (G/V) utilizando a fórmula 1 e ajustados em uma função de Boltzmann (fórmula 2).

$$g = \frac{I_{Na}}{(V-V_{Na})} \quad (1)$$

$$g = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/k\}}} \quad (2)$$

Com intuito de comparar os ensaios na presença e na ausência de toxina, foram utilizados os valores de $V_{1/2}$ obtidos por meio da função de Boltzmann (X_0). O $V_{1/2}$ representa a voltagem na qual metade dos canais se encontram no estado aberto. Já o k e kh são o fator de inclinação da reta, que está relacionado a sensibilidade do canal a voltagem e V a voltagem.

Para analisar a alteração na probabilidade de abertura (P_o) na inativação lenta foram utilizados os dados de corrente por voltagem (I/V) ajustados em uma função de Boltzmann (fórmula 3). Na avaliação da inativação, também foram utilizados os dados de $V_{1/2}$ para comparar os ensaios com e sem a presença da toxina.

$$i = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/kh\}}} \quad (3)$$

Já para a obtenção das frações não inibidas (F_u) da corrente foram utilizados os dados de corrente máxima obtidos nos ensaios com a presença e sem a toxina. Os dados foram normalizados e tiveram então sua média calculada. Para a obtenção da fração não inibida os dados foram então calculados utilizando a fórmula 4.

$$\text{Fração não inibida } (F_u) = \left(\frac{I/I_{\max\text{Toxina}}}{I/I_{\max\text{Controle}}} \right) \quad (4)$$

Para a avaliação da recuperação da inativação lenta, foi utilizada uma função exponencial (fórmula 5),

$$y = y_0 + y_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (5)$$

no qual, Y_0 representa a amplitude inicial de cada ponto na curva, y_1 é a amplitude final, t é o tempo para cada ponto de inativação e τ é a constante tau da inativação. A constante tau foi entre o controle e a toxina foi então comparada afim de gerar um $\Delta\tau$.

5.5.4 Cultura de células usadas nos ensaios com canais de inseto e aracnídeo

Para os ensaios em canais de insetos e aracnídeos foram utilizados oócitos de *Xenopus laevis* transfectados com RNA de canais do tipo BgNav1 (*Blattella germanica*) e VdNav1 (*Varroa destructor*). Essas células eram cultivadas utilizando solução contendo (em mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1,8 CaCl₂, 2 MgCl₂ e 5 HEPES (pH 7,4), suplementado com 50 µg/mL de sulfato de gentamicina.

5.5.5 Ensaios Eletrofisiológicos em canais de inseto e aracnídeo

Foram realizados ensaios utilizando o método de *Two-electrode voltage-clamp* à temperatura ambiente (18–22°C) usando o amplificador Geneclamp 500 (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) controlado pelo sistema de aquisição pClamp (Axon Instruments, Union City, CA, USA). As micropipetas utilizadas nos experimentos eram constituídas de vidro borossilicato e possuíam uma resistência entre 0,8-1,5 MΩ. Foi utilizado um filtro de 2 kHz nos registros

de corrente iônicas, e amostradas a 20kHz utilizando um filtro passa baixa de 4 polos.

Para a avaliação de todos os parâmetros, tais como inibição de correntes e alteração na probabilidade de abertura da ativação e da inativação, foram utilizados três protocolos diferentes. Para a avaliação das correntes de sódio foi realizado um estímulo de 100 ms a voltagem máxima, adquirida por meio da realização de controles. Para obtenção da relação corrente voltagem na ativação (I/V) foi realizado um protocolo na qual a voltagem de membrana era mantida a -90 mV e então eram realizados estímulos entre -90 e 70 mV com intervalos de -5 mV em um tempo total de 50ms. Já para a inativação, foi realizado um pré-pulso com uma variação de voltagem de -90 e 70 mV por 100 ms, então era feito um segundo estímulo de -30 ou -10 mV. .

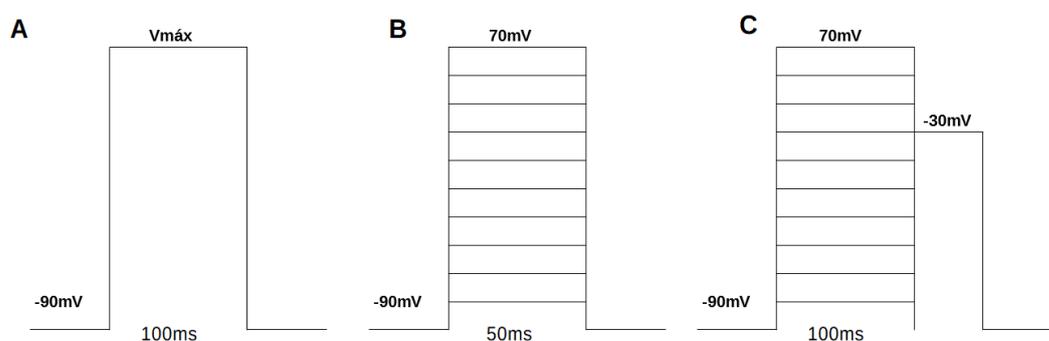


Figura 8 Protocolo de estímulo utilizado nos ensaios em canais de inseto e aracnídeo. (A) Protocolo para a avaliação da inibição de corrente. (B) Protocolo para a obtenção da relação corrente/voltagem (I/V) da ativação. (C) Protocolo para relação I/V da inativação.

5.5.6 Análise dos Dados obtidos nos ensaios com canais de inseto e aracnídeo

Todos os dados obtidos dos experimentos realizados com canais de inseto e aranha foram avaliados segundo o mesmo parâmetro descrito no item 5.5.3 e com o uso da fórmula 2 nas análises de *shift* da ativação. Na inativação, foi utilizado um fator adicional, mostrado como C, que representa a constante de fração persistente não ativada. Com isso foi gerada a fórmula $I_{Na}/I_{max} = ((1-C)/\{1+\exp[(V-V_h)/k_h]\}) + C$ utilizada para a análise do *shift* na inativação. Todas as análises foram feitas no pClamp Clampfit 10.4 (Molecular Devices) e no Origin 7.5 software (Originlab, Northampton, MA, USA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Perfil Cromatográfico e purificação

Utilizando 1 mg de peçonha bruta de *Tityus fasciolatus* foi possível gerar o perfil cromatográfico observado na Figura 9. Todas as frações foram coletadas manualmente e tiveram as massas moleculares dos componentes avaliadas por espectrometria de massa (MS). No total, foram identificados cerca de 210 componentes, demonstrando assim a grande variabilidade de compostos presente na peçonha deste animal (CAMARGOS, 2014). A fração de interesse, eluída entre 40 e 42% de acetonitrila conforme indicado na cromatografia de peçonha bruta (Figura 9), foi separada e recromatografada em três passos (Figura 9 A, B e C) a fim de se obter o peptídeo puro para a realização dos ensaios eletrofisiológicos.

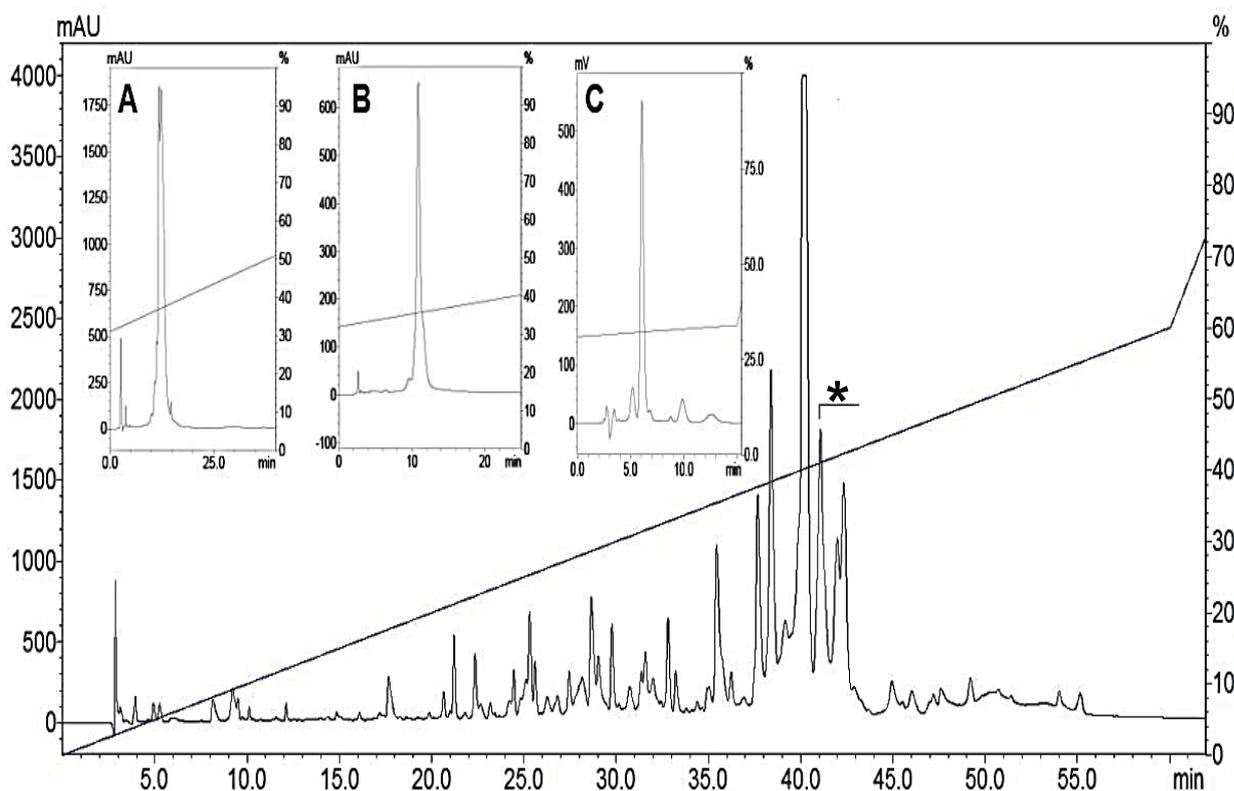


Figura 9 Perfil cromatográfico da peçonha bruta de *Tityus fasciolatus*. Em destaque o peptídeo de interesse (Tf1a). (A) Primeiro passo de recromatografia (B) Segundo passo de recromatografia (C) Terceiro passo de recromatografia e purificação da toxina Tf1a.

6.2 Avaliação da massa molecular e sequenciamento parcial do peptídeo

A fração de interesse destacada na **Figura 9** foi então separada e teve inicialmente a sua massa molecular avaliada utilizando a técnica de espectrometria de massa (MS) segundo item 5.2. Foi obtida uma massa média $[M+H^+]= 6927,5$ (**Figura 10**).

