



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular  
Laboratório de Neurofarmacologia

BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE

Caracterização eletrofisiológica de uma K-KTx obtida da peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*, OcyC9, e de seu análogo OcyC9 MOD

Brasília, DF  
2019

BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE

Caracterização eletrofisiológica de uma K-KTx obtida da peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*, OcyC9, e de seu análogo OcyC9 MOD

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação  
em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Professora, Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília, DF

2019

## DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese à minha família, à minha orientadora,  
aos meus companheiros de trabalho no laboratório e  
aos meus amigos pelo apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a minha querida família, pelo amor, incentivo e suporte.

À Professora Dra. Elisabeth Schwartz, pela orientação, sugestões, motivação e apoio. Muito obrigada pela oportunidade de me receber no seu laboratório e aprimorar a minha formação como profissional e como pessoa, sou muito grata por ter conhecido você.

Ao professor Dr. Gyorgy Panyi, do Departamento de Biofísica e Biologia Celular da faculdade de Medicina da Universidade de Debrecen (Hungria), pela orientação e apoio nos ensaios eletrofisiológicos no canal de potássio durante o desenvolvimento do Doutorado Sanduíche. Igualmente quero agradecer a sua equipe de trabalho, Ferenc Papp, Tibor Szanto, Zoltán Varga, Agota Csoti, Orsolya Voros, Gabor Tajti e, em especial a Adrienn Bagosi, Cecilia Nagy, Muhammad Umair Naseem, Gyula Batta, Nikolett Szabó e Jesus Angel Borrego pelas risadas e momentos de diversão.

Ao professor Dr Jörg Striessnig, do Centro de Química e Biomedicina do Instituto de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Innsbruck (Áustria), pela orientação e apoio nos ensaios eletrofisiológicos no canal de cálcio durante o desenvolvimento do Doutorado Sanduíche. Igualmente quero agradecer à Post-Doc. Nadine Ortner e à aluna de doutorado Anita Siller pela ajuda e assessoria nos registros eletrofisiológicos.

Aos professores do laboratório de Neuropharma da UnB. À Dra. Márcia Mortari e Dr. Osmino Pires Jr, pelas recomendações e ensinamentos.

Aos amigos-colegas Solange Rego, Luís Felipe Menezes, Daniel da Matta, Diogo Tibery, Alessa Bembom, Carol Barbosa, Thalita Soares, Leandro Ambrosio, Adolfo Souza, Elias Sabiá, Danilo Gustavo, Victoria Monge, Mariza Mendanha, Francielly Neto pela ajuda, companhia e carinho nesses anos.

Aos meus amigos, em especial, Diana Monsalve, Fernando Arias, Harry Morales, Tatiana Ordoñez, Andrés Idrobo, Cesar Prias, Claudia Gomez, Fabian Hurtado, Margarita Moncayo, Paolin Caceres pelo carinho, apoio e companhia.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado e ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade de desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

Vários peptídeos de escorpiões classificados na família das toxinas de escorpião kappa-KTx são considerados como bloqueadores fracos no canal de potássio. A maioria desses peptídeos tem atividade nos  $K_v$  a concentrações na ordem de  $\mu\text{M}$ ; portanto, é possível que o alvo molecular desses peptídeos não tenha sido encontrado ainda. Nesse trabalho, é apresentado o isolamento, identificação e caracterização eletrofisiológica do peptídeo OcyC9 (Kappa-KTx 2.6) da peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* de quem a sequência do precursor foi previamente descrita pelo nosso grupo (UNIPROTKB-KW C5J893). Devido à alta similaridade do peptídeo OcyC9 com a toxina OmTx2 isolada do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis*, estimou-se que o peptídeo de estudo poderia induzir os mesmos efeitos biológicos que a OmTx2. OcyC9 foi purificado por HPLC e a massa molecular monoisotópica experimental de  $[M + H]^+$ : 2545,03 Da e não apresenta modificação pós-traducional. O desenho e síntese comercial do peptídeo análogo (OcyC9 modificado) foram realizados, além da síntese do peptídeo OcyC9 (natural) em decorrência da baixa disponibilidade do peptídeo nativo. Para a caracterização eletrofisiológica, OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 foram quimicamente sintetizados e a atividade eletrofisiológica foi avaliada. OcyC9 demonstrou ser um bloqueador da corrente de  $K^+$  (58,5%) a 500  $\mu\text{M}$  e OcyC9MOD (48,18%) a 250  $\mu\text{M}$  no canal  $K_v1.3$ . Posteriormente, foram testados outros alvos moleculares como os canais  $K_v2.1$ , BK (KCa1.1),  $K_{ATP}$  ( $K_{IR}6.2$  / SUR 1) e canais de cálcio nesse trabalho.

**Palavras chaves:** Canal de  $\text{Ca}^{+2}$ , Canal de  $\text{K}^+$ , Escorpião,  $\kappa$ -KTx, OcyC9, *Opisthacanthus cayaporum*, Toxina.

## ABSTRACT

Several scorpion peptides classified into the kappa-KTx scorpion toxin family are considered as weak blockers on potassium channel. Most of these peptides have activity in  $K_v$  in highest  $\mu\text{M}$  concentrations; therefore, it is possible to think that maybe the molecular target of these peptides has not been found yet. Here, the isolation, identification and electrophysiological characterization of the Kappa-KTx peptide named OcyC9 (Potassium channel toxin Kappa-KTx 2.6) from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum* is described. A predicted mature sequence precursor (UNIPROTKB-KW C5J893) of the OcyC9 peptide was previously described by our group. Due to the high similarity of the OcyC9 peptide with the OmTx2 peptide isolated from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, we estimated that OcyC9 peptide could induce the same biological effects as the OmTx2.

OcyC9 peptide was purified by HPLC with an experimental monoisotopic molecular mass of  $[M+H]^+$ :2545.03 Da and post traditional modification was not found. For the electrophysiological characterization, OcyC9, OcyC9MOD and OmTx2 were chemically synthesized and the electrophysiological activity was evaluated. OcyC9 was shown to be a blocker of  $K^+$  current (58.5%) on  $K_v.1.3$  at 500  $\mu\text{M}$  and OcyC9MOD (48.18%) at 250  $\mu\text{M}$ . OmTx2 was previously characterized by other group showing the weak effect on this channel as well, leading the doubt about their proper molecular target and also their pharmacologic effect. After that we tested other targets such as  $K_v 2.1$ , BK (KCa 1.1),  $K_{ATP}$  ( $K_{IR 6.2/SUR 1}$ ) and calcium channels.

**Keywords:**  $\text{Ca}^{+2}$  channels,  $K^+$  channels,  $\kappa$ -KTx, OcyC9, *Opisthacanthus cayaporum* Scorpion, toxin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar do escorpião <i>Opisthacanthus cayaporum</i> . (Foto: Thalita Camargos).....	25
Figura 2. Comparação dos perfis cromatográficos da peçonha bruta de machos (Preto) e fêmeas (Cinza) obtidos com a injeção de 1 mg de peçonha bruta do escorpião <i>O. cayaporum</i> em coluna C18 mediante RP-HPLC com gradiente linear de 0% da solução A (0,12% TFA em água) a 60 % da solução B (0,10% TFA em ACN.). Observam-se diferenças quantitativas entre os perfis cromatográficos de machos e fêmeas. Adaptado de (Schwartz et al., 2008). .....	26
Figura 3. Espectros de massa (MALDI-TOF) da peçonha bruta do escorpião <i>O. cayaporum</i> . A. Espectro de massa da peçonha de fêmea. Espectro de massa da peçonha do macho. Os componentes com massas moleculares de 8315 e 8930 Da apresentaram uma maior concentração na peçonha de machos, enquanto que massas moleculares de 4909 e 7929 Da na peçonha de fêmeas. Somente foram observadas diferenças qualitativas. Os dados foram adquiridos na faixa de 1000 e 10000 Da usando 1 mg de amostra. Adaptado de(Schwartz et al., 2008). .....	27
Figura 4. Estruturas tridimensionais de KTxS representantes de cada uma das sete subfamílias. A. Noxiustoxin ( $\alpha$ -KTx), código PDB 1SXM do escorpião <i>Centruroides noxius</i> . B. Toxina Hge36 Scorpine-like peptide ( $\beta$ -KTx), código PDB 5IPO do escorpião <i>Hadrurus gertschi</i> . C Toxina ErgTx1 ( $\gamma$ - KTx), código PDB 1PX9 do escorpião <i>Centruroides noxius</i> . D. k-Hefutoxin ( $\kappa$ -KTx), código PDB 1HP9) do escorpião <i>Heterometrus fulvipes</i> . E. Toxina LmKKT-1a do tipo Kunitz ( $\delta$ -KTx), código PDB 2 M01 do escorpião <i>Lychas mucronatus</i> . F. Toxina $\lambda$ MK1 do tipo ICK ( $\lambda$ -KTx), código PDB 1C6W do escorpião <i>Mesobuthus eupeus</i> . G. Toxina Ts11 com a conformação da nova subfamília ( $\epsilon$ -KTx), código PDB 2MSF do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> . .....	32
Figura 5. Alinhamento das sequências das $\beta$ KTx. A. Peptídeos relacionados à TsTx-K $\beta$ . B. Peptídeos homólogos da BmTXK $\beta$ . C. Peptídeos do tipo <i>Scorpine</i> . .....	35
Figura 6. Cladograma por inferência bayesiana. O cladograma de consenso mostrado suporta a divisão sugerida para Subfamília $\kappa$ -KTx. Modificado de (Vandendriessche et al., 2012).....	36
Figura 7. Disposição das ligações dissulfeto na toxina $\kappa$ -Hefutoxin 1 nativa, e seus análogos. Modificada de (Moreels et al., 2016). .....	37
Figura 8. Alinhamento das sequências das $\kappa$ -KTx encontradas no escorpião <i>Heterometrus petersii</i> . $\kappa$ -KTx 3 e $\kappa$ -KTx 4 encontradas no transcrito; e $\kappa$ -KTx 2 isolada da peçonha com atividade biológica testada.....	40
Figura 9. Esquema representativo das principais estruturas dos canais iônicos para potássio. A. Canal K <sub>IR</sub> ; B. Canais K2P; C. Canal K <sub>V</sub> ; D e E. Canais ativados por cálcio SKCa e BKCa, respectivamente. Adaptado e modificado de (Kuzmenkov et al., 2015). .....	46
Figura 10. Estrutura do canal de K <sub>ATP</sub> K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1 humano. O receptor de sulfoniluréias (SUR1) que possui 17 segmentos transmembrana juntamente com 2 domínios de ligação de nucleotídeos intracelulares chamados NBD1 e NBD2. Modificado de (Lee et al., 2017). .....	47
Figura 11. Representação esquemática da organização dos canais K <sub>V</sub> . A. Estrutura do canal na sua conformação aberta. B. Estrutura do canal na sua conformação fechada. C. Representação de uma das $\alpha$ subunidades do canal. Modificado de (Barros et al., 2012). .....	55
Figura 12. Representação do filtro de seletividade de KcsA, apresentando os sítios de interação do íon ao longo do filtro (S1, S2, S3, S4, S0) e a sequência de resíduos de aminoácidos que são	