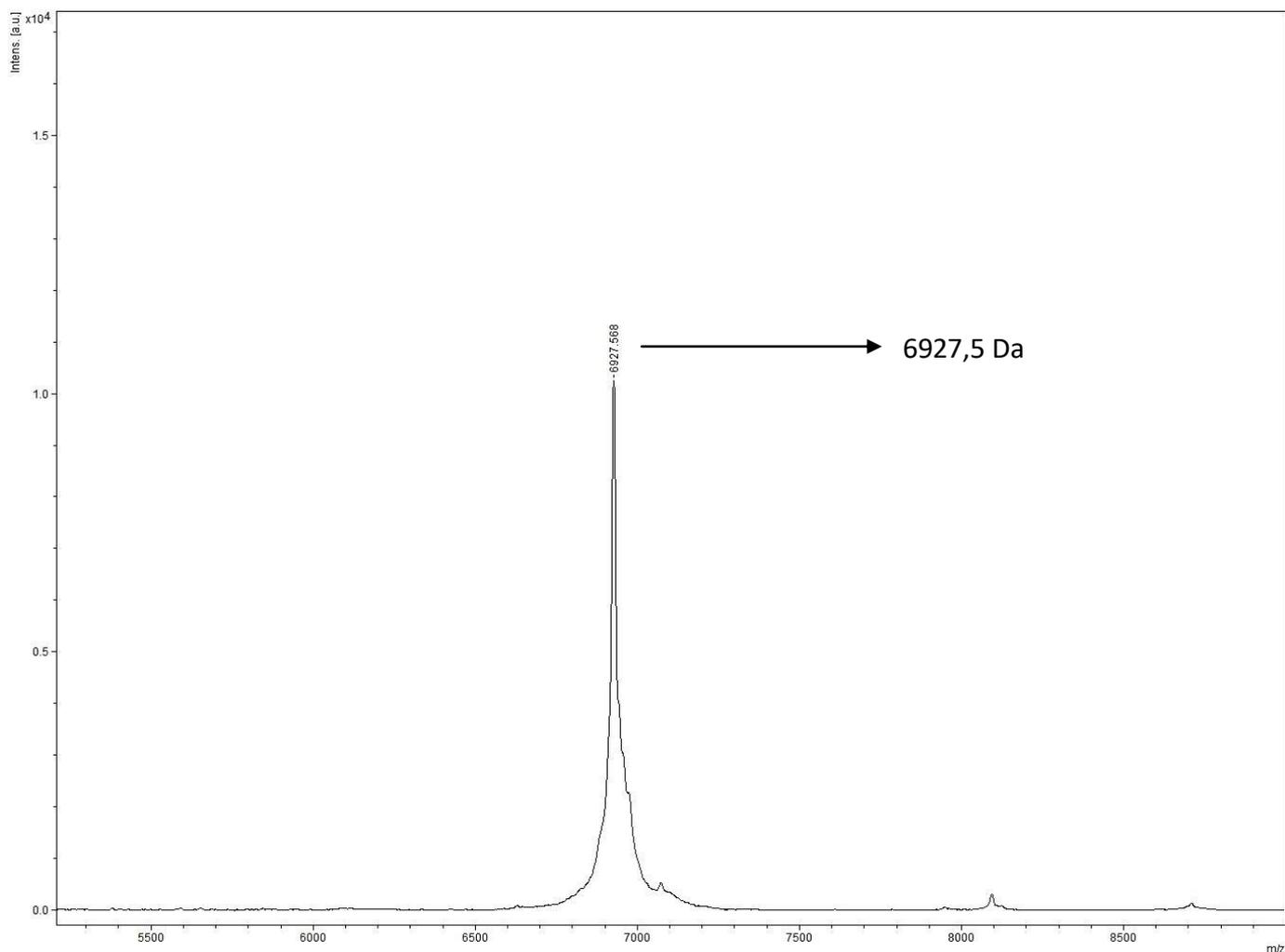


Figura 10 Massa molecular média $[M+H^+]$ obtida da fração de interesse purificada da peçonha de *Tityus fasciolatus* utilizando a técnica de espectrometria de massa (MS) no modo linear.

Por meio de espectrometria de massa (MS), e conforme o item 5.3, foi obtida a sequência parcial do peptídeo (**Figura 11**).

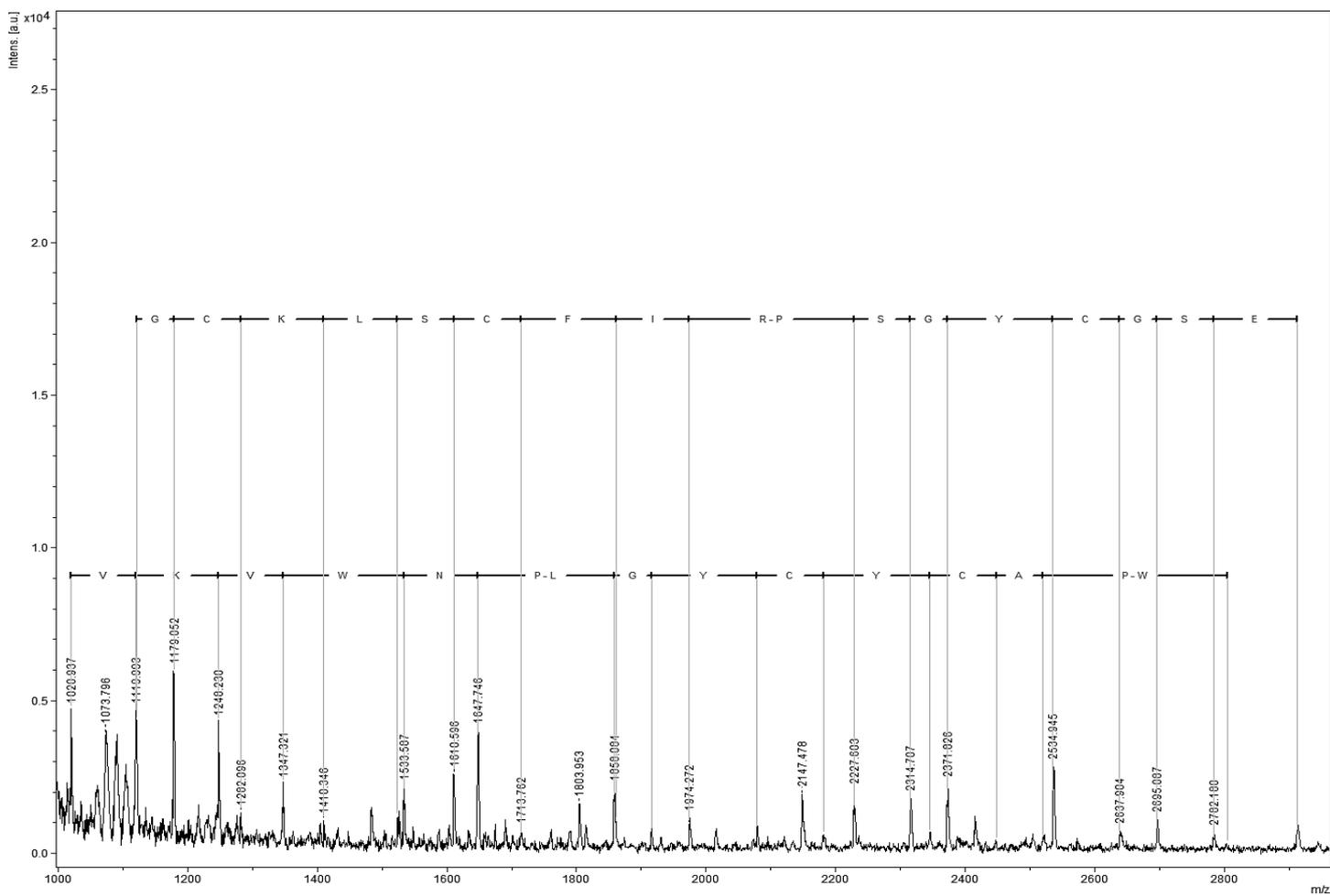


Figura 11 Sequência parcial do peptídeo obtida por meio da técnica de espectrometria de massa (MS) pelo método de *In Source Decay* (ISD).

Utilizando os dados de massa molecular e sequência parcial do peptídeo obtido, foi realizada uma comparação com os dados prévios do transcrito da glândula de peçonha de *Tityus fasciolatus* realizado por (CAMARGOS, 2014). Foi possível observar que os dados obtidos de massa molecular e sequência parcial corresponderam com a sequência precursora de uma provável NaScTx encontrada no transcrito (Figura 12). Tal precursor é composto por 255 nucleotídeos até a região do códon de parada, sendo a região codificadora do peptídeo composta por um peptídeo sinal de 20 resíduos de aminoácidos, e o peptídeo maduro composto por 61 resíduos de aminoácidos. Além disso, é possível observar na porção C-terminal a presença da sequência GKK conhecida como sinal de amidação. Tal modificação pós-traducional tem se mostrado bastante importante para a atividade de algumas toxinas, dentre elas a Ts1. (COELHO et al., 2014) foram capazes de comparar

a atividade da toxina Ts1 no estado amidada e não amidada. Foi observado que a toxina que não sofreu o processo de amidação teve a sua atividade reduzida sobre canais de sódio, demonstrando assim a importância deste processo para a atividade de algumas neurotoxinas.

1	ATG AAA GGA ATG ATC TTG TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GGC	45
1	<u>M K G M I L F I S C L L L I G</u>	15
46	ATT GTC GTA GAA TGT AAA GAA GGT TAC CTC ATG GAT CAC GAA GGT	90
16	<u>I V V E C</u> <u>K E G Y L M D H E G</u>	30
91	TGC AAA CTT AGT TGC TTT ATC AGA CCA TCG GGA TAC TGC GGC AGT	135
31	<u>C K L S C F I R P S G Y C G S</u>	45
136	GAA TGC AAA ATT AAA AAG GGC TCA TCG GGC TAT TGC GCC TGG CCA	180
46	<u>E C K I K K G S S G Y C A W P</u>	60
181	GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAG	225
61	<u>A C Y C Y G L P N W V K V W E</u>	75
226	AGA GCA ACG AAC AGA TGT GGC AAA AAA TAA	255
76	<u>R A T N R C</u> G K K Stop	

Figura 12 Sequência nucleotídica do precursor de uma provável toxina de sódio (NaScTx) obtida do transcrito de *Tityus fasciolatus* (CAMARGOS, 2014) e sequência peptídica correspondente. Em cinza está mostrado o peptídeo sinal, sublinhado a sequência do peptídeo maduro e em azul o sinal de amidação.

Sequência do Transcritoma - KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGSECKIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKWVERATNRC
Sequência Parcial Obtida - -----GCKLSCFIRPSGYCGSE-----WPACYCYGLPNWVKV-----

Figura 13 Comparação/alinhamento das sequências peptídicas. Em preto podemos observar a sequência obtida do transcrito da glândula de peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*. Em vermelho, a sequência parcial do peptídeo purificado e obtida por meio do uso do espectrometria de massa (MS).

A partir do dado da sequência precursora do transcrito foram calculadas as massas moleculares médias teóricas dos peptídeos maduros com e sem a região C-terminal amidada, resultando nos valores $[M+H^+]= 6926,9$ Da e $[M+H^+]= 6927,9$ Da levando em consideração a perda dos três últimos resíduos de aminoácidos, respectivamente. Ao compararmos com a massa molecular média experimental, podemos observar uma maior aproximação com a massa molecular teórica do peptídeo não amidado. Embora seja possível confirmar que o sinal de amidação (GKK) tenha sido clivado durante o processamento do

peptídeo maduro, não é possível assegurar a amidação do mesmo por meio da técnica de espectrometria de massas usada no presente trabalho.

A sequência do peptídeo maduro foi comparada às sequências disponíveis nos bancos de dados públicos por meio da ferramenta *online BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ademais, foi realizado o alinhamento das sequências de β -NaScTx descritas para o gênero *Tityus* que se mostraram similares ao peptídeo estudado no presente trabalho utilizando o programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)(**Figura 14**). Foi obtida uma identidade de 97% com a toxina Tb1 de *T. bahiensis*, 96% com a toxina Tt1g de *T. trivittatus* e 92% com a toxina Ts1 de *T. serrulatus*. Além disso, o peptídeo de interesse mostrou uma menor identidade pela toxina Tz1 de *T. zulianus* (64%) e pela toxina Tf2 (72%), toxina purificada também da peçonha de *T. fasciolatus* com atividade comprovada em canais de sódio (CAMARGOS et al., 2015). Baseado nos dados de identidade é possível sugerir que o peptídeo de interesse seja uma β -toxina.

Diversos modelos foram desenvolvidos para nomear novas toxinas descritas, tais como (KING et al., 2008) que propuseram a nomenclatura baseada na atividade de toxina, fonte biológica e semelhança com outras toxinas. (GUERRERO-VARGAS et al., 2012) também propuseram uma classificação na qual as toxinas foram divididas em 14 subfamílias segundo a posição das cisteínas e de domínios conservados. Entretanto, muitos destes modelos não passaram a ser muito utilizados para nomear toxinas de escorpião, sendo assim para este trabalho a toxina estudada foi denominada utilizando os parâmetros usuais de classificação baseado no escorpião de onde a mesma foi encontrada e a semelhança com outras toxinas disponíveis em bancos de dados. Com isso a toxina foi nomeada Tf1a uma vez que Mendes e colaboradores (MENDES et al., 2015) descreveram do transcrito da glândula de peçonha de *Tityus fasciolatus* o precursor denominado Tf1. Conforme pode ser observado na **Figura 14**, entre a toxina Tf1a e o precursor Tf1 (MENDES et al., 2015) há, somente, diferenças nos resíduos de aminoácidos nas posições 25, com uma serina na Tf1a e uma arginina na Tf1, e 28, uma lisina e uma alanina, respectivamente. Além disso, ambas possuem massas moleculares médias teóricas diferentes ($[M+H^+]$ Tf1 = 6938,6 e $[M+H^+]$ Tf1a = 6926,9), sugerindo assim não se tratava da mesma toxina. Essa

variabilidade pode ocorrer graças a diversos fenômenos gênicos tais como polimorfismo, duplicação e *tran-splicing*, gerando assim toxinas diferentes mesmo em animais da mesma espécie, ocorrendo assim de forma natural em diversos organismos (ZHIJIAN et al., 2006).

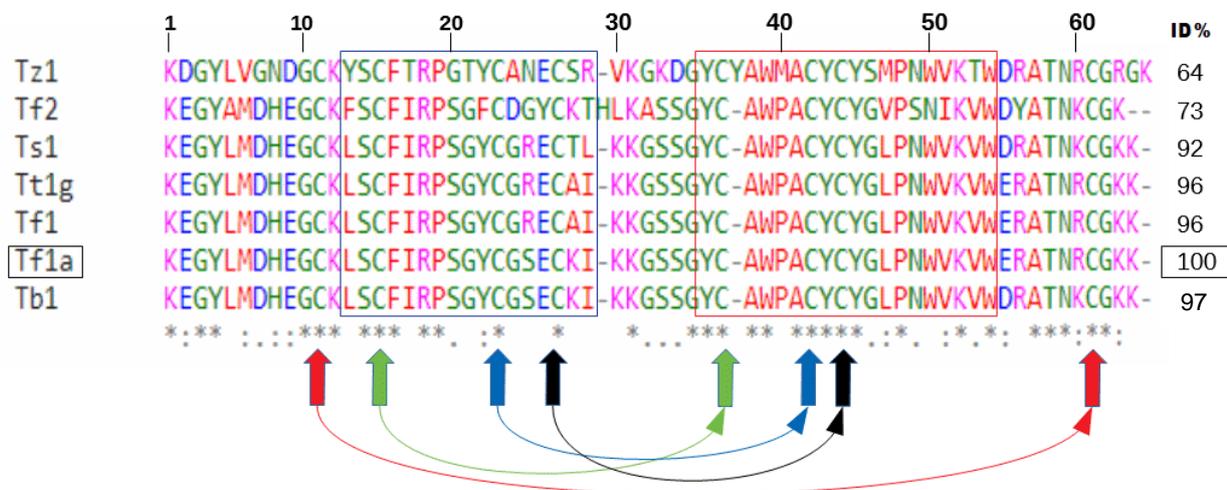


Figura 14 Alinhamento de sequência da Tf1a com outras toxinas descritas de peçonhas de espécies do gênero *Tityus* utilizando o programa ClustalW e grau de identidade das sequências com o peptídeo estudado. As setas representam os locais das cisteínas e suas devidas ligações e formação das pontes dissulfeto. ID%: porcentagem de identidade. (*) resíduos de aminoácidos idênticos;(:) substituição conservativa;(.) substituição semi-conservativa. Vermelho: resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (-Y); Azul: resíduos de aminoácidos ácidos (carregados negativamente); Rosa: resíduos de aminoácidos básicos (carregados positivamente) (-H); Verde: resíduos de aminoácidos polares. Quadrado azul: região conservada da região farmacofórica; Quadrado vermelho: região conservada de resíduos de aminoácidos aromáticos na posição C terminal.

Neste trabalho não foram determinadas as estruturas secundárias ou terciária da toxina Tf1a, entretanto, sabe-se que as NaScTxS tendem a possuir estruturas conservadas, o que auxilia na dedução da elucidação da estrutura de novas toxinas descobertas. Observando o alinhamento realizado com outras beta toxinas de *Tityus* (**Figura 14**) pode-se notar a conservação na posição das cisteínas nestas toxinas incluindo a Tf1a. Esta é uma característica singular das NaScTx, que é demonstrado por outras toxinas de diversas espécies (ESCALON; POSSANI, 2013). A interação destas cisteínas para a formação das pontes dissulfeto ocorre entre as Cys C1-C8, C2-C5, C3-C6 e C4-C7, sendo cada uma destas ligações importantes para estabilização desta estrutura (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Tendo isso em vista e com os dados

da sequência e o alinhamento obtidos, podemos considerar que a toxina Tf1a possua as ligações dissulfeto do mesmo modo que outras neurotoxinas escorpiônicas que atuam em canais de sódio já estudadas, podendo assim possuir uma estrutura terciária característica dessas toxinas, se assemelhando assim a estrutura da Ts1 (*PDB:1B7D*) (**Figura 15**).

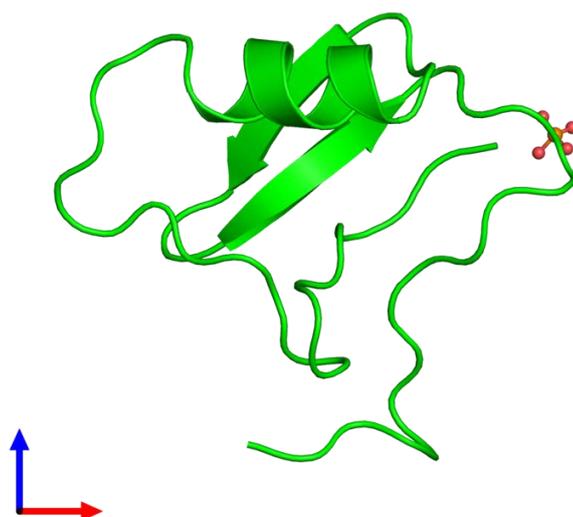


Figura 15 Representação da estrutura terciária da toxina Ts1 purificada da peçonha de *Tityus serrulatus*. *PDB:1B7D*.

Além das cisteínas, alguns resíduos de aminoácidos se mostram conservados na sequência destas toxinas e muitos deles têm papel fundamental na interação e atividade biológica sobre os canais de sódio, sendo eles Glu26 rodeado por resíduos hidrofóbicos (Leu13, Tyr22 e Ile29) presentes na região farmacofórica, e os resíduos aromáticos (Tyr4, Tyr36, Trp39, Tyr43, Tyr45 e Trp54) (ESCALON; POSSANI, 2013). Observando o alinhamento, podemos avaliar que os resíduos de aminoácidos essenciais da área farmacofórica estão presentes em todas as toxinas mostradas incluindo a Tf1a, com exceção da Tf2 que não possui nenhum dos resíduos de aminoácidos citados, a Tz1 que não possui a Leu13 e a Ile29 e Ts1 que não possui a Ile29. Já com relação aos resíduos aromáticos, pode-se notar que todas as toxinas mostradas possuem estes resíduos nas posições citadas, evidenciando assim a grande conservação desta região nas β toxinas.

6.3 Caracterização Eletrofisiológica da Tf1a em canais de sódio de humano

Os experimentos foram todos efetuados utilizando quatro células para cada subtipo de Na_v e na concentração final de 100nM de toxina.

6.3.1 Geração da I/V e análise da fração não inibida da corrente (Fu)

O primeiro ponto avaliado foi a fração não inibida da corrente (Fu). Foi possível observar que na fase da ativação a Tf1a inibiu a corrente em todos os subtipos testados (Nav 1.1 a 1.7). A fração não inibida foi maior (aproximadamente 0,80) nos subtipos Nav 1.1, 1.2, 1.3, 1.6 e 1.7. Nos subtipos Nav 1.4 e Nav 1.5 as Fu foram de 0,47 e 0,29, respectivamente (**Tabela 1**). Isso mostra que a toxina Tf1a foi capaz de inibir as macro-correntes de sódio de forma mais intensa nos subtipos Nav 1.4 e 1.5, alcançando uma inibição relativamente alta e expressiva nestes dois subtipos.

Tabela 1 Dados da fração não inibida da corrente (Fu). Foram calculadas as médias de cada subtipo utilizando os dados de corrente máxima de cada célula testada; n=4.

Fração não Inibida da Corrente I (Na)	
	Média
hNav1.1	0,83 ±0,03
hNav1.2	0,70 ±0,02
hNav1.3	0,83 ±0,06
hNav1.4	0,47 ±0,07
hNav1.5	0,29 ±0,03
hNav1.6	0,77 ±0,10
hNav1.7	0,80 ±0,14

Esse resultado é corroborado analisando os gráficos de I/V (**Figura 17**) e pelos traços brutos dos experimentos (**Figura 18**). Podemos observar nos gráficos que as correntes macroscópicas foram reduzidas em todos os subtipos analisados, porém essa inibição foi superior nos subtipos Nav 1.4 e 1.5 (**Figura 16**).

A partir dos dados obtidos de fração não inibida de corrente (F_u) de todos os subtipos testados foi realizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA). O teste apontou que existia diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA: $F=7,9649$; $p= 0,0004$). Posteriormente foi realizado o teste de Tukey para diagnosticar quais tratamentos eram estatisticamente diferentes entre si. Com esse teste foi verificado que a fração não inibida do subtipo Nav 1.5 possuía uma diferença estatisticamente significativa em relação ao dos outros subtipos, com exceção do subtipo Nav 1.4. Já subtipo Nav 1.4 mostrou diferença estatisticamente significativa apenas com relação aos subtipos Nav 1.1 e Nav 1.3. Além disso o teste também demonstrou que não há diferença significativa entre os subtipos Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3, Nav 1.6 e Nav 1.7 como observado no gráfico abaixo (**Figura 16**). Para estes testes foi utilizado o *software* BioEstat 5.0. (APÊNDICE A).