responsáveis pela seletividade do poro (G79, Y78, G77, V76, T75). Modificado de (Treptow and Tarek, 2006). .....	56
Figura 13. Modelos de interação toxina-canal iônico para potássio e distribuição de aminoácidos chaves na toxina. A. Modelo da interação do tipo “Turret” da toxina ErgTx1 com o canal HERG. B. Resíduos de aminoácidos chaves para a interação do tipo “Anel de resíduos básicos” da toxina Pi4. C. Modelo <i>apamin-like</i> de duas toxinas, a Tsk e a ScytX com resíduos básicos situados na $\alpha$ -hélice. D. Modelo da “Díade funcional” da toxina AgTx2 com o canal do tipo Shaker (Bloqueador do poro). Modificado de (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Xu et al., 2003).....	60
Figura 14. Representação esquemática do canal de cálcio voltagem dependentes com cada uma das suas subunidades Modificado de (Catterall, 2011). .....	61
Figura 15. Sequência deduzida do peptídeo OcyC9 a partir de um clone de cDNA. Peptídeo sinal os primeiros 27 resíduos de aminoácidos, pro-peptídeo de 28-39 resíduos de aminoácidos e a sequência do peptídeo madura sublinhada. Tomada de (Silva et al., 2009).....	78
Figura 16. Perfil cromatográfico da peçonha bruta do escorpião <i>Opisthacanthus cayaporum</i> . A fração indicada (seta) foi recromatografada para posterior identificação e purificação do peptídeo. ....	79
Figura 17. Perfil cromatográfico da recromatografia do peptídeo OcyC9. A fração indicada (seta) que elui com RT 27 min corresponde ao peptídeo identificado e purificado da peçonha bruta do escorpião <i>Opisthacanthus cayaporum</i> . Gradiente de 15 a 40% de B, em 55 minutos, a fluxo de 1 mL /min. ....	80
Figura 18. Espectrograma da massa molecular de OcyC9. A figura ilustra a resolução monoisotópica do peptídeo OcyC9 [M+H] <sup>+</sup> : 2.545,03 Da obtido em MALDI TOF/TOF. ....	81
Figura 19. Espectrograma da massa molecular de OcyC9 no seu estado oxidado e reduzido. A figura ilustra a resolução monoisotópica do peptídeo OcyC9: A. OcyC9 com uma massa [M+H] <sup>+</sup> : 2.545,03 Da (Estado oxidado); B. OcyC9 com uma massa [M+H] <sup>+</sup> : 2.549,00 Da (Estado reduzido) obtido em MALDI TOF/TOF. ....	82
Figura 20. Sequência completa do peptídeo OcyC9. As séries “b” e “y” estão apresentadas no topo direito. ....	83
Figura 21. Espetro de massa de OcyC9. A figura ilustra a diferença de 18,02 Da entre a massa molecular do íon [M+H] <sup>+</sup> : 2.549,15 e a perda da molécula de água no primeiro resíduo de aminoácido do C- terminal “E”.....	84
Figura 22. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3 (n=5). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal K <sub>v</sub> 1.3 na presença do peptídeo OcyC9 (500 $\mu$ M). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	85
Figura 23. Efeito de 500 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3 (n=5). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 e na cor azul a corrente após lavagem da toxina. *RCF= corrente persistente; * S.E.M.=Erro padrão da média; p <i>value</i> = significância estatística ( <i>t student</i> ). ....	86
Figura 24. Efeito de 250 $\mu$ M do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal K <sub>v</sub> 1.3 na presença do peptídeo OcyC9MOD (250 $\mu$ M). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	87
Figura 25. Efeito de 250 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença	

do peptídeo OcyC9 MOD e na cor azul a corrente, após lavagem da toxina. *RCF= corrente persistente; * S.E.M.= Erro padrão da média; p value= significância estatística ( <i>t student</i> )......	87
Figura 26. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal K <sub>v</sub> 2.1 na presença do controle positivo TEA (10 mM) e o peptídeo OcyC9 (1 µM). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	88
Figura 27. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1µM) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (10 mM). *RCF: corrente persistente; * S.E.M= Erro padrão da média. ....	89
Figura 28. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal K <sub>v</sub> 2.1 na presença do controle positivo TEA (10 mM) e o peptídeo OcyC9 MOD (1 µM). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	90
Figura 29. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD (1µM) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (10mM).*RCF=corrente persistente; * S.E.M. = Erro padrão da média; p value= significância estatística ( <i>t student</i> ).....	90
Figura 30. Efeito de 1 µM do peptídeo OmTx2 sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal K <sub>v</sub> 2.1 na presença do controle positivo TEA (10 mM) e o peptídeo OmTx2 (1 µM). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	91
Figura 31. Efeito de 1 µM do peptídeo OmTx2 sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1µM) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (10mM). *RCF= corrente persistente; * média± S.E.M. = Erro padrão. ....	91
Figura 32. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal BKCa1.1 na presença do controle positivo TEA (100 mM) e o peptídeo OcyC9 (1 µM). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	92
Figura 33. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 sobre o canal BKCa1.1(n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1µM) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (100mM). *RCF= corrente persistente; * S.E.M. = Erro padrão da média; p value= significância estatística ( <i>t student</i> )......	93
Figura 34. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> ” do canal BKCa1.1 na presença do controle positivo TEA (100mM) e o peptídeo OcyC9 MOD (1µM). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	94
Figura 35. Efeito de 1 µM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (100 mM). *RCF= corrente persistente; * S.E.M. = Erro padrão da média; p value = significância estatística ( <i>t student</i> ). ....	94
Figura 36. Efeito de 1 µM do peptídeo OmTx2 sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra a cinética ou “ <i>Time-course</i> do canal BKCa1.1 na presença do controle positivo TEA (100mM) e o	

peptídeo OmTx2 (1 $\mu$ M). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto. ....	95
Figura 37. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OmTx2 sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K <sup>+</sup> . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1 $\mu$ M) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (100mM). *RCF= corrente persistente; * S.E.M. = Erro padrão da médio; p <i>value</i> = significância estatística ( <i>t student</i> ). ....	96
Figura 38. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1 (n=3). A figura ilustra o efeito dos compostos testados nas correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. Corrente controle na cor azul, corrente na presença do controle positivo Tolbutamide (100 $\mu$ M) na cor vermelha, corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1 $\mu$ M) e, na cor verde e azul claro as respectivas lavagens dos compostos. ....	97
Figura 39. Traços das correntes controle do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. ....	97
Figura 40. Traços das correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1 (n=3). A. Na presença de Tolbutamide (100 $\mu$ M). B. Após lavagem de Tolbutamide. ....	97
Figura 41. Traços das correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1 (n=3). A. Na presença do peptídeo OcyC9 (1 $\mu$ M). B. Após lavagem do peptídeo. ....	98
Figura 42. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1 (n=3). A figura ilustra o efeito dos compostos testados nas correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. Corrente controle na cor azul, corrente na presença do controle positivo Tolbutamide (100 $\mu$ M) na cor vermelha, corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD (1 $\mu$ M) e, na cor verde e azul claro as respectivas lavagens dos compostos. ....	98
Figura 43. Traços das correntes controle do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1. ....	99
Figura 44. Traços das correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. A. Na presença de Tolbutamide (100 $\mu$ M). B. Após lavagem de Tolbutamide. ....	99
Figura 45. Traços das correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. A. Na presença do peptídeo OcyC9 MOD (1 $\mu$ M). B. Após lavagem do peptídeo. ....	99
Figura 46. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OmTx2 sobre o canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1 (n=3). A figura ilustra o efeito dos compostos testados nas correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. Corrente controle na cor azul, corrente na presença do controle positivo Tolbutamide (100 $\mu$ M) na cor vermelha, corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1 $\mu$ M) e, na cor verde e azul claro as respectivas lavagens dos compostos. ....	100
Figura 47. Traços das correntes controle do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1. ....	100
Figura 48. Traços das correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. A. Na presença de Tolbutamide (100 $\mu$ M). B. Após lavagem de Tolbutamide. ....	101
Figura 49. Traços das correntes do íon K <sup>+</sup> no canal K <sub>IR</sub> 6.2/SUR1. A. Na presença do peptídeo OmTx2 (1 $\mu$ M). B. Após lavagem do peptídeo. ....	101
Figura 50. Cinética nos Canais Ca <sub>v</sub> 1.2 e Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> na presença dos controles positivos e negativos (n=1). A. Cinética do canal Ca <sub>v</sub> 1.2. B. Cinética do canal Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> . ....	102
Figura 52. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.2 (n=2). A figura ilustra a cinética ou "Time-course" do canal Ca <sub>v</sub> 1.2 na presença do peptídeo OcyC9 (1 $\mu$ M) e do controle positivo Isradipine (3 $\mu$ M). I <sub>controle</sub> = I último <i>sweep</i> antes da aplicação da toxina. I <sub>Toxina</sub> = I último <i>sweep</i> na	

presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}} = I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}} =$  Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ . .....103

Figura 53. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.2$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média .....104

Figura 54. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $\text{Ca}_v1.2$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{Ca}_v1.2$  na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}} = I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{Toxina}} = I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}} = I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}} =$  amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ . .....105

Figura 55. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $\text{Ca}_v1.2$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM: Erro padrão da média. ....105

Figura 58. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}} = I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{Toxina}} = I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}} = I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}} =$  Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ . .....106

Figura 59. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e, na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média; *p value*= significância estatística (*t student*). .....107

Figura 60. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}} = I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{Toxina}} = I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}} = I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}} =$  Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ . .....108

Figura 61. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média; *p value* = significância estatística (*t student*). .....108

Figura 62. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  na presença do peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}} = I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{Toxina}} = I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}} = I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}} =$  Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ . .....109

Figura 63. Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e, na cor cinza o

controle positivo Isradipine (3  $\mu$ M). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média; p value = significância estatística (*t student*).....110

Figura 82. Alinhamento do peptídeo OcyC9. A figura ilustra a porcentagem de similaridade da toxina OcyC9 com as Omtoxinas da subfamília  $\kappa$ -KTx. “\*” resíduos de aminoácidos idênticos, “:” resíduos de aminoácidos conservativos e, “.” resíduos de aminoácidos semiconservativos. ....113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise do deslocamento do TAU no canal K <sub>v</sub> 1.3 na presença do peptídeo OcyC9. ..85	
Tabela 2. Análises do deslocamento do TAU no canal K <sub>v</sub> 1.3 na presença do peptídeo OcyC9 MOD. ....86	