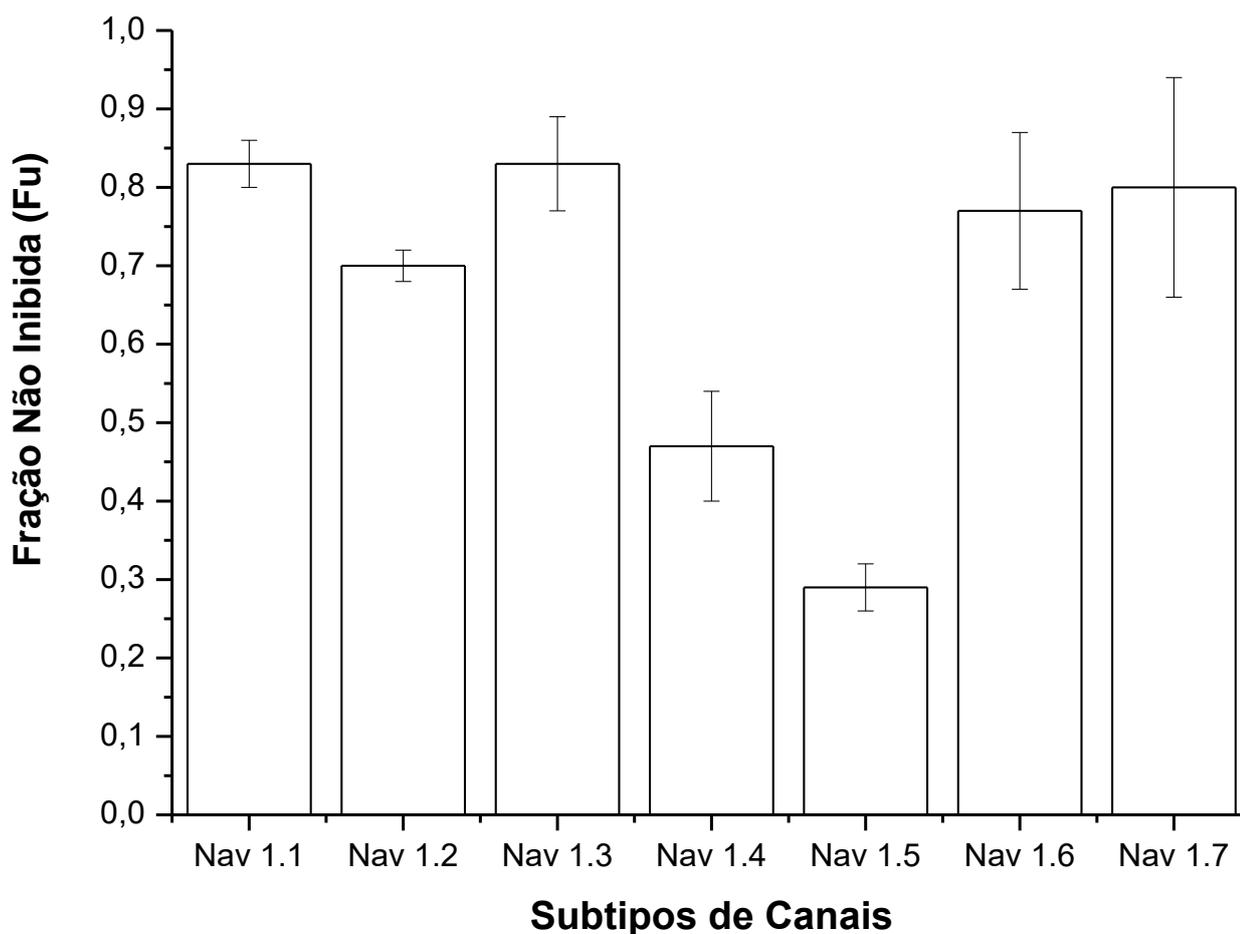


Figura 16 Fração não inibida da corrente na ativação. Os dados da média da fração não inibida da corrente de cada subtipo foram coletadas e foi gerado um gráfico de barras e o seu devido erro padrão representado. $n=4$.

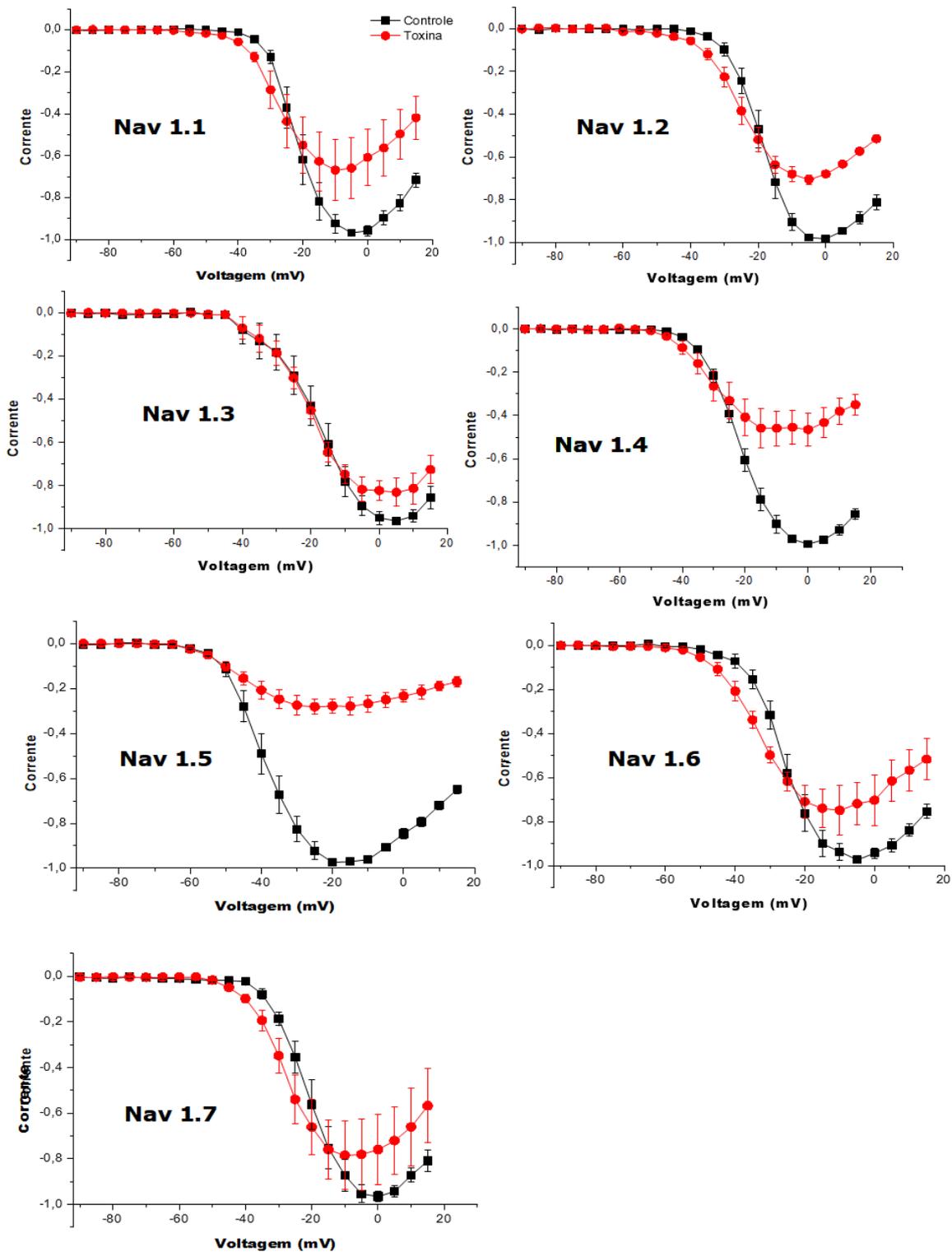


Figura 17 Gráficos de I/V obtidos para os sete subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem testados (Nav 1.1 a 1.7). Preto – controle; Vermelho – toxina 100nM. Os gráficos foram gerados com a corrente média normalizada e a voltagem (mV).

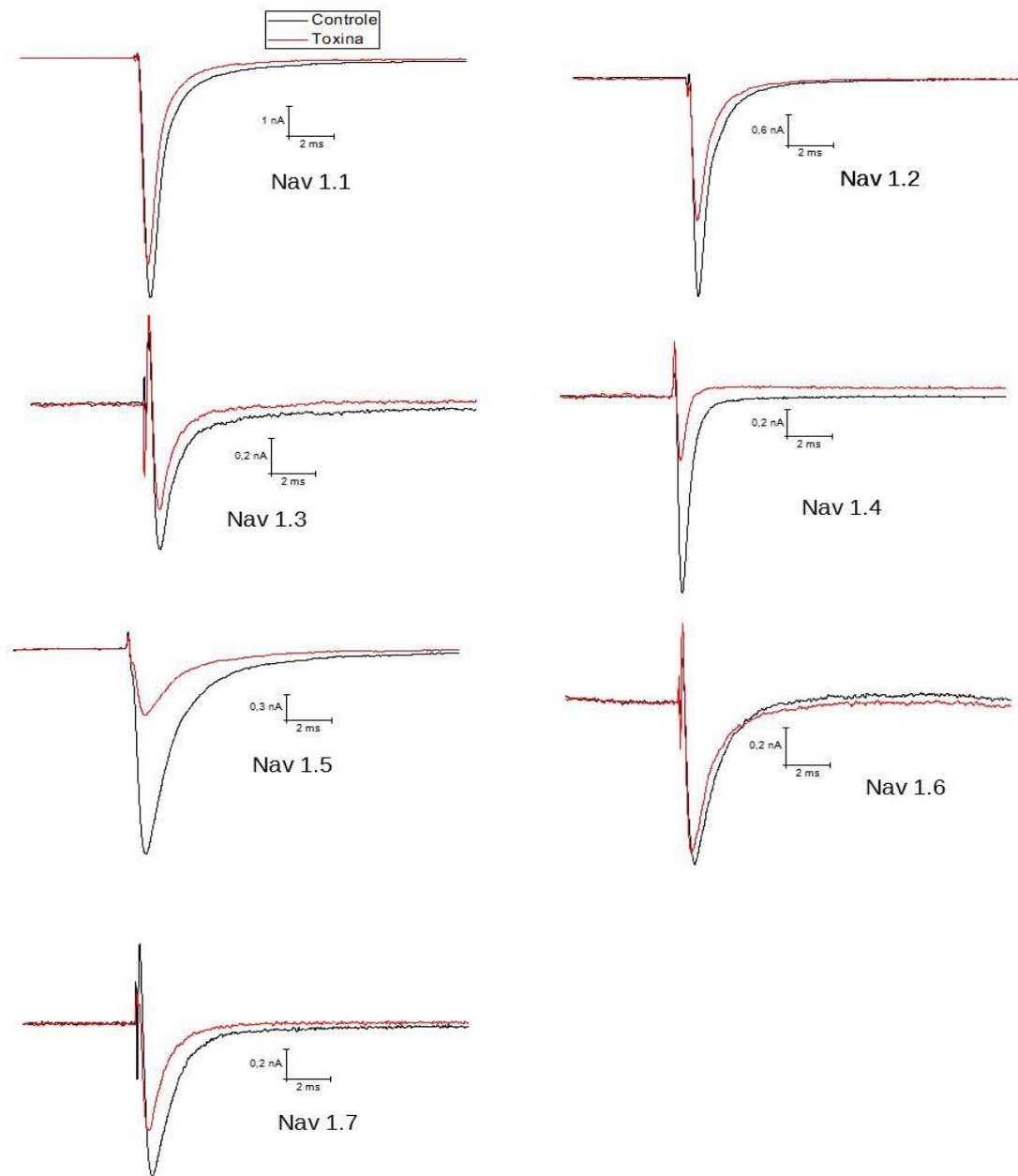


Figura 18 Traços Brutos das correntes de Na⁺ do controle e na presença da Tfx1a (100nM). Foram coletados os dados de cada subtipo de canal na voltagem onde eram atingidas as correntes máximas: Nav 1.1 (-10mV), Nav 1.2 (0mV), Nav 1.3 (5mV), Nav 1.4 (10mV), Nav 1.5 (-25mV), Nav 1.6 (-5mV) e Nav 1.7 (0mV).

6.3.2 Avaliação do Shift de voltagem ou probabilidade de abertura (P_o)

O segundo parâmetro analisado foi a alteração na probabilidade de abertura (P_o) ou *shift* de voltagem. Tal parâmetro busca avaliar o deslocamento da curva gerada ou ainda avaliar o quanto a abertura dos canais foi modificada na presença da toxina. Para obter estes dados, os valores de $V_{1/2}$ gerados pela função de Boltzmann (Função 3) para os controles e na presença da toxina foram comparados. Os dados obtidos foram capazes de demonstrar que a toxina Tf1a, a 100 nM, afetou todos os subtipos testados (Nav 1.1 a 1.7) tanto na ativação quanto na inativação, facilitando assim a abertura destes canais, fazendo com que os mesmos fossem ativados em potências mais negativas.