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição das atividades biológicas e das principais características dos transcritos e/ou peptídeos isolados, encontrados nas abordagens de transcrito e proteoma, respectivamente, da peçonha do escorpião *O. cayaporum*. ..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico
TFA	Ácido Trifluoroacético
ACN	Acetonitrila
$\alpha$ -toxinas	Alpha toxinas
A	Ampere
MgADP	<i>Adenosine 5'- (Trihydrogen pyrophosphate) Magnesium Salt</i>
$\beta$ -toxinas	Beta toxinas
I	Corrente
TAU	Constante de tempo de ativação
ADP	Difosfato de Adenosina
Da	Daltons
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ED50	Dose letal 50
ESI-MS	<i>Electrospray ionization</i>
EST	<i>Expressed Sequences Tag</i>
HEK	<i>Human Embrionic Kidney</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
Na <sup>+</sup>	Íon de sódio
Cl <sup>-</sup>	Íon de cloreto
K <sup>+</sup>	Íon de potássio
Ca <sup>+2</sup>	Íon de cálcio
Mg <sup>+2</sup>	Íon de magnésio

MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MMP-2	Metaloproteinase-2
APs	Potencial de Ação
KDa	Quilodalton
RCF	<i>Remanent current fraction</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP – HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
NaScTxS	Toxinas moduladoras de canais de sódio isoladas de escorpiões
KTx	Toxinas bloqueadoras de canais de potássio
ATP	Trifosfato de Adenosina
Uniprot	<i>Universal Protein Resource</i>
V	Voltagem
$I_{\text{controle}}$	Corrente controle
$I_{\text{toxina}}$	Corrente na presença da toxina
$I_{\text{Lavagem toxina}}$	Corrente após lavagem da toxina
$I_{\text{pred, controle}}$	Amplitude da corrente, assumindo o linear “ <i>Rundown</i> ”
# SW controle	Número do <i>sweep</i> no qual a $I_{\text{controle}}$ foi medida
# SW toxina	Número do <i>sweep</i> no qual a $I_{\text{toxina}}$ foi medida
# SW lavagem toxina	Número do <i>sweep</i> no qual a $I_{\text{lavagem toxina}}$ foi medida

## **LISTA DE AMINOÁCIDOS**

**A:** Alanina

**C:** Cisteína

**D:** Aspartato ou ácido aspártico

**E:** Glutamato ou ácido glutâmico

**F:** Fenilalanina

**G:** Glicina

**H:** Histidina

**I:** Isoleucina

**K:** Lisina

**L:** Leucina

**M:** Metionina

**N:** Asparagina

**P:** Prolina

**Q:** Glutamina

**R:** Arginina

**S:** Serina

**T:** Treonina

**V:** Valina

**W:** Triptofano

**Y:** Tirosina

## SUMARIO

I. INTRODUÇÃO .....	22
1. Generalidades sobre os escorpiões.....	22
2. O gênero <i>Opisthacanthus</i> .....	23
2.1. <i>Opisthacanthus madagascariensis</i> .....	23
2.2. <i>Opisthacanthus cayaporum</i> .....	25
3. Toxinas que atuam em canais iônicos.....	28
3.1. Toxinas que modulam os canais de sódio .....	29
3.2. Toxinas que modulam os canais de cloreto .....	31
3.3. Toxinas que modulam ou bloqueiam os canais de potássio .....	31
3.3.1. $\alpha$ -KTx.....	32
3.3.2. $\beta$ -KTx.....	33
3.3.3. $\kappa$ -KTxs.....	35
3.3.3.1. $\kappa$ -KTxs 1.....	36
3.3.3.2. $\kappa$ -KTxs 2.....	38
3.3.3.3. $\kappa$ -KTxs 3.....	39
3.3.3.4. $\kappa$ -KTxs 4 e $\kappa$ -KTxs 5 .....	39
3.3.4. $\delta$ -KTxs .....	41
3.3.5. $\lambda$ -KTxs .....	42
3.3.6. $\epsilon$ -KTx.....	42
3.4. Toxinas que modulam os canais de Cálcio .....	42
4. Canal de Potássio .....	43
4.1. Canais de $K^+$ retificadores de influxo ( $K_{IR}$ ) .....	45
4.1.2. Canal de $K^+$ dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ) .....	45
4.2. Canais de $K^+$ com 2 poros <i>in tandem</i> .....	48
4.3. Canais de $K^+$ dependentes de voltagem ( $K_v$ ) .....	48
4.3.1. Canal de $K^+$ do tipo Shaker ( $K_v1.1$ - $K_v1.8$ ) .....	48
4.3.2. Canal de $K^+$ do tipo <i>Shab</i> ( $K_v2.1$ e $K_v2.2$ ).....	49
4.3.3. Canal de $K^+$ do tipo <i>Shaw</i> ( $K_v3.1$ - $K_v3.4$ ) .....	49
4.3.4. Canal de $K^+$ do tipo <i>Shal</i> ( $K_v4.1$ - $K_v4.3$ ) .....	50

4.3.5. Canal de K <sup>+</sup> do tipo K <sub>v</sub> 7 (K <sub>v</sub> 7.1-K <sub>v</sub> 7.5) .....	50
4.3.6. Canal de K <sup>+</sup> do tipo EAG.....	51
4.4. Canal do tipo Kligand (Canal de K <sup>+</sup> ativado por ligantes) .....	52
4.5. Canais de K <sup>+</sup> ativados por Cálcio .....	52
5. Propriedades eletrofisiológicas dos K <sub>v</sub> .....	53
6. Mecanismo de ação do canal de K <sup>+</sup> .....	54
7. Interação das KTx com o canal de K <sup>+</sup> .....	57
8. Canal de Cálcio .....	60
8.1. Ca <sub>v</sub> 1.....	62
8.2. Ca <sub>v</sub> 2.....	64
8.3. Ca <sub>v</sub> 3.....	65
II. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA.....	67
II. OBJETIVOS .....	68
1. Objetivo geral .....	68
1.1. Objetivos específicos.....	68
III. Materiais e métodos .....	69
1. Animais.....	69
2. Extração e Quantificação da peçonha.....	69
3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	69
4. Recromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....	70
5. Determinação das massas moleculares por espectrometria de massa .....	70
6. Desenho do peptídeo análogo .....	71
7. Síntese de peptídeos .....	71
8. Caracterização eletrofisiológica .....	71
8.1. Transformação das células .....	71
8.2. Transfecção e Cultura de Células de linhas estáveis .....	72
8.2.1. Canal do tipo Shaker (K <sub>v</sub> 1.3) e BK (KCa1.1) .....	72
8.2.2. Canal do tipo Shab (K <sub>v</sub> 2.1) .....	72
8.2.3. Canal K <sub>ATP</sub> .....	72
8.2.4. Canal Ca <sub>v</sub> 1.2, e Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> ( <i>C-terminally short splice variant</i> ) .....	73
8.3. Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i> .....	73
8.3.1. Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i> (K <sub>v</sub> 1.3) .....	73

8.3.2. Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i> K <sub>v</sub> 2.1, BK (KCa 1.1), K <sub>ATP</sub> (K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1).....	74
8.3.3. Experimentos em <i>Whole-cell Patch-Clamp</i> Ca <sub>v</sub> 1.2 e Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> .....	75
8.4. Protocolo Experimental.....	75
9. Análise estatística.....	77
V. RESULTADOS.....	78
1. Purificação, identificação e sequenciamento do peptídeo OcyC9.....	78
2. Atividade eletrofisiológica.....	84
2.1. Efeito dos peptídeos sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3.....	84
2.1.1. Efeito de 500 μM do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3.....	84
2.1.2. Efeito de 250 μM OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>v</sub> 1.3.....	86
2.2. Efeito dos peptídeos sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1.....	88
2.2.1. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1.....	88
2.2.2. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1.....	89
2.2.3. Efeito de 1 μM do peptídeo OmTx2 sobre o canal K <sub>v</sub> 2.1.....	90
2.3. Efeito dos peptídeos sobre o canal BK (KCa1.1).....	92
2.3.1. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 sobre o canal BK (KCa1.1).....	92
2.3.2. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal BK (KCa 1.1).....	93
2.3.3. Efeito de 1 μM do peptídeo OmTx2 sobre o canal BK (KCa1.1).....	95
2.4. Efeito dos peptídeos sobre o canal K <sub>ATP</sub> (K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1).....	96
2.4.1. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 sobre o canal K <sub>ATP</sub> (K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1).....	96
2.4.2. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K <sub>ATP</sub> (K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1).....	98
2.4.3. Efeito de 1 μM do peptídeo OmTx 2 sobre o canal K <sub>ATP</sub> (K <sub>IR</sub> 6.2/SUR 1).....	100
2.5. Cinética nos Canais Ca <sub>v</sub> 1.2 e Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> na presença dos controles positivos e negativos.....	101
2.6. Efeito dos peptídeos sobre o Canal Ca <sub>v</sub> 1.2.....	102
2.6.1. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.2.....	102
2.6.2. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.2.....	104
2.7. Efeito dos peptídeos sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.3.....	106
2.7.1. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> .....	106
2.7.2. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> .....	107
2.7.3. Efeito de 1 μM do peptídeo OmTx2 sobre o canal Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>s</sub> .....	109
VI. DISCUSSÃO.....	111
VII. CONCLUSÕES.....	125

VIII. PERSPECTIVAS .....	126
IX. BIBLIOGRAFIA .....	127

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Generalidades sobre os escorpiões

Os escorpiões são os artrópodes peçonhentos mais antigos que têm sobrevivido às transformações geoclimáticas sem mudanças fenotipicamente consideráveis (Barnes, 2005; Bergeron and Bingham, 2012). Eles encontram-se distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo, principalmente nas savanas, desertos e florestas (Lucas and Meier, 1995; Polis, 1990) com hábito noturno, reprodução sexual e fecundação interna. Sua dieta é a base de insetos, aranhas, outros escorpiões, serpentes, lagartos e até roedores (Bergeron and Bingham, 2012). A grande maioria deles pode ser encontrada debaixo das pedras e/ou nas cascas das árvores; requerendo cuidado aquele que apresenta hábito domiciliar (Bioclon, 1997; Lucas et al., 1992).

Morfologicamente, os escorpiões apresentam uma estrutura segmentada incluindo a cabeça (Prosoma), abdômen (Mesosoma) e cauda (Metasoma). Os apêndices principais incluem os pedipalpos, pectines, oito pés e um télson no ápice da cauda (Hjelle, 1990). Sistemáticamente, os escorpiões pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Scorpionida com 22 famílias e aproximadamente 1.500 espécies distribuídas no mundo todo (Brownell and Polis, 2001; Lourenço, 2003a; Prendini and Wheeler, 2005; Sissom, 1990). No Brasil, existem quatro famílias (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Hemiscorpiidae) com aproximadamente 20 gêneros, e quase 120 espécies de escorpiões descritas (Lourenço, 1991; Lourenço, 2002; Lourenço, 2003b).

Em alguns países, o escorpionismo é um problema de saúde pública, Estima-se que aconteçam mais de um milhão de acidentes por ano (Chippaux and Goyffon, 2008);consequentemente faz-se necessária uma atenção médica devido ao alto índice de mortes (Chippaux, 2012). As espécies dos gêneros *Androctonus*, *Buthus* e *Leiurus* (Norte da África e Médio Oriente), *Centruroides* e *Tityus* (Continente Americano), *Mesobuthus* (Ásia) e *Parabuthus* (África) são as maiores responsáveis pelos acidentes com humanos (Caliskan et al., 2013),sendo a família Buthidae a que

envolve a maioria das espécies mais perigosas e tóxicas aos humanos (Francke, 1985).

## **2. O gênero *Opisthacanthus***

A família Hemiscorpiidae contém 12 gêneros (Soleglad et al., 2015) incluindo *Opisthacanthus*, *Hadogenes* e *Cheloctonus* que são considerados animais não perigosos para o homem. Portanto, devido à baixa toxicidade da sua peçonha existem poucos estudos. O gênero *Opisthacanthus* encontra-se distribuído no Caribe, América Central, América do Sul, África e Madagascar (Lourenço, 2003) e atualmente, esse gênero compreende 28 espécies, sendo que no Brasil, o gênero tem duas espécies: *Opisthacanthus borboremai* e *O. cayaporum* (Lourenço and Fe, 2003).

### **2.1. *Opisthacanthus madagascariensis***

Trabalhos realizados com a peçonha do escorpião africano *O. madagascariensis* têm evidenciado que a peçonha bruta do escorpião contém principalmente peptídeos de massas moleculares entre 4 e 5 KDa, assumindo que a maioria são neurotoxinas de cadeia curta (Dai et al., 2002). O IsCT foi o primeiro peptídeo linear citotóxico caracterizado, possui massa molecular de 1501,9 Da, 13 resíduos de aminoácidos com o C-terminal amidado, mas não possui cisteínas na sua sequência (Dai et al., 2001). Esse peptídeo demonstrou ter atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas, e ser hemolítico (Dai et al., 2001).

Posteriormente, Dai e colaboradores, em 2002, purificaram e caracterizaram três novos peptídeos nomeados de IsCT2 (1463,9 Da), IsCTf (1242,80 Da) e IsCT2f (1204,74 Da) que possuem uma alta similaridade com o peptídeo IsCT, previamente descrito (Dai et al., 2001), embora IsCT2, IsCTf e IsCT2f não possuam amidação no extremo C-terminal. IsCT2 demonstrou um amplo espectro de atividade sobre bactérias (Gram positivas e negativas) e fungos; no entanto, a atividade hemolítica gerada foi fraca (Dai et al., 2002). Finalmente, os peptídeos IsCTf e IsCT2f não apresentaram atividade hemolítica nem antimicrobiana, o que pode ser explicado

devido a esses peptídeos não apresentarem uma estrutura anfipática e em decorrência, uma perda da atividade citolítica (Dai et al., 2002).

Com a descoberta do peptídeo IsTX isolado da peçonha do escorpião *O. madagascariensis* em 2004 descreveu-se pela primeira vez um peptídeo inibidor de canal de K<sup>+</sup> que está presente apenas na peçonha do escorpião macho (Yamajil et al., 2004). IsTX é um peptídeo de 41 resíduos de aminoácidos que apresenta uma conformação estrutural do tipo ( $\alpha/\beta$ ), sendo classificado como toxina de escorpião da família  $\alpha$ -KTx 6 que possui uma  $\alpha$  hélice e duas fitas  $\beta$  estabilizadas por 4 ligações dissulfeto (Yamajil et al., 2004). IsTX apresentou uma grande similaridade à HsTX1 isolada de *Heterometrus spinifer* (Lebrun et al., 1997). IsTX bloqueia o subtipo de canal K<sub>v</sub>1.3 com uma afinidade menor (K<sub>v</sub>1.3, 1.59  $\mu$ M; K<sub>v</sub>1.1, 12.7  $\mu$ M) quando comparada ao bloqueio desse subtipo de canal pela toxina HsTX1, além de ter afinidade para canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> (Yamajil et al., 2004).

As Omtoxinas isoladas da peçonha do escorpião *O. madagascariensis* são peptídeos pequenos entre 23 e 27 resíduos de aminoácidos. OmTx1, OmTx2 e OmTx3 foram purificados da peçonha e apresentam massas moleculares de 2984 Da, 3148 Da e 2518 Da, respectivamente (Chagot et al., 2005). OmTx1 e OmTx4 apresentam uma alta similaridade com OmTx2, diferenciando-se só no extremo C-terminal, enquanto que OmTx1 e OmTx2 são idênticos exceto pelo resíduo de aminoácido adicional tirosina presente no extremo C-terminal de OmTx2 (Chagot et al., 2005). Análises eletrofisiológicas sobre os canais do tipo K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 e K<sub>v</sub>1.3 expressos em oócitos de *Xenopus laevis* demonstraram que, em concentração de 500  $\mu$ M o peptídeo OmTx1 induziu 17%, 12% e 24% de bloqueio nos canais, respectivamente. OmTx2 (500  $\mu$ M) gerou um pequeno bloqueio nos canais K<sub>v</sub>1.1 (8%) e K<sub>v</sub>1.2 (10%), enquanto no canal K<sub>v</sub>1.3 o bloqueio foi de 36% (Chagot et al., 2005).

Finalmente, 500  $\mu$ M do peptídeo OmTx3 bloqueou K<sub>v</sub>1.1 (33%), K<sub>v</sub>1.2 (8%) e K<sub>v</sub>1.3 (70%) indicando que essas toxinas possuem os canais K<sup>+</sup> como alvo molecular (Chagot et al., 2005). Desta forma, foram classificadas como  $\kappa$ -KTx por possuírem dobramento ( $\alpha/\alpha$ ) com duas  $\alpha$  hélices ligadas pelo *loop* e estabilizadas por 2 ligações dissulfeto. Além disso, as toxinas apresentam a díade funcional que caracteriza os

peptídeos bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>, exceto o peptídeo OmTx3 que não tem o resíduo aromático na primeira  $\alpha$  hélice (Chagot et al., 2005). É importante destacar que sugere-se que o peptídeo OmTx2 modula a secreção de insulina dependente da glicose nas células pancreáticas e nenhum dos peptídeos foi tóxico para camundongos nem diferentes insetos (Chagot et al., 2005), sugerindo uma possível aplicação biotecnológica do peptídeo.

## 2.2. *Opisthacanthus cayaporum*

*O. cayaporum* (Figura 1) é uma espécie endêmica que está distribuída desde o sul do Pará até a região central de Tocantins. Esse escorpião caracteriza-se por ter hábito gregário (Lourenço, 1981) e viver em cupinzeiros. A diferenciação sexual pode ser realizada nessa espécie pela contagem do número de dentes no pente nos indivíduos adultos (7 e 9 cm) sendo que nos machos o pente possui entre 10-12 dentes e nas fêmeas, entre 7-8 dentes (Lourenço, 1981).

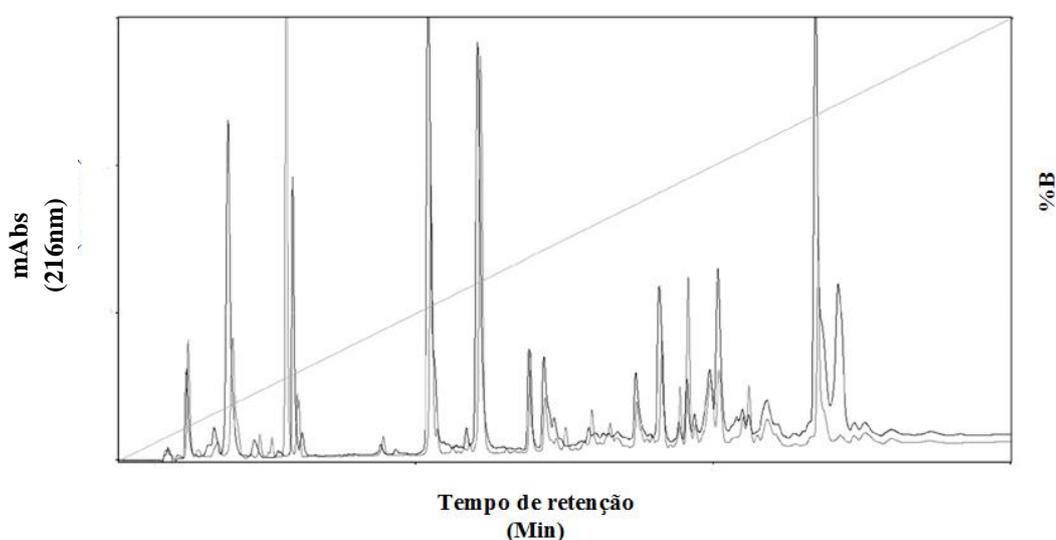


**Figura 1.** Exemplar do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*. (Foto: Thalita Camargos).

Schwartz e colaboradores, em 2008, separaram 80 frações da peçonha bruta do escorpião *O. cayaporum* mediante HPLC. Essas frações foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF-MS e LC/ESI-MS identificando-se o total de 221 massas moleculares, sendo que 42% dos componentes possuem massas entre 229,2 a 2.985,3 Da, 37% com massas entre 3045,0 a 7258,6 Da e 12% entre 7458,4 a 9429 Da.

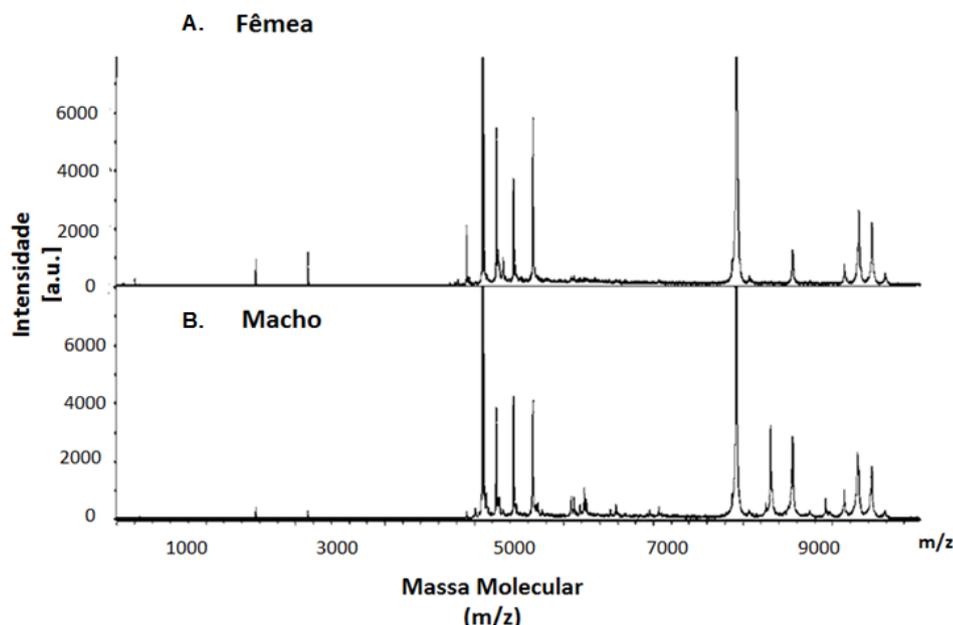
Destacando que aproximadamente 60% dos componentes da peçonha bruta do escorpião de estudo possui massas moleculares inferiores a 5 KDa, permitiu-se inferir que a maioria dos compostos são peptídeos curtos entre 40-45 resíduos de aminoácidos aproximadamente. Por degradação de Edman foram identificados e sequenciados 17 peptídeos a partir das frações mais abundantes e representativas da peçonha, entre os quais um peptídeo do tipo escorpina (8315 Da) com atividade antimicrobiana, duas proteínas do tipo fosfolipase A<sub>2</sub> (14 kDa) e peptídeos bloqueadores de canal de K<sup>+</sup>(Schwartz et al., 2008).