Na ativação, foi observado que os subtipos hNav 1.3, 1.2 e 1.5 foram os que tiveram o menor *shift* de voltagem ($-4,79 \pm 1,04$ mV, $-6,09 \pm 0,51$ mV e $-6,28 \pm 0,79$ mV, respectivamente). Já os subtipos hNav 1.1, 1.4 e 1.7 tiveram um *shift* superior aos antes mostrados ($-7,08 \pm 1,02$ mV, $-7,93 \pm 3,32$ mV e $-7,93 \pm 1,16$ mV, respectivamente). O subtipo hNav 1.6 foi o que mais teve a probabilidade de abertura alterada, atingindo um *shift* de $-9,00 \pm 1,08$ mV (**Tabela 2**)(**Figura 19**). Estes ensaios foram realizados utilizando um protocolo com pré-pulso (**Figura 7**).

Tabela 2 Valores das médias de $V_{1/2}$ da ativação de canais de Na^+ de humano com pré-pulso. Foram coletados dados de todos os subtipos testados tanto do controle quanto na presença da toxina. Para a obtenção dos valores, foram utilizadas as médias de todas as células testadas de cada subtipo. n=4.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	Média	Média	Média
hNav1.1	$-20,21 \pm 2,24$	$-27,30 \pm 2,51$	$-7,08 \pm 1,02$
hNav1.2	$-17,21 \pm 1,71$	$-23,30 \pm 1,61$	$-6,09 \pm 0,51$
hNav1.3	$-12,91 \pm 1,98$	$-17,70 \pm 2,12$	$-4,79 \pm 1,04$
hNav1.4	$-18,41 \pm 1,69$	$-26,34 \pm 2,93$	$-7,93 \pm 3,32$
hNav1.5	$-36,62 \pm 2,10$	$-42,91 \pm 1,72$	$-6,28 \pm 0,79$
hNav1.6	$-23,40 \pm 2,01$	$-32,41 \pm 2,80$	$-9,00 \pm 1,08$
hNav1.7	$-18 \pm 2,69$	$-25,93 \pm 1,84$	$-7,93 \pm 1,16$

Nos ensaios realizados com protocolo na ausência de pré-pulso, foi possível observar que a toxina produziu um *shift* de voltagem em todos os subtipos de canal, seguindo os padrões encontrados em ensaios com pré-pulso. Entretanto, podemos observar que neste caso o maior *shift* ocorreu no subtipo Nav 1.7 ($-8,77 \pm 2,37$ mV) e subsequentemente nos subtipos Nav 1.6, 1.1, 1.4, 1.2, 1.5 ($-8,35 \pm 0,50$ mV, $-7,69 \pm 1,39$ mV, $-6,96 \pm 3,07$ mV, $-6,76 \pm 0,79$ mV e $-3,73 \pm 0,88$ mV) sendo que em Nav 1.3 foi observado o menor *shift* de voltagem ($-3,65 \pm 1,07$ mV) (**Tabela 3**).

Tabela 3 Valores das médias de $V_{1/2}$ da ativação de canais de Na^+ de humano sem pré-pulso. Foram coletados dados de todos os subtipos testados tanto do controle quanto na presença da toxina. Para a obtenção dos valores, foram utilizadas as médias de todas as células testadas de cada subtipo. n=4.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	Média	Média	Média
hNav1.1	$-20,23 \pm 2,27$	$-27,92 \pm 2,99$	$-7,69 \pm 1,39$
hNav1.2	$-17,21 \pm 1,90$	$-23,97 \pm 1,53$	$-6,76 \pm 0,79$
hNav1.3	$-12,94 \pm 2,14$	$-16,60 \pm 1,80$	$-3,65 \pm 1,07$
hNav1.4	$-18,86 \pm 1,64$	$-25,83 \pm 3,42$	$-6,96 \pm 3,07$
hNav1.5	$-39,57 \pm 2,53$	$-43,30 \pm 2,38$	$-3,73 \pm 0,88$
hNav1.6	$-24,16 \pm 2,63$	$-32,52 \pm 2,77$	$-8,35 \pm 0,50$
hNav1.7	$-14,50 \pm 4,21$	$-23,28 \pm 2,76$	$-8,77 \pm 2,37$

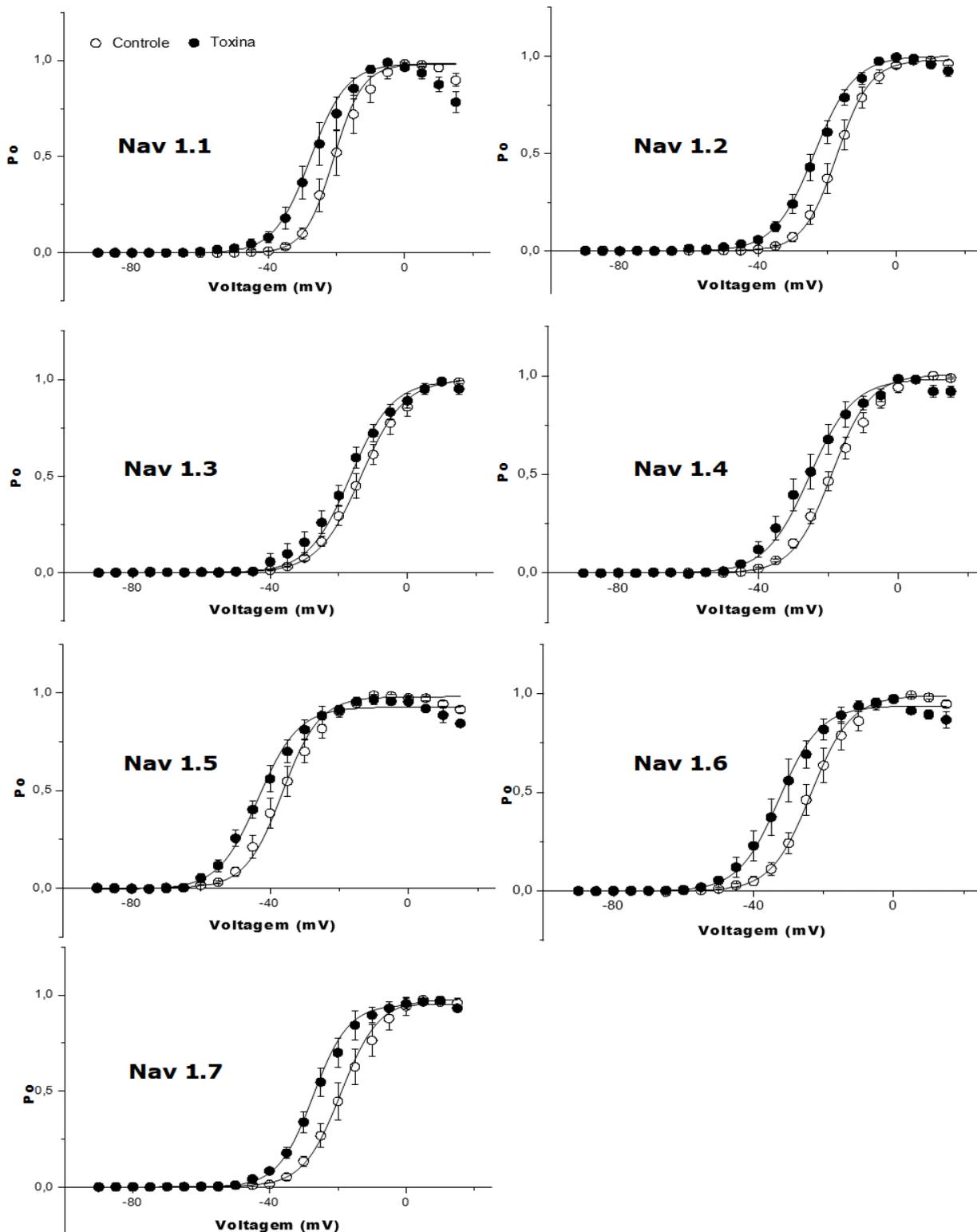


Figura 19 Gráficos da probabilidade de abertura na fase da ativação de todos os subtipos de canais de sódio testados gerados através da função de Boltzmann em ensaios com pré-pulso. Os gráficos foram gerados utilizando-se a probabilidade de abertura (P_o) pela voltagem (mV).

Na fase da inativação, foram observados resultados bastante similares aos encontrados na ativação, havendo uma alteração na probabilidade de abertura em todos os subtipos. No subtipo hNav 1.3 foi onde se obteve o menor *shift* de voltagem (-2,93±0,68 mV) e o subtipo hNav 1.6 foi o que obteve maior *shift* (-11,41 ±2,73 mV). Nos subtipos hNav 1.2, 1.4 e 1.5 o *shift* foi de -5,36 ±0,61 mV, -6,15 ±1,06 mV e -6,13 ±1,83 mV respectivamente. Nos subtipos hNav 1.1 e 1.7 foi alcançado um *shift* de -8,11 ±1,94 mV e -7,99 ±2,54 mV respectivamente (**Tabela 4**). É possível concluir que a toxina foi capaz de interferir na abertura de todos os subtipos de canais, facilitando esse processo. Porém, essa atividade se mostrou superior no subtipo Nav 1.6, e subsequentemente nos subtipos Nav 1.4, 1.7 e 1.1. Nos outros subtipos (1.3, 1.2 e 1.5), esse *shift* foi inferior (**Figura 20**).

Tabela 4 Valores das médias de $V_{1/2}$ da inativação de canais de Na^+ de humano. Foram coletados dados de todos os subtipos testados tanto do controle quanto na presença da toxina. Para a obtenção dos valores, foram utilizadas as médias de todas as células testadas de cada subtipo.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	Média	Média	Média
hNav1.1	-45,92 ±1,17	-54,03 ±2,24	-8,11 ±1,94
hNav1.2	-46,92 ±1,22	-52,29 ±0,94	-5,36 ±0,61
hNav1.3	-47,57 ±1,52	-50,5±1,71	-2,93 ±0,68
hNav1.4	-68,15 ±1,22	-74,31 ±2,25	-6,15 ±1,06
hNav1.5	-66,18 ±0,99	-72,71 ±1,43	-6,13 ±1,83
hNav1.6	-55,78 ±1,90	-67,19 ±2,52	-11,41 ±2,73
hNav1.7	-47,46 ±3,85	-55,45 ±6,04	-7,99 ±2,54

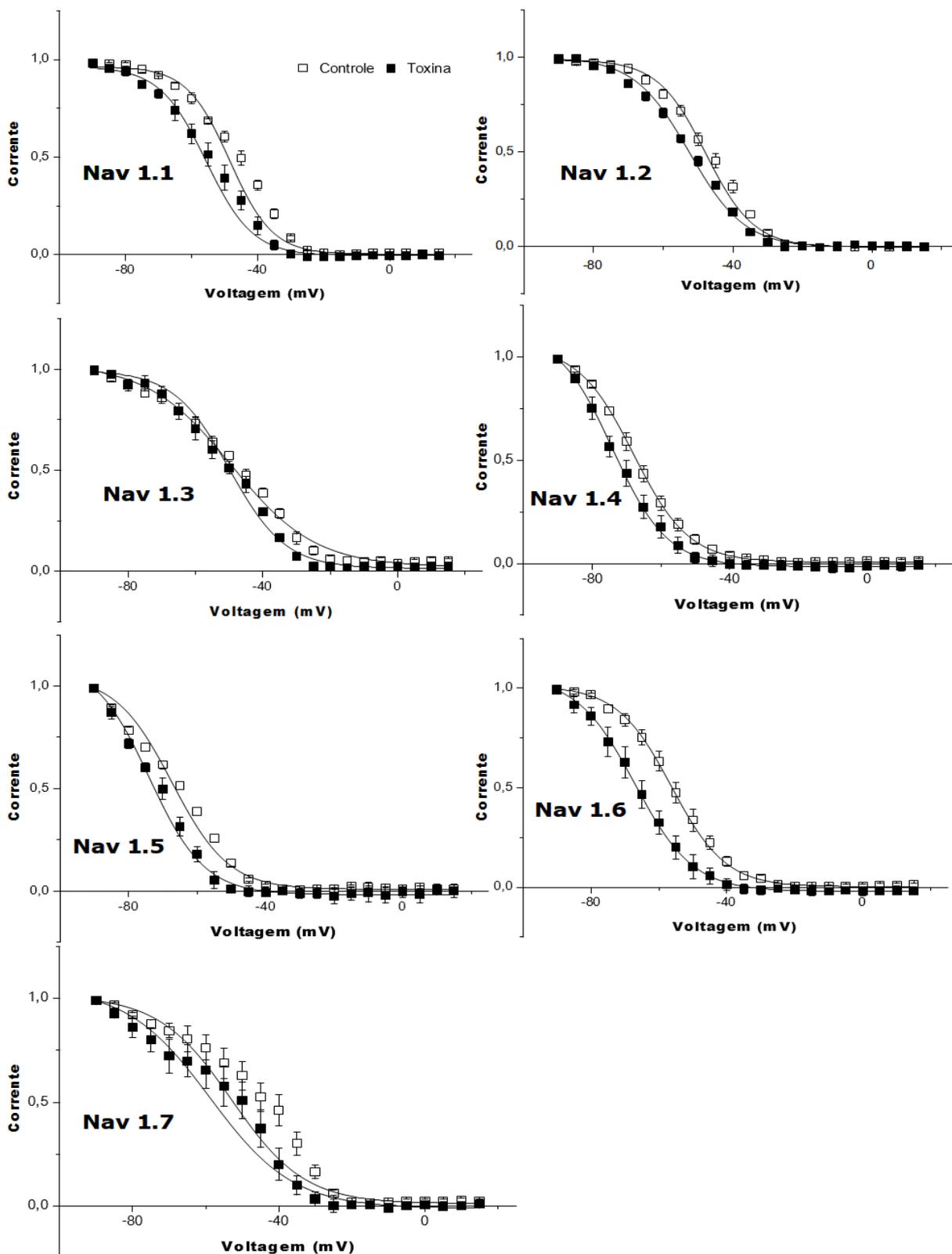


Figura 20 Gráficos da probabilidade de abertura na fase da inativação de todos os subtipos de canais de sódio testados gerados por meio da função de Boltzmann. Todos os gráficos foram gerados por meio do uso dos dados de corrente (A) por voltagem (mV).

Além do *shift* de voltagem também foi obtido o Δk , que avalia a alteração na inclinação da reta ou o quanto a sensibilidade do canal a voltagem foi alterada. Não foram observadas grandes diferenças em todos os subtipos tanto na ativação quanto na inativação na presença ou ausência de 100nM da toxina (Tabela 5)(Tabela 6).

Tabela 5 Fator de inclinação da reta (k) ou sensibilidade a voltagem das isoformas de canais de sódio testados na fase da ativação, mostrando as médias do controle e na presença da toxina a 100 nM.

	k Controle	k Toxina	Δk
	Média	Média	Média
hNav1.1	4,29 \pm 0,54	4,53 \pm 0,41	0,24 \pm 0,46
hNav1.2	4,89 \pm 0,35	5,55 \pm 0,08	0,66 \pm 0,29
hNav1.3	6,93 \pm 0,46	7,38 \pm 0,52	0,45 \pm 0,40
hNav1.4	6,71 \pm 0,35	6,61 \pm 0,46	-0,1 \pm 0,7
hNav1.5	5,95 \pm 0,37	6,40 \pm 0,41	0,45 \pm 0,26
hNav1.6	5,70 \pm 0,58	5,72 \pm 0,29	0,02 \pm 0,36
hNav1.7	5,90 \pm 0,66	5,83 \pm 0,53	0,07 \pm 0,32

Tabela 6 Fator de inclinação da reta (kh) ou sensibilidade à voltagem das isoformas de canais de sódio testados na fase inativação, mostrando as médias do controle e na presença da toxina a 100 nM.

	kh Controle	kh Toxina	Δkh
	Média	Média	Média
hNav1.1	8,48 \pm 0,28	8,6 \pm 0,12	0,11 \pm 0,17
hNav1.2	7,98 \pm 0,32	8,45 \pm 0,49	0,47 \pm 0,27
hNav1.3	11,34 \pm 0,57	9,92 \pm 1,02	-1,42 \pm 0,50
hNav1.4	8,19 \pm 0,43	8,25 \pm 0,31	-0,05 \pm 0,19
hNav1.5	9,38 \pm 0,47	7,85 \pm 0,41	-1,53 \pm 0,64
hNav1.6	8,03 \pm 0,26	8,61 \pm 0,64	0,57 \pm 0,60
hNav1.7	11,20 \pm 1,32	11,20 \pm 1,70	-0,05 \pm 0,70

6.3.3 Recuperação da Inativação Lenta

Outro parâmetro analisado foi a recuperação da inativação lenta. Tal parâmetro busca avaliar o efeito da toxina na recuperação destes canais, ou seja, o quanto ela é capaz de modificar o tempo que os canais de sódio precisam para estar prontos para abrirem novamente, passando do estado inativado para o fechado. Sendo assim, foram avaliados os tempos de recuperação (τ) dos canais na ausência (controle) e na presença da toxina para os subtipos Nav 1.1 a 1.6.

Em todos os subtipos testados, o tempo de recuperação foi retardado, porém tal variação foi baixa, não gerando assim uma interferência grande na sua recuperação. O subtipo que se mostrou mais afetado foi o Nav 1.5 com um $\Delta\tau$ de $20,11 \pm 4,47$ ms (**Figura 21**)(**Tabela 7**).

Tabela 7 Dados de tau (τ) da inativação lenta. Média dos dados do tau da inativação lenta de todos os subtipos de canais de sódio testados. Estão mostrados os valores de tau na ausência (controle) e na presença da toxina (100 nM), junto com a sua variação.

	τ Controle (ms)		τ Toxina (ms)	$\Delta\tau$ (ms)
	n	Média	Média	Média
hNav1.1	3	2,70 \pm 0,69	3,6 \pm 0,91	0,89 \pm 0,02
hNav1.2	4	2,42 \pm 0,16	3,90 \pm 0,30	1,47 \pm 0,34
hNav1.3	2	5,91 \pm 1,17	5,97 \pm 1,09	0,06 \pm 0,11
hNav1.4	4	4,33 \pm 0,37	5,21 \pm 0,48	0,88 \pm 0,58
hNav1.5	3	25 \pm 4,87	45,11 \pm 3,46	20,11 \pm 4,47
hNav1.6	2	9,29 \pm 0,17	9,09 \pm 0,16	-0,2 \pm 0,48

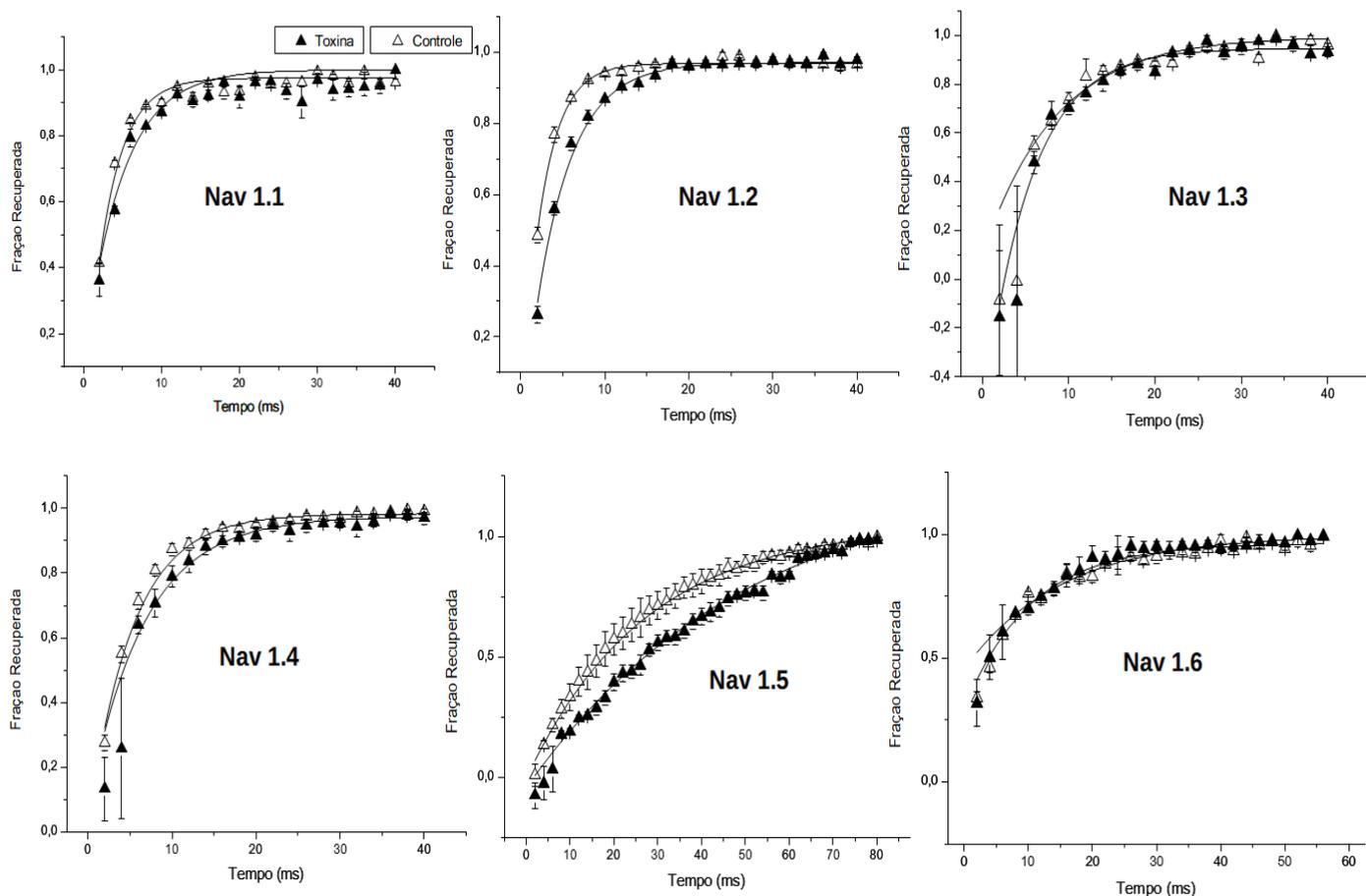


Figura 21 Gráfico da recuperação da inativação lenta dos subtipos de canais de sódio. Triângulos pretos – toxina 100nM, triângulos brancos – controle. Os gráficos foram gerados com a relação da fração de canais recuperados em função do tempo de estímulo e recuperação (ms).

6.4 Caracterização Eletrofisiológica da Tf1a em canais de inseto e aracnídeo

Foram realizados também ensaios em canais de inseto e aracnídeo (BgNav1 e VdNav1, respectivamente), a fim de analisar o *shift* de voltagem causado na ativação e na inativação e a inibição de corrente gerada. Todo o procedimento foi realizado segundo parâmetros mostrados no item 5.5.2 utilizando 100 nM da toxina Tf1a nos ensaios.