A peçonha bruta do escorpião foi avaliada quanto ao seu efeito em nervos isolados de ratos e insetos (baratas) usando o ensaio de *sucrose-gap*. Obteve-se a ED50 de 1,1 mg/mL para nervos de insetos e, na concentração de 3 mg/mL apenas uma redução de 9% no potencial de ação (AP) nos nervos de ratos; sugerindo, a especificidade da peçonha por insetos. Embora, a peçonha desse escorpião não seja considerada de importância clínica, os efeitos observados sugeriram a presença na peçonha de peptídeos específicos para Na<sup>+</sup> (Schwartz et al., 2008). Além disso, comparando-se o perfil cromatográfico e o espectro de massas moleculares, observou-se não há variações qualitativas importantes entre as peçonhas de machos e fêmeas (Figura 2 e 3) (Schwartz et al., 2008).



**Figura 2.** Comparação dos perfis cromatográficos da peçonha bruta de machos (Preto) e fêmeas (Cinza) obtidos com a injeção de 1 mg de peçonha bruta do escorpião *O. cayaporum* em coluna C18 mediante RP-HPLC com gradiente linear de 0% da solução A (0,12% TFA em água) a 60 % da solução

B (0,10% TFA em ACN.). Observam-se diferenças quantitativas entre os perfis cromatográficos de machos e fêmeas. Adaptado de (Schwartz et al., 2008).



**Figura 3.** Espectros de massa (MALDI-TOF) da peçonha bruta do escorpião *O. cayaporum*. A. Espectro de massa da peçonha de fêmea. Espectro de massa da peçonha do macho. Os componentes com massas moleculares de 8315 e 8930 Da apresentaram uma maior concentração na peçonha de machos, enquanto que massas moleculares de 4909 e 7929 Da na peçonha de fêmeas. Somente foram observadas diferenças qualitativas. Os dados foram adquiridos na faixa de 1000 e 10000 Da usando 1 mg de amostra. Adaptado de(Schwartz et al., 2008).

Posteriormente, Silva e colaboradores (2009) caracterizaram pela primeira vez o transcrito da glândula da peçonha do escorpião *O. cayaporum*. A cobertura média da biblioteca de cDNA obtida foi de 2230 ufc/mL com 66% de clones recombinantes. O total de 118 sequências de nucleotídeos foram identificadas e agrupadas em 61 sequências únicas (17 *contigs* e 44 *singlets*). Cerca de 36% dos transcritos obtidos correspondem a peptídeos parecidos a toxinas, 39% transcritos de processos celulares e 2 % de compostos únicos do escorpião (Silva et al., 2009).

Foram identificados dois tipos de componentes, principalmente precursores de peptídeos com sequências similares a toxinas, entre os quais peptídeos do tipo escorpina, 3 peptídeos antimicrobianos pequenos, 3 bloqueadores para canal de K<sup>+</sup>, e proteínas envolvidas em diferentes processos celulares (Silva et al., 2009). Esses resultados foram comparados com àqueles obtidos na análise proteômica realizado

na mesma peçonha, encontrando uma considerável correspondência entre os dois conjuntos de dados.

Entre os transcritos foi encontrado o precursor OcyC1 cuja massa molecular teórica monoisotópica é de 1433,83 Da e se correlaciona ao peptídeo purificado da peçonha com massa molecular experimental de 1432,8 Da (Schwartz et al., 2008). Ele apresenta 75% de similaridade com o peptídeo antimicrobiano IsCT, isolado da peçonha do escorpião *O.madagascariensis* (Dai et al., 2001) e igualmente o OcyC2 com massa molecular experimental de 1286.84 Da. Tanto OcyC1 como OcyC2 são peptídeos semelhantes a outros peptídeos antimicrobianos encontrados nas peçonhas de *Mesobuthus martensii* (BmKn1 e BmKn2) (Zeng et al., 2004; Zeng et al., 2001) e *Hadrurus gertschi* (Hge027 e Hge028) (Schwartz et al., 2007), no entanto o transcrito OcyC3 apresenta homologia com o peptídeo pandinin 2 (Corzo et al., 2001) e o peptídeo BmKb1 (Luo et al., 2005) isolados da peçonha dos escorpiões *Pandinus imperator* e *Mesobuthus martensii*, respectivamente. O transcrito do OcyC3 tem uma massa molecular monoisotópica teórica de 2946,72 Da que não foi encontrada na análise proteômica (Schwartz et al., 2008). OcyC1, OcyC2 e OcyC3 têm sido classificados como peptídeos que não possuem ligações dissulfeto (Silva et al., 2009).

No momento, sabe-se que o escorpião de estudo *O. cayaporum* não é considerado de importância médica e, as pesquisas realizadas tem se focado nas abordagens de proteoma e transcrito da peçonha desse escorpião (Schwartz et al., 2008; Silva et al., 2009), além da identificação da kappa-KTx 2.5 e OcyKTx2, que são peptídeos que interagem com o canal de K<sup>+</sup> (Camargos et al., 2011; Schwartz et al., 2013) (Quadro 1).

### **3. Toxinas que atuam em canais iônicos**

O estudo de toxinas isoladas de animais peçonhentos, principalmente de escorpiões, tem permitido conhecer melhor as características dos diferentes tipos de canais iônicos, devido à alta especificidade e afinidade das toxinas (Rodriguez De La Vega et al., 2003). A peçonha de escorpiões é uma mistura complexa de enzimas,

lipídeos, aminas biogênicas, sais, nucleotídeos, polipeptídeos e peptídeos (Possani et al., 2000), sendo esses últimos aqueles capazes de interagir com eficácia e afetar a permeabilidade da membrana aos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  tanto de células excitáveis quanto as não excitáveis (Possani et al., 2000; Zhijian et al., 2006). A maioria desses compostos tem sido identificados diretamente na peçonha. No entanto, devido ao incremento de novas estratégias de análise ao nível de proteoma e transcrito, o número de compostos identificados está aumentando significativamente. Portanto, as novas abordagens podem ajudar a identificar a presença de outros compostos com arranjos estruturais diferentes no futuro próximo (Rodríguez de la Vega et al., 2013).

Segundo diversos autores (Possani et al., 1999; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Tan et al., 2006; Tytgat et al., 1999), as toxinas de escorpião podem ser classificadas segundo: 1. O canal iônico envolvido (sódio, cálcio, cloreto e potássio); 2. O receptor específico ao qual a toxina se liga; 3. A estrutura tridimensional da toxina e, 4. O tipo de resposta induzida (ativação / inativação do canal). Toxinas de escorpião que interagem com os canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  têm sido descritas e caracterizadas.

### **3.1. Toxinas que modulam os canais de sódio**

As toxinas que interagem com os canais de sódio dos mamíferos são particularmente as de maior importância médica. Essas toxinas são conhecidas como NaScTxS e têm se caracterizado por modular a atividade desses canais alterando as correntes do íon na membrana da célula, o que, nas células excitáveis, resulta em uma modificação no potencial de ação (Rodríguez de la Vega and Possani, 2007). Tais toxinas de 58 a 76 resíduos de aminoácidos com 3 ou 4 ligações dissulfeto (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005) e se classificam em dois grupos: as  $\alpha$ -toxinas, que retardam a inativação do canal pela interação com o segmento 3 do domínio IV na subunidade  $\alpha$  do canal (Bosmans and Tytgat, 2007; Couraud et al., 1982; Meves et al., 1986; Rodríguez de la Vega and Possani, 2005) e as  $\beta$ -toxinas, que deslocam o potencial de ativação para potenciais de membrana mais negativos, devido à ligação ao sítio 4 do domínio II na mesma subunidade do canal (Rodríguez de la Vega and Possani, 2007; Weinberger et al., 2010; Zhijian et al., 2006).

**Quadro 1.** Descrição das atividades biológicas e das principais características dos transcritos e/ou peptídeos isolados, encontrados nas abordagens de transcrito e proteoma, respectivamente, da peçonha do escorpião *O. cayaporum*.

Transcritos / Peptídeo isolado	Massa molecular (Da)	Similaridade	Atividade biológica
OcyC10	8,112	Peptídeos específicos para insetos como LaIT ( <i>Liocheles australasiae</i> ) (Matsushita et al., 2007).	Sem atividade descrita
OcyC11	8558,68	La1 ( <i>Liocheles australasiae</i> ) (Matsushita et al., 2007).	Sem atividade descrita
OcyC7	5,905	Peptídeos tipo escorpina-like (Silva et al., 2009).	Sem atividade descrita
OcyC12	5084,25	Peptídeo IsTx ( <i>O. madagascariensis</i> ) (Yamajil et al., 2004).	Sem atividade descrita
OcyC8			
k-KTxS 2.5 (Peptídeo isolado)	3132,26	Omtoxinas ( <i>O. madagascariensis</i> ) (Chagot et al., 2005).	k-KTxS 2.5 bloqueia reversivelmente os canais de potássio em células excitadas. k-KTxS 2.5 sintético: IC <sub>50</sub> : 71 μM (hKv1.4); 217 μM (hKv1.1); k-KTxS 2.5 nativo: 16 μM diminui a corrente em 20% no canal hKv1.1 e em 50% no canal hKv1.2. k-KTxS 2.5 não efeito: rKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, rKv1.4, rKv1.5, rKv1.6, hERG, <i>Shaker</i> , rKv2.1, rKv3.1, rKv3.2, rKv4.3 a 250 μM nem Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5 e DmNav1 a 2,5 μM (Camargos et al., 2011).
OcyKTx2 α-KTx6.17 (Peptídeo isolado)	3807		α-KTx6.17 inibe a totalidade da corrente no canal de potássio K <sup>+</sup> do tipo <i>Shaker</i> com K <sub>d</sub> de 82 nM e Kv1.3 de linfócitos humanos com K <sub>d</sub> de 18 nM (Schwartz et al., 2013).
OcyC9	2545	Omtoxinas ( <i>O. madagascariensis</i> ) (Chagot et al., 2005).	Sem atividade descrita