Foi possível observar que a toxina Tf1a foi capaz de alterar a cinética de ambos os canais testados (BgNav1 e VdNav1) tanto na ativação quanto na inativação. Na ativação, foi gerado um *shift* de voltagem de aproximadamente

-11 mV no canal de inseto, e um *shift* de -1,8 mV em canais de aracnídeo, possibilitando assim a abertura destes canais em voltagens mais negativas quando na presença desta toxina (**Tabela 8**).

Tabela 8 Valores das médias de $V_{1/2}$ na fase da ativação em células de inseto e a aracnídeo.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	Média	Média	
BgNav1	-37,6 ± 0,1	-48,6 ± 1,2	-11
VdNav1	-17,2 ± 0,1	-19,0 ± 0,5	-1,8

Na inativação, a toxina Tf1a também foi capaz que causar um *shift* em ambos os canais. Para os canais de inseto (BgNav1) foi observado um $\Delta V_{1/2} = -4,1$ mV, e para os canais de aracnídeo (VdNav1) $\Delta V_{1/2} = -8,3$ mV (**Tabela 9**).

Tabela 9 Valores das médias de $V_{1/2}$ na fase da inativação em células de inseto e aracnídeo.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	Média	Média	
BgNav1	-60,3 ± 0,2	-64,4 ± 0,1	-4,1
VdNav1	-47,2 ± 0,1	-55,5 ± 0,2	-8,3

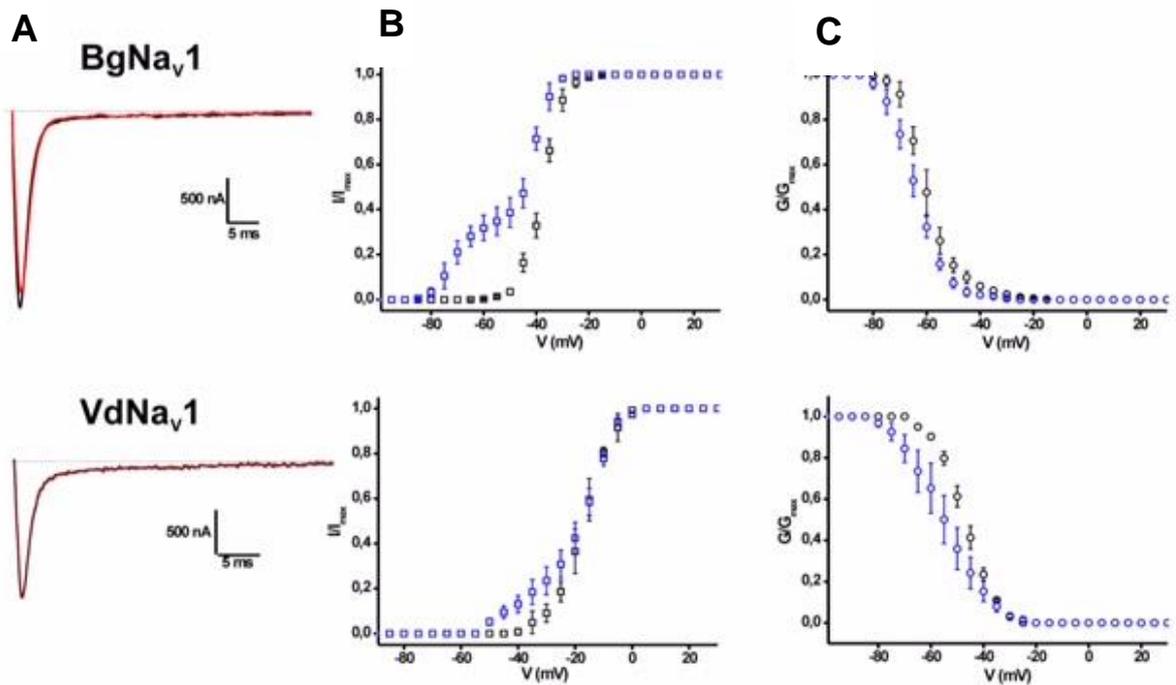


Figura 22 Resultado dos ensaios eletrofisiológicos realizados com a Tf1a em canais de inseto e aracnídeo. (A) traços brutos dos ensaios realizados. Vermelho – Toxina 100nM; Preto – controle. (B) Gráfico do *shift* de voltagem da ativação gerado por meio do uso da função de Boltzmann. Foram utilizados os dados de condutância normalizados e voltagem (G/V) para a realização dos cálculos. (C) Gráfico do *shift* de voltagem da inativação gerado por meio do uso da função de Boltzmann. Foram utilizados os dados de corrente normalizados e voltagem (G/V) para a realização dos cálculos.

Entretanto, quando avaliada a inibição de corrente, foi possível observar que a Tf1a não causou nenhum efeito sobre ambos os subtipos, concluindo assim que, nos subtipos de inseto e aracnídeo, a toxina estudada foi capaz apenas de alterar a abertura destes canais, facilitando assim a abertura dos mesmos.

Outras toxinas do tipo β também já tiveram a sua caracterização eletrofisiológica realizada, entre elas estão as apresentadas na **Figura 14**. A toxina Tb1 de *Tityus bahiensis* que possui maior identidade com a toxina de interesse neste trabalho (97%) ainda não foi caracterizada. Já a toxina Tt1g de *T. trivittatus*, que apresenta 96% de identidade com a Tf1a, quando testada nos subtipos hNav 1.1 a 1.6 em células do tipo HEK, causou um *shift* de voltagem nos subtipos hNav 1.2 e 1.3 e uma inibição de corrente nos subtipos hNav 1.4 e 1.5 em uma concentração de 500 nM (CORONAS et al., 2015).

A toxina Ts1 de *Tityus serrulatus* também muito semelhante à toxina Tf1a (92%) foi avaliada nos subtipos Nav 1.1 a 1.8 e ainda em DmNav1 e

NaChBac expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Esta toxina foi capaz de alterar a cinética da ativação ($\Delta V_{1/2}$) nos subtipos Nav 1.2, 1.3, 1.4 e 1.6, porém com maior intensidade nos subtipos 1.3 (-12mV) e 1.6 (25mV) a 100nM e também alterou a cinética do canal DmNav1. Além disso, ela foi capaz de alterar a cinética de inativação nos subtipos 1.2 e 1.3 e inibir a corrente em Nav 1.2 (2%), 1.3 (21%), 1.4 (20%), 1.5 (79%) e 1.6 (51%)(PEIGNEUR et al., 2015). A toxina Tz1 de *T. zulianus* (64% de identidade) também foi testada nos subtipos Nav 1.2, 1.4, 1.5, 1.6 e 1.7 em células do tipo HEK. Em uma concentração de 10 μ M, Tz1 foi capaz de causar um *shift* de voltagem em todos os subtipos, sendo superior no subtipo Nav 1.4(LEIPOLD et al., 2006). Foi observado também uma redução na amplitude da corrente nos subtipos Nav 1.4 e 1.5 à 5 μ M em diversos tipos de protocolos (LEIPOLD; BORGES; HEINEMANN, 2012). BORGES et al. (2004) também realizaram ensaios utilizando a toxina Tz1 nos subtipos 1.4 e 1.5 expressos em células do tipo HEK, demonstrando que a toxina em uma concentração de 1 μ M foi capaz de afetar ambos os subtipos, alterando a sua cinética de abertura.

A toxina Tf2 de *Tityus fasciolatus* também teve a sua caracterização eletrofisiológica realizada. Utilizando a técnica de *two-electrode voltage-clamp* expressando Nav 1.1-1.8 em oócitos de *Xenopus laevis*, a toxina Tf2 a 1 μ M foi capaz de causar um *shift* de voltagem na ativação em 16 mV apenas no subtipo Nav 1.3 sem interferir nos outros subtipos, fazendo com que esse subtipo se abrisse em potenciais mais negativos, facilitando assim sua abertura (CAMARGOS et al., 2015).

Ao compararmos os dados obtidos da toxina Tf1a com as citadas acima e mostradas na **Figura 14**, podemos observar que a toxina Tf1a teve sua inibição de macro-correntes maior nos subtipos Nav 1.4 e 1.5, o que se assemelha aos resultados obtidos com as toxinas Tz1, Tt1g e a Ts1 que também foram capazes de inibir as correntes nestas isoformas. Já com relação aos dados de *shift* de voltagem, podemos notar que a toxina Tf1a e a toxina Tz1 foram as únicas capazes de alterar a cinética de todos os subtipos de sódio testados, enquanto as outras toxinas mostradas agiram em alguns canais específicos e não agindo sobre outros. Tal diferença pode ser explicada em virtude de pequenas diferenças encontradas na sequência destes peptídeos que podem vir a alterar a interação e atividade destas toxinas com alguns

subtipos de canais de sódio e a diferença de sequência de cada subtipo de canal, como as mostradas no item 6.2.

Tendo isso em vista, vem crescendo entre os pesquisadores a procura para entender melhor os pontos fundamentais de interação das toxinas com os canais iônicos, uma vez que tais dados poderiam auxiliar na melhor compreensão dos fenômenos causados pelas neurotoxinas. Estudos utilizando de técnicas de mutações foram capazes de mostrar a existência de resíduos de aminoácidos chave tanto para diferenciação destas toxinas em relação a sua subdivisão quanto para a interação das mesmas com estes canais. Dentre eles, estão os triptofanos (Thr) nas posições 39, 50 e 54 que se mostraram essenciais para interação da toxina C_{ss} IV com os canais de sódio, e a lisina (Lys) na posição 12 importante para a toxicidade deste peptídeo (HASSANI et al., 1999). Além destes resíduos de aminoácidos citados, outros como os citados no item 6.2 que formam a região farmacofórica e a região de resíduos aromáticos conservados têm sem mostrado fundamentais para a interação e toxicidade destas β toxinas com os canais de sódio (ESCALON; POSSANI, 2013). Sendo assim podemos presumir que a grande conservação dos resíduos aromáticos seria o responsável pela semelhança na atividade destas toxinas (GORDON et al., 1998b). Entretanto, as diferenças observadas na região farmacofórica (entre as posições 22 e 29) são as responsáveis pela variação da interação destas toxinas com os canais de sódio e suas isoformas, incluindo também os Thr39, 50, 54 e a Lys12 que estão presente em todas as toxinas mostradas, com exceção da toxina Tf2 que não possui a Thr50 e sim uma asparagina (Asp), fato que pode explicar a sua atividade diferenciada nos canais iônicos de sódio.

A alteração na cinética dos canais de sódio estimulado pelas β -toxinas de escorpião ainda é algo que vem sendo estudado e explicado pelos pesquisadores. Segundo (CESTÈLE et al., 1998), os efeitos causados pelas toxinas resultam do aprisionamento do sensor de voltagem (S4) do domínio II na posição extracelular, dificultando com que eles retornem ao estado normal. Com isso, os canais tendem a ficar em um estado pré-ativado, facilitando assim a abertura destes canais nas despolarizações subsequentes e sendo ativados em potências mais hiperpolarizados (ZHANG et al., 2011)(COHEN et al., 2007). (CESTÈLE et al., 1998) também foram capazes de demonstrar que

a presença de uma glicina na posição 845 no *loop* S3-S4 do domínio II do canal de sódio era essencial para a interação destas toxinas. Ao alterar esse resíduo de aminoácido, não foram observadas alterações na cinética dos canais na presença da toxina Css IV, inviabilizando assim a interação da toxina com estes canais. Além disso, a mutação da glicina na posição 845 também afetou a interação da toxina Tz1 sobre os subtipos de canais de sódio (LEIPOLD et al., 2006).