### 3.2. Toxinas que modulam os canais de cloreto

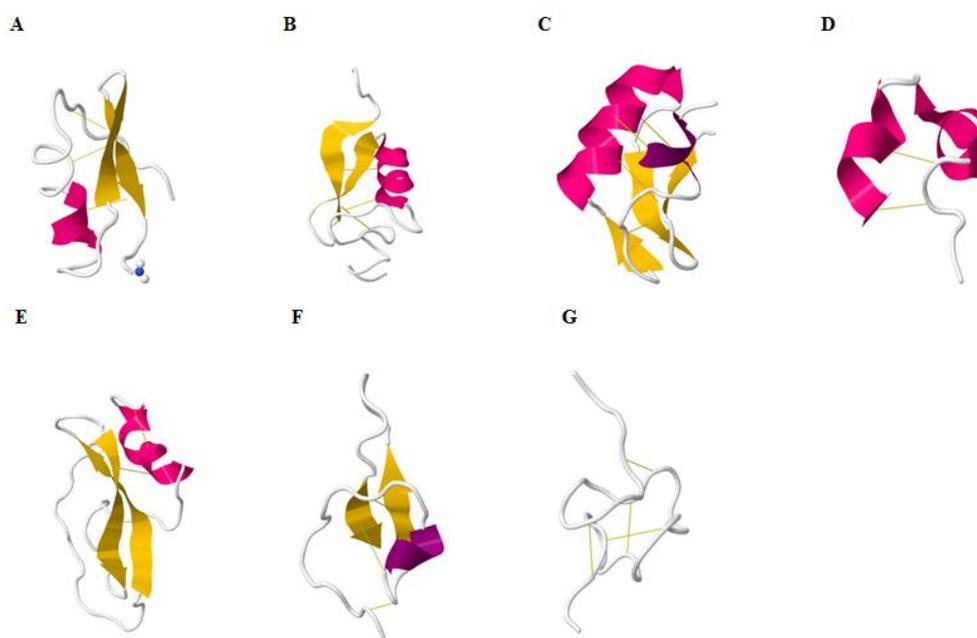
Poucas toxinas de escorpiões foram descritas como moduladoras de canais de  $\text{Cl}^-$ . Entre elas a clorotoxina (ClTx), isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus* que contém 36 resíduos de aminoácidos (DeBin and Strichartz, 1991), e que anos depois, foi demonstrado que não se liga a canais de  $\text{Cl}^-$  e sim, à proteína de matriz metaloproteinase-2 (MMP-2) (Deshane et al., 2003). ClTx tem se estabelecido como um peptídeo promissor para um possível tratamento de cânceres do tipo glioma, melanoma, neuroblastoma etc (Dardevet et al., 2015). GaTx1 foi a primeira toxina descrita na peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* de 3,7 KDa e com 4 ligações dissulfeto que age nos canais envolvidos no transporte do íon  $\text{Cl}^-$  nas membranas celulares, cujas alterações levam a doenças como fibrose cística, regulando com alta afinidade a condutância desse ânion (Fuller et al., 2007).

Recentemente, foram identificados dois novos peptídeos da família das clorotoxinas. AaCtx é o primeiro peptídeo isolado da peçonha do escorpião *Androctonus australis* e possui 70% de similaridade com a ClTx. AaCtx foi ativo na invasão e migração das células de glioma humano (Rjeibi et al., 2011). Bs-Tx7, isolado a partir da peçonha do escorpião *Buthus indicus*, tem 66% de identidade com clorotoxina (ClTx) e 82% com GaTx1. Bs-Tx7, em concentrações micromolares, aumenta a atividade da Metalloproteínas de Matriz 2 humana (hMMP2), indicando a importância dessa toxina nas doenças associadas à diminuição da atividade do MMP2 (Potencial marcador de tumores celulares) (Ali et al., 2016).

### 3.3. Toxinas que modulam ou bloqueiam os canais de potássio

Tomando em conta os dados do Uniprot, dos 400 ligantes polipeptídicos que estão reportados e isolados de animais, 250 são toxinas de escorpião, o que reforça a ideia de que a peçonha de escorpiões se constitua em uma fonte diversificada de ligantes para canais de  $\text{K}^+$  (Mouhat et al., 2008). KTx é terminologia dada às toxinas isoladas da peçonha de escorpião que interagem com os canais de  $\text{K}^+$ . As toxinas KTx são peptídeos que agem como bloqueadores do poro do canal (Quintero-Hernández et al., 2013), que ao se ligarem aos canais impedem o fluxo do íon potássio através das membranas celulares, gerando assim, uma alteração na excitabilidade celular.

As KTx caracterizam-se por possuírem entre 20 a 95 resíduos de aminoácidos estabilizados por 2 a 4 ligações dissulfeto (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004). Segundo o arranjo estrutural e a função das KTx, esses peptídeos foram classificados em 6 subfamílias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  e  $\lambda$ - KTx (Chagot et al., 2005; Kuzmenkov et al., 2016; Srinivasan Kellathur et al., 2002; Tytgat et al., 1999). Recentemente foram descritos dois peptídeos que constituem uma nova família de toxinas bloqueadoras de canal de  $K^+$ , as  $\epsilon$ -KTx, que se caracterizam por não possuírem as estruturas secundárias clássicas de  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$  (Cremonez et al., 2016) (Figura 4).



**Figura 4.** Estruturas tridimensionais de KTx representantes de cada uma das sete subfamílias. A. Noxiustoxin ( $\alpha$ -KTx), código PDB 1SXM do escorpião *Centruroides noxius*. B. Toxina Hge36 Scorpine-like peptide ( $\beta$ -KTx), código PDB 5IPO do escorpião *Hadrurus gertschi*. C. Toxina ErgTx1 ( $\gamma$  - KTx), código PDB 1PX9 do escorpião *Centruroides noxius*. D.  $\kappa$ -Hefutoxin ( $\kappa$ -KTx), código PDB 1HP9 do escorpião *Heterometrus fulvipes*. E. Toxina LmKKT-1a do tipo Kunitz ( $\delta$ -KTx), código PDB 2 M01 do escorpião *Lychas mucronatus*. F. Toxina  $\lambda$ MK1 do tipo ICK ( $\lambda$ -KTx), código PDB 1C6W do escorpião *Mesobuthus eupeus*. G. Toxina Ts11 com a conformação da nova subfamília ( $\epsilon$ -KTx), código PDB 2MSF do escorpião *Tityus serrulatus*.

### 3.3.1. $\alpha$ -KTx

Essa subfamília caracteriza-se por ter 165 sequências peptídicas descritas, distribuídas em 29 grupos segundo a sua estrutura primária (Chen et al., 2012a; Diego-García et al., 2014; Diego-García et al., 2013; Zeng et al., 2012)

(<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx> 22-04-2019). As  $\alpha$ -KTx possuem de 20 a 40 resíduos de aminoácidos (Kuzmenkov et al., 2016), com arranjo em duas fitas  $\beta$  unidas a uma  $\alpha$ -hélice por 3 ou 4 ligações dissulfeto (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Tytgat et al., 1999) e apresentam atividade sobre os canais de potássio dependentes de voltagem e/ou canais de potássio ativados por cálcio (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004).

Noxiustoxin ( $\alpha$ -KTx2.1) (Figura 4A) foi a primeira toxina bloqueadora de canal de  $K^+$  dessa subfamília identificada e isolada da peçonha do escorpião *Centruroides noxius* (Possani et al., 1982). Posteriormente, Charybdotoxin (ChTX;  $\alpha$ -KTx1.1) foi isolada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* e considerada como peptídeo padrão que inibe canal de  $K^+$  do tipo  $K_v1$  (Garcia et al., 1994; Miller et al., 1985). Outros exemplos são Iberiotoxin (IbTX;  $\alpha$ -KTx1.3) (Galvez et al., 1990), Margatoxin (MgTX;  $\alpha$ -KTx2.2) (Garcia et al., 1994), Kaliotoxin (KTX;  $\alpha$ -KTx3.1) (Romi et al., 1993) e Agitoxin-2 (AgTX2;  $\alpha$ -KTx3.2) (Garcia et al., 1994).

Nos últimos anos, novos peptídeos têm sido descritos e classificados nessa subfamília, conferindo mais uma vez que as  $\alpha$ -KTx são importantes bloqueadores para os canais de  $K_v$ . A maioria das  $\alpha$ -KTx têm sido isoladas das peçonhas dos escorpiões da família Buthidae; mesmo assim, as  $\alpha$ -Ktx também são identificadas nas famílias Chactidae, Euscorpiidae, Vaejovidae, Caraboctonidae, Hemiscorpiidae, e Scorpionidae (Cologna et al., 2011; Diego-García et al., 2013; He et al., 2013).

### 3.3.2. $\beta$ -KTx

Esses peptídeos contêm aproximadamente de 45 a 75 resíduos de aminoácidos e possuem na sua estrutura uma  $\alpha$ -hélice e duas fitas- $\beta$ , unidas por 3 ligações dissulfeto (Diego-García et al., 2008; Kuzmenkov et al., 2016; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Tan et al., 2006; Tytgat et al., 1999). Essa subfamília pode ser subdividida em três grupos. O primeiro deles inclui os peptídeos relacionados à TsTx- $K\beta$  como, por exemplo, TsTx- $K\beta$  de *Tityus serrulatus*, Ttr $\beta$ KTx de *T. trivittatus*, Tdi $\beta$ KTx de *T. discrepans*, Tst $\beta$ KTx de *T. stigmurus*, Tco 42.14 de *T. costatus*, MeuTXK $\beta$ 1 e MeuTXK $\beta$ 2 de *Buthus eupeus*, AaTXK $\beta$  de *A. australis* e BuTXK $\beta$  de *B.*

*occitanus* (Quintero-Hernández et al., 2013); sendo que os peptídeos TsTx-K $\beta$  de *Tityus serrulatus* que bloqueia K<sub>v</sub> 1.1 com IC<sub>50</sub> de 90 nM, e Tst $\beta$ KTx de *T. stigmurus* que bloqueia os canais K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 e K<sub>v</sub>1.3 (Diego-García et al., 2008). MeuTXK $\beta$ 1 de *Mesobutus eupeus* bloqueia os canais K<sub>v</sub> com baixa afinidade (Zhu et al., 2010), enquanto que AaTXK $\beta$  de *A. australis* é o primeiro peptídeo ativador seletivo do canal K<sub>v</sub>7.4 e também tem efeito sobre os subtipos K<sub>v</sub>7.3, K<sub>v</sub>7.2 e K<sub>v</sub>7.5 (Landoulsi et al., 2013), atividades eletrofisiológicas obtidas experimentalmente.

Ao segundo grupo pertencem os peptídeos homólogos da BmTXK $\beta$  (Figura 4B), ou seja aqueles peptídeos identificados dos escorpiões da família Buthidae como, por exemplo, BmTXK $\beta$ , BmTXK $\beta$ 2, TdiKIK, TtrKIK, TcoKIK e TstKMK (Almeida et al., 2013; Diego-García et al., 2008), e Caraboctonidae, como Hge $\beta$ KTx (Diego-García et al., 2008). Finalmente, o último grupo dessa subfamília são os peptídeos *Scorpine-like* (Figura 4B; Figura 5C), conhecidos como peptídeos órfãos com, pelo menos, 18 peptídeos. Quanto à relação estrutura-função, as  $\beta$ -KTx caracterizam-se por terem sua região N-terminal como a responsável pela atividade citolítica e antimicrobiana, devido à sua similaridade com as defensinas de insetos; e a região C-terminal responsável pelo bloqueio dos canais para K<sup>+</sup>, uma vez que interage diretamente com o poro do canal (Diego-García et al., 2008). Tem se identificado para esses peptídeos atividades antibacteriana, antimalárica e antifúngica (Conde et al., 2000; Uawonggul et al., 2007). As  $\beta$ -KTx têm sido identificadas a partir de análises de proteoma e transcrito de Buthídeos, Caraboctonus, Euscorpis, Liochelídeos e Escorpionídeos (Ma et al., 2012).

Também foram identificadas moléculas como opiscorpina isolada do escorpião *Opisthophthalmus carinatus* (Zhu and Tytgat, 2004), HS1 do escorpião *Heterometrus laoticus* (Uawonggul et al., 2007), HgeScplp 1 e 2 do escorpião *Hadrurus gertschi* (Diego-García et al., 2008; Schwartz et al., 2007), Heteroscorpine 1 (Uawonggul et al., 2007), SJE005C, SJE056C1 e 2 do escorpião *Scorpiops jendeki* (Ma et al., 2009), Ev37 do escorpião *Euscorpis validus* (Feng et al., 2013), Tco 41.46-2 do escorpião *Tityus costatus Karsch* (Diego-García et al., 2005), UySC11 e 2 do escorpião *Urodacus yaschenkoi* (Luna-Ramírez et al., 2013), que possuem grande similaridade com as *escorpina-like*.

**A.**

```

Beta-KTx 2      -----KLVKYAVPVGTLRLLQTIVVHKVGKTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF
TstXK-beta     -----KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDDHCNDIERKDGEGCHGFKCKCARD---
MeuTXK-beta-1  GFREKHFQRFVKYAVPESTLRTVLQTVVHKVGKTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF

```

**B.**

```

HgebetaKTx     KSTVGGQKLLKLNQAVDKVKEVLNKSEYMCPPVSSFCCKQHCARLGKSGQCDDLECIQS-----
Beta-KTx 52.1  -----KVLAVGEDLNMMSELGCPFIDKWCEDHCESSKLVGKCENFDCCSCVKLGK
Beta-KTx 12    -----KILAVGEDLNMMSELGCPFIDKWCEDHCESSKLVGKCENFDCCSCVKLGK
Beta-KTx 17    -----IAGVADLNMMSELGCPFIEKWCEDHCESSKLVGKCENFDCCSCVKLGK

```

**C.**

```

Scorpine       -----GLIHKVTKVQQLCAFNQDMAGWCEKSCQAAEGKNGYCHGTCCKCGVPLSYRRL
Panscorpine    GWINEEKIQKKIDERMGNTVLGGMAKAIVHKMAKNEFQCMANMDMLGNCEKHCQT-SGEKGYCHGTCCKCGVPLSY---
Opiscorpine-2  KWLNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCAMMDPTGSCETHCQKASGEGYCHGTCCKCGVPLSY---
Opiscorpine-1  KWFNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEGYCHGTCCKCGVPLSY---
Opiscorpine-3  KWLNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEGYCHGTCCKCGVPLSY---

```

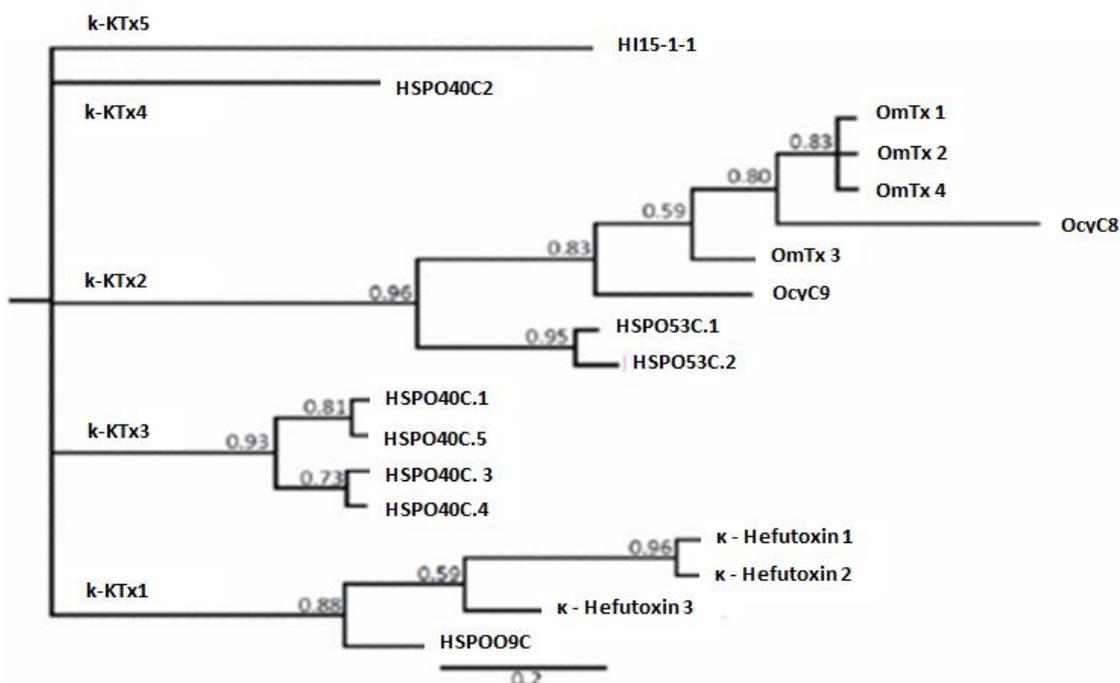
**Figura 5.** Alinhamento das seqüências das  $\beta$ KTx. A. Peptídeos relacionados à TsTx-K $\beta$ . B. Peptídeos homólogos da BmTXK $\beta$ . C. Peptídeos do tipo *Scorpine*.

### 3.3.3. $\kappa$ -KTxs

As  $\kappa$ -KTxs têm sua estrutura formada por duas  $\alpha$ -hélices (CS $\alpha$ / $\alpha$ ) paralelas estabilizadas por 2 ligações dissulfeto (Nirthanan et al., 2005; Quintero-Hernández et al., 2013; Srinivasan Kellathur et al., 2002) e, quimicamente, são de natureza básica. Mediante análises de proteoma e transcrito, 18 seqüências foram identificadas (Chen et al., 2012a) (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx> 22-04-2019). No entanto, esse tipo de arranjo estrutural também tem sido identificado nas toxinas de moluscos das espécies *Conus floridanus floridensis* e *C. villepini* (Möller et al., 2005) e da planta *Viscum álbium* (Pal et al., 2008).

São descritos cinco peptídeos para o gênero *Heterometrus* distribuídos assim: k-Hefutoxin 1 (Figura 4D) e 2 isolados da peçonha do escorpião *Heterometrus fulvipes* (Srinivasan Kellathur et al., 2002), k-KTx1.3, HeTx203, HeTx204 isolados da peçonha do escorpião *Heterometrus spinifer* (Nirthanan et al., 2005) e seis para o gênero *Opisthacanthus* (Camargos et al., 2011; Silva et al., 2009), as nomeadas Omtoxinas, OmTx1, OmTx2, OmTx3 e OmTx4 isoladas do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis* (Chagot et al., 2005) e, finalmente, OcyC8 e OcyC9 do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (Camargos et al., 2011; Silva et al., 2009).

Foram realizadas análises filogenéticas para avaliar a relação entre as  $\kappa$ -KTxs descritas e, segundo a árvore de consenso obtida pela inferência Bayesiana, observa-se que existe claramente uma divisão das  $\kappa$ -KTxs em 5 grupos (Figura 6) (Vandendriessche et al., 2012), enquanto Quintero-Hernández e colaboradores classificam as  $\kappa$ -KTxs em 4 subfamílias (Quintero-Hernández et al., 2013).



**Figura 6.** Cladograma por inferência bayesiana. O cladograma de consenso mostrado suporta a divisão sugerida para Subfamília  $\kappa$ -KTx. Modificado de (Vandendriessche et al., 2012).

### 3.3.3.1. $\kappa$ - KTxs 1

$\kappa$ -Hefutoxin 1 também conhecido com k-KTx1.1 foi o primeiro peptídeo isolado da peçonha do escorpião *Heterometrus fulvipes* e o primeiro representante dessa subfamília, caracteriza-se por bloquear as correntes nos subtipos  $K_v1.2$  com IC de 150  $\mu$ M e  $K_v1.3$  com IC de 40  $\mu$ M. Têm se descrito que a interação desse peptídeo com os  $K_v$  é similar a interação das  $\alpha$ -KTx, devido à presença do aminoácido lisina e do resíduo hidrofóbico (geralmente fenilalanina ou tirosina); resíduos de aminoácidos que estão completamente expostos na superfície e interagem diretamente com o canal (Srinivasan Kellathur et al., 2002). Com 60% de identidade ao peptídeo k-KTx1.1, o peptídeo k-KTx1.3 isolado da peçonha do escorpião *Heterometrus spinifer* apresentou

uma atividade bloqueadora sobre os subtipos Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3 (Nirathanan et al., 2005).

$\kappa$ -Hefutoxin 1 bloqueia a totalidade da corrente no canal Kv10.1; portanto, visando investigar e entender a relação estrutura-função dessa toxina com o canal foram testados vários análogos (Moreels et al., 2016).  $\kappa$ -Hefutoxin 2 ( $\kappa$ -KTx1.2) e  $\kappa$ -hefutoxin 3 ( $\kappa$ -KTx1.3) são peptídeos homólogos naturais de  $\kappa$ -Hefutoxin 1, isolados da peçonha do escorpião *Heterometrus fulvipes* e *Heterometrus spinifer*, respectivamente. Os análogos nomeados N1- $\kappa$ -Hefutoxin 1 (Glicina no extremo N-terminal deletado), N2- $\kappa$ -Hefutoxin 1 (Glicina e Histidina no extremo N-terminal deletados), Y5A- $\kappa$ -Hefutoxin 1 (substituição do resíduo tirosina por alanina na posição 5) e K19A- $\kappa$ -Hefutoxin 1 (substituição do resíduo lisina por alanina na posição 19), caracterizam-se por apresentarem alterações específicas nas suas sequências.

Além, dos análogos  $\kappa$ -Hefutoxin A e  $\kappa$ -Hefutoxin B que apresentam alterações na formação das ligações dissulfeto (Figura 7). Portanto, Moreels e colaboradores demonstraram que a presença da díade funcional (Tyr5/Lys19), os resíduos de aminoácidos (Gly1/His2) no extremo N-terminal e o extremo C-terminal amidado são características importantes para que a toxina  $\kappa$ -Hefutoxin 1 possa interagir com o canal (Kv10.1) nesse caso (Moreels et al., 2016).



**Figura 7.** Disposição das ligações dissulfeto na toxina  $\kappa$ -Hefutoxin 1 nativa, e seus análogos. Modificada de (Moreels et al., 2016).