Buscou-se também entender a diferenciação das isoformas de canais e quais eram os pontos-chaves para sua interação com toxinas de sódio. Apesar de se conhecer que grande parte da atividade causada pelas β toxinas era gerada pela interação com o domínio II na região de sensor de voltagem, (LEIPOLD et al., 2006) demonstraram utilizando mutações pontuais e a toxina Tz1 que a região do *loop* SS2 do domínio III era crítica para a interação das neurotoxinas com os canais de sódio. Outro experimento realizado com a toxina Css IV também foi capaz de corroborar que diferentes mutações na região do *loop* S3-S4 do domínio III eram capazes de influenciar a ação desta toxina, diminuindo sua interação e atividade (ZHANG et al., 2011). Sendo assim, podemos dizer para que a cinética do canal de sódio seja alterada, são necessárias interações extremamente específicas em pontos particulares dos canais de sódio, e as regiões do domínio II e III são peças-chaves para a atividade destas toxinas.

Concomitantemente, (CAMPOS et al., 2007) determinaram por meio de técnicas de fluorescência, que a toxina Ts1 agiu mantendo o sensor de voltagem do domínio II na posição ativada. Além disso, mostraram que a alteração em um sensor de voltagem (S4 DII) foi capaz de ocasionar efeitos em todos os outros sensores de voltagem presentes, facilitando assim o seu deslocamento para a região extracelular, e possibilitando assim a abertura dos canais em potenciais mais negativos. Tal feito evidenciou um sistema de cooperação neste canal, ou seja, quando o mesmo é afetado em um local ele tende a compensar e se reorganizar para que o novo equilíbrio seja alcançado. Isso pode explicar o motivo do resultado do *shift* de voltagem na ativação e na inativação serem muitos parecidos quando submetidos à presença da toxina Tf1a, uma vez que na presença desta toxina os canais tentam compensar os efeitos causados na fase da ativação e na inativação.

(CAMPOS et al., 2007) mostraram também que a toxina Ts1 era capaz de causar um *shift* de voltagem mesmo na ausência de um pré-pulso, sendo assim a toxina capaz de se ligar ao sensor de voltagem mesmo no estado inativado. Tais dados obtidos pela Ts1 se assemelham aos resultados encontrados com a toxina Tf1a, uma vez que ensaio tanto na presença quanto na ausência de pré-pulso mostraram-se capazes de afetar os canais de sódio, o que segundo (CESTÈLE et al., 1998) não era possível, tendo em vista que o pré-pulso era necessário para a atividade e interação destas toxinas. Isso pode demonstrar que algumas toxinas tais como a Ts1 e Tf1a são capazes de se ligar nos seus sítios alvo mesmo na ausência da exposição dos resíduos de aminoácidos do sensor de voltagem por um estímulo prévio, interagindo e agindo assim mesmo em condições do estado inativado.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho foi capaz de obter e identificar uma nova toxina (Tf1a) do tipo NaScTx purificada da peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*. Além disso, foi capaz de se demonstrar a atividade deste novo peptídeo em sete subtipos de canais de sódio de humano (hNav 1.1-1.7) e ainda em canais de inseto e aracnídeo. Essa neurotoxina se mostrou ativa em todos os subtipos testados, tanto de humanos quanto de insetos e aracnídeo, sendo capaz de alterar a cinética dos canais de sódio afetando a sua probabilidade de abertura e inibindo as correntes macroscópicas. Com os resultados obtidos pode-se concluir que o peptídeo Tf1a trata-se de uma toxina do tipo β -like capaz de agir em canais de humanos e insetos.

Sendo assim, este trabalho foi capaz de colaborar com o conhecimento na área de toxinologia sobre a interação toxina/canal por uma avaliação completa em canais de sódio humanos, insetos e aracnídeos sendo esta toxina uma das poucas que já foram amplamente caracterizadas eletrofisiologicamente frente a diferentes isoformas, corroborando assim com a busca do conhecimento e elucidação da atividade destas toxinas. Além disso a descoberta desta toxina pode auxiliar no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos com intuito de melhorar o entendimento dos canais iônicos.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar a massa molecular da toxina Tf1a utilizando outras metodologias e equipamentos mais acurados;
- Aumentar o número de experimentos para cada subtipo de canal;
- Analisar a atividade da toxina Tf1a em outros tipos de canais de sódio tais como de bactérias;
- Analisar outros parâmetros nos ensaios em canais de sódio tais como o movimento do sensor de voltagem e inativação rápida.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGAL, S. K. et al. Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 360–366, 2015.

BARBIER, J. et al. A delta-Conotoxin from *Conus ermineus* Venom Inhibits Inactivation in Vertebrate Neuronal Na⁺ Channels but Not in Skeletal and Cardiac Muscles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4680–4685, 2004.

BORGES, A. et al. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel β -toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. **Toxicon**, v. 43, n. 6, p. 671–684, 2004.

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 142–158, 2007.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os Escorpiões**. EDUFBA, 2010.

CAMARGOS, T. S. **Prospecção da peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* sob a perspectiva proteômica e transcritômica, e caracterização biológica de peptídeos moduladores de canais de Na⁺**. Tese de Doutorado, Biologia Animal, Universidade de Brasília, 2014.

CAMARGOS, T. S. et al. The scorpion toxin Tf2 from *Tityus fasciolatus* promotes Nav 1.3 opening. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2015.

CAMPOS, F. V. et al. β -Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel. **The Journal of General Physiology**, v. 130, n. 3, p. 257–268, 2007.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13–25, 2000.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 11, p. 2577–89, 2012.

CATTERALL, W. A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. **Annual review of biochemistry**, v. 55, 1986.

CESTÈLE, S. et al. Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 919–931, 1998.

CESTÈLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action

on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 883–892, 2000.

COELHO, V. A. et al. Functional and structural study comparing the C-terminal amidated β -neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v. 83, p. 15–21, 2014.

COHEN, L. et al. Design of a Specific Activator for Skeletal Muscle Sodium Channels Uncovers Channel Architecture Design of a Specific Activator for Skeletal Muscle Sodium Channels Uncovers Channel Architecture. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 29424–29430, 2007.

CORONAS, F. I. V et al. Biochemical and physiological characterization of a new Na^+ -channel specific peptide from the venom of the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. **Peptides**, v. 68, p. 11–16, 2015.

ESCALON, M. P.; POSSANI, L. D. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, p. 572–587, 2013.

GOLDIN, A. L. Resurgence of Sodium Channel Research. **Annual Review of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 871–894, 2001.

GOLDSCHEN-OHM, M. P. et al. Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. **Nature Communications**, v. 4, p. 1350, 15 jan. 2013.

GORDON, D. et al. Functional Anatomy of Scorpion Toxins Affecting Sodium Channels. **Toxin Reviews**, v. 17, n. 2, p. 131–159, 1998.

GUERRERO-VARGAS, J. A. et al. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na^+ -channel scorpion toxins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

GUIMARÃES, P. T. C.; PINTO, M. C. L.; MELO, M. M. Perfil clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiano experimental por *Tityus fasciolatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1382–1390, 2011.

GWEE, M. C. E. et al. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 9, p. 795–801, 2002.

HASSANI, O. et al. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts γ) from the scorpion *Tityus serrulatus*. **European**

Journal of Biochemistry, v. 260, n. 1, p. 76–86, 1999.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 52, n. 1–2, p. 25–71, 1990.

HOUSLEY, D. M. et al. Scorpion toxin peptide action at the ion channel subunit level. **Neuropharmacology**, 2016.

HUANG, W. et al. Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels. **Protein and Cell**, v. 8, n. 6, p. 401–438, 2017.

KING, G. F. et al. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 264–276, ago. 2008.

KORNREICH, B. G. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 9, n. 1, p. 25–37, 2007.

LEIPOLD, E. et al. Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 340–347, 2006.

LEIPOLD, E.; BORGES, A.; HEINEMANN, S. H. Scorpion β -toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. **The Journal of general physiology**, v. 139, n. 4, p. 305–19, 2012.

LOURENÇO, W. R. What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, p. 1–12, 2015.

MARBAN, E. Structure and function of voltage-gated sodium channels. **The Journal of physiology**, v. 508, n. 3, p. 647–657, 1998.

MENDES, T. M. et al. General characterization of *Tityus fasciolatus* scorpion venom. Molecular identification of toxins and localization of linear B-cell epitopes. **Toxicon**, v. 99, p. 109–117, 2015.

Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13692-situacao-epidemiologica-dados>

OGDEN, D.; STANFIELD, P. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. **Currents**, v. 2, n. 7, p. 53–78, 1981.

PEIGNEUR, S. et al. A gamut of undiscovered electrophysiological effects

produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on NaV-type isoforms. **Neuropharmacology**, v. 95, n. APRIL, p. 269–277, 2015.

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

POSSANI, L. D. et al. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 861–868, 2000.

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

RAFAEL, G. **Tityus fasciolatus**, 2009.

RODRIGUEZ, M.; REGINA, S. Escorpiões: Biologia e Acidentes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2008.

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

STEVENS, M.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2 NOV, n. November 2011, 2011.

TORQUATO, S. et al. Escorpiões, Aranhas e Serpentes : aspectos gerais e espécies de interesse médico no Estado de Alagoas. EDUFAL, 2005.

WAGNER, S. et al. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 737–745, 2003.

ZHANG, J. Z. et al. Structure-Function Map of the Receptor Site for α -Scorpion Toxins in Domain II of Voltage-gated Sodium Channels Structure-Function Map of the Receptor Site for β -Scorpion Toxins in Domain II of Voltage-gated Sodium Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. July 2011, p. 33641–33651, 2011.

ZHANG, X. et al. Analysis of the selectivity filter of the voltage-gated sodium channel NavRh. **Cell Research**, v. 23, n. 3, p. 409–422, 2013.

ZHIJIAN, C. et al. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 348–355, 2006.

APÊNDICE A – Dados estatísticos da fração não inibida de corrente (Fu) – ANOVA e Tukey.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	6	1.0458	0.174
Blocos	3	0.138	0.046
Erro	18	0.394	0.022
F (tratamentos) =	7.9649		
p (tratamentos) =	0.0004		
F (blocos) =	2.0987		
p (blocos) =	0.1354		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 1) =	0.8321		
Média (Coluna 2) =	0.7075		
Média (Coluna 3) =	0.8366		
Média (Coluna 4) =	0.4769		
Média (Coluna 5) =	0.2948		
Média (Coluna 6) =	0.7743		
Média (Coluna 7) =	0.8014		
Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	1.6847	ns	
Médias (1 a 3) =	0.0614	ns	
Médias (1 a 4) =	4.8015	< 0.05	
Médias (1 a 5) =	7.2635	< 0.01	
Médias (1 a 6) =	0.7815	ns	
Médias (1 a 7) =	0.4143	ns	
Médias (2 a 3) =	1.7461	ns	
Médias (2 a 4) =	3.1168	ns	
Médias (2 a 5) =	5.5788	< 0.05	
Médias (2 a 6) =	0.9032	ns	
Médias (2 a 7) =	1.2704	ns	
Médias (3 a 4) =	4.8629	< 0.05	
Médias (3 a 5) =	7.3249	< 0.01	
Médias (3 a 6) =	0.8429	ns	
Médias (3 a 7) =	0.4756	ns	
Médias (4 a 5) =	2.4620	ns	
Médias (4 a 6) =	4.0200	ns	
Médias (4 a 7) =	4.3873	ns	
Médias (5 a 6) =	6.4820	< 0.01	
Médias (5 a 7) =	6.8493	< 0.01	
Médias (6 a 7) =	0.3673	ns	