HSP009C também conhecido como  $\kappa$ -KTx 1.4, encontrado no transcrito da glândula da peçonha do escorpião *Heterometrus petersii* (Ma et al., 2010) é homólogo à  $\kappa$ -Hefutoxin do escorpião *H. fulvipes* (Srinivasan Kellathur et al., 2002), mas não têm alvo molecular definido ainda.

### 3.3.3.2. $\kappa$ -KTxs 2

As nomeadas Omtoxinas  $\kappa$ -KTx 2.1 (OmTx1),  $\kappa$ -KTx 2.2 (OmTx2),  $\kappa$ -KTx 2.3 (OmTx3) e  $\kappa$ -KTx 2.4 (OmTx4) do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis*; OcyC8, OcyC9 do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*; e HSP053.1-2 do escorpião *Heterometrus petersii* fazem parte desse grupo apresentando 60% de identidade entre elas, mas quando comparada com o peptídeo  $\kappa$ -KTx1.1 ( $\kappa$ -Hefutoxin) do grupo  $\kappa$ -KTxs 1 a identidade é de 20%. O peptídeo  $\kappa$ -KTx 2.3 induz uma redução de 70% na corrente no canal  $K_v1.3$  a 500  $\mu$ M (Chagot et al., 2005).  $\kappa$ -KTx 2.5, melhor conhecida como OcyC8, inibe as correntes do subtipo de canal  $K_v1.1$  e  $K_v1.4$  com IC de 217 e 71  $\mu$ M, respectivamente; ressaltando que a toxina OcyC8 apenas afetou os canais humanos expressos em células de mamífero, e não os homólogos de rato expressos em oócitos de *Xenopus laevis* (Camargos et al., 2011), Com relação ao peptídeo OcyC9 nenhum alvo molecular foi definido ainda.

O peptídeo HSP053.1, também conhecido como  $\kappa$ -KTx 2.7 isolado da peçonha do escorpião *Heterometrus petersii* que tem como alvo molecular o canal  $K_v7.1$ , a uma concentração de 10  $\mu$ M inibe as correntes em 17.8%. No entanto, o peptídeo HSP053.2 também conhecido como  $\kappa$ -KTx 2.8 isolado do mesmo escorpião possui atividade inibitória sobre o canal  $K_v1.3$  diminuindo a corrente em 35,1% a 1  $\mu$ M, e em subtipo  $K_v7.1$  diminuindo a corrente em 44,9% a 10  $\mu$ M (Chen et al., 2012a).

Com as análises do transcrito da glândula da peçonha do escorpião *Heterometrus spinifer*, foi possível identificar 2 novos membros desse grupo, nomeados HeTx204 e HeTx203 (Chen et al., 2012a); peptídeos que adotam o arranjo estrutural (CS- $\alpha/\alpha$ ) estabilizado por 4 cisteínas, padrão semelhante ao peptídeo OmTx3 (Chagot et al., 2005). HeTx204 e HeTx203 diferem apenas por um único resíduo de aminoácido e apresentam uma alta homologia com os outros membros do

grupo. O peptídeo HeTx204 quando testado a concentrações micro molares possui a capacidade de bloquear canal  $K_v1.3$  a  $1 \mu\text{M}$  diminuindo a corrente em 35%, e o canal  $K_v7.1$  a  $10 \mu\text{M}$  diminuindo a corrente em 45%. Acredita-se que o efeito nesses canais é devido à presença dos resíduos básicos Lys20 e Lys24 no peptídeo; no entanto, o peptídeo HeTx203 bloqueia levemente apenas o canal  $K_v7.1$  a  $10 \mu\text{M}$  diminuindo a corrente em 18% (Chen et al., 2012a).

### 3.3.3.3. $\kappa$ -KTxs 3

A terceira divisão ou grupo das  $\kappa$ -KTx está representada pelos peptídeos HSP040C.1 ( $\kappa$ -KTxs 3.1), HSP040C.3 ( $\kappa$ -KTxs3.2), HSP040C.4 ( $\kappa$ -KTxs 3.3), e HSP040C.5 ( $\kappa$ -KTxs 3.4) encontrados no transcrito da glândula da peçonha do escorpião *Heterometrus petersii* (Ma et al., 2010). Todos eles têm em suas sequências a presença da díade funcional; que pode estar formada pelos resíduos F7/K21 no peptídeo  $\kappa$ -Hefutoxina 1 ou F7/K18 no peptídeo OmTx1 (Vandendriessche et al., 2012). Sugerindo então que o peptídeo HSP040C é um estado intermediário entre as OmTxs e as  $\kappa$ -hefutoxins, o que levaria a pensar que tanto as OmTxs e  $\kappa$ -hefutoxins podem ter uma origem evolutiva comum (Chagot et al., 2005). Os peptídeos HSP040C.1 e HSP040C 5 caracterizam-se por terem nas suas sequências uma lisina adicional (K18), que possivelmente poderia induzir a insensibilidade dos canais de  $K^+$  dependentes de voltagem como foi demonstrado com o peptídeo  $\kappa$ -Hefutoxina 3 (Vandendriessche et al., 2012).

### 3.3.3.4. $\kappa$ -KTxs 4 e $\kappa$ -KTxs 5

HSP040C.2 e HI15-1-1 ( $\kappa$ -KTx 5.1) possuem sequências únicas mostrando pouca semelhança com os outros membros da subfamília  $\kappa$ -KTx; portanto, eles são os únicos representantes do grupo  $\kappa$ -KTx 4 e  $\kappa$ -KTx 5, respectivamente (Vandendriessche et al., 2012). HSP040C.2 também conhecida como  $\kappa$ -KTx 4.1 foi encontrada no transcrito da glândula da peçonha do escorpião *Heterometrus petersii* (Ma et al., 2010); esse peptídeo caracteriza-se por ter a díade funcional (F5/K16) similar àquela observada no peptídeo OmTx1 (Vandendriessche et al., 2012). O peptídeo HI15-1-1 também, conhecido como  $\kappa$ -KTx 5.1, isolado da peçonha do escorpião *Heterometrus laoticus*, é o primeiro membro caracterizado dessa

subfamília; apresenta 77 % de identidade com o peptídeo OcyKTx3 isolado do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (Schwartz et al., 2008); no entanto, dessa toxina só se conhecem os primeiros 13 resíduos de aminoácidos do N-terminal.

$\kappa$ -KTx 5.1 caracteriza-se por bloquear os subtipos Kv1.1-Kv1.6 e Kv1.8; ressaltando que o efeito foi mais sensível para os canais Kv1.1 e Kv1.6 com IC 9,9  $\mu$ M, sendo que a toxina se liga diretamente ao poro do canal (Vandendriessche et al., 2012). Sabe-se que as  $\kappa$ -KTx além de inibirem as correntes de K<sup>+</sup> também podem modificar a cinética da abertura do canal “gating” (Camargos et al., 2011; Srinivasan Kellathur et al., 2002).

A grande maioria das  $\kappa$ -KTx são consideradas bloqueadoras fracas para canal de K<sup>+</sup>, devido à baixa afinidade dessas toxinas sobre esses canais, o que provavelmente pode sugerir que o seu alvo molecular seja outro (Nirthanan et al., 2005).

É importante destacar a presença das diferentes  $\kappa$ -KTx encontradas no escorpião *Heterometrus petersii* (Figura 8); onde tem se encontrado um total de sete sequências, sendo que quatro (HSP040C.1; HSP040C.5; HSP040C.3; HSP040C.4) formam o grupo das  $\kappa$ -KTx 3, e uma sequência única da toxina HSP040C.2 no grupo  $\kappa$ -KTx 4 foram obtidas a partir do transcrito da glândula da peçonha, sem atividade biológica avaliada ainda. Entretanto, duas sequências (HSP053C.1; HSP053C.2) foram identificadas na peçonha com atividade biológica sobre canal de K<sup>+</sup> previamente descrita.



**Figura 8.** Alinhamento das sequências das  $\kappa$ -KTx encontradas no escorpião *Heterometrus petersii*.  $\kappa$ -KTx 3 e  $\kappa$ -KTx 4 encontradas no transcrito; e  $\kappa$ -KTx 2 isolada da peçonha com atividade biológica testada

### 3.3.4. $\delta$ -KTxs

Recentemente, foi caracterizada uma nova subfamília de toxinas de escorpião de cadeia longa que age no canal de  $K^+$ , e que possui propriedades inibitórias de serinoproteases e bloqueadores de canal de  $K^+$  (Chen et al., 2012a; Schwartz et al., 2007; Zhao et al., 2011). Este tipo de toxinas pode ter aproximadamente 60-70 resíduos de aminoácidos com 6 a 8 ligações dissulfeto. O dobramento estrutural do tipo Kunitz formado por duas fitas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por uma  $\alpha$  hélice nos segmentos C-terminal e N-terminal estabilizadas por 3 ligações dissulfeto, onde a primeira ligação é realizada entre o extremo C-terminal da  $\alpha$  hélice e uma das fitas  $\beta$ ; e a segunda e terceira ligações comunicam o extremo C-terminal da  $\alpha$  hélice com o C-terminal e N-terminal, respectivamente (Figura 4 E) (Chen et al., 2013). Análises da sequência de aminoácidos têm evidenciado que esses tipos de toxinas poderiam adotar o dobramento tipo Kunitz (Smith et al., 2011); no entanto, estudos da estrutura tridimensional ainda não são muito claros (Chen et al., 2013).

Peptídeos do tipo Kunitz estão presentes em múltiplos organismos incluindo plantas, animais e microrganismos (Chakrabarty et al., 2006; Hansen et al., 2007). A primeira toxina identificada dessa subfamília foi a  $\alpha$ -dendrotoxin isolada da peçonha de serpente (Szopa, 1973). Posteriormente, toxinas com esse tipo de dobramento foram isoladas e identificadas nas glândulas da peçonha de serpentes e de aranhas, em anêmonas do mar, caracóis e em lagartos (Yuan et al., 2008).

Toxinas de escorpião do tipo Kunitz têm sido encontradas e caracterizadas como inibidores de canal  $K_v1.3$  (Chen et al., 2012a). Chen e colaboradores (2013) demonstraram que estas toxinas possuem uma organização genômica única e que é diferente das outras KTxs caracterizadas, sendo evidente a ampla diversidade de toxinas de escorpião que podem interagir com o canal de  $K^+$ . Como por exemplo, a toxina LmKTT-1<sup>a</sup> encontrada na biblioteca do cDNA da glândula do escorpião *Lychas mucronatus*, caracteriza-se por inibir as correntes do canal  $K_v1.3$ ,  $K_v1.2$ ,  $K_v1.1$ , sendo a maior redução de 50 % no canal  $K_v1.3$  a 1  $\mu$ M. Atualmente, existem 7 toxinas (Hg1, BmKTT 1, BmKTT 2, BmKTT 3, LmKTT-1a, LmKTT-1b, LmKTT-1c) que fazem parte das  $\delta$ -KTxs e podem ser classificadas em 3 grupos (Chen et al., 2013).

### 3.3.5. $\lambda$ -KTxs

Os peptídeos da quarta subfamília caracterizam-se por adotar a conformação ICK (*Inhibitor Cystine Knot*) formados por 3 fitas  $\beta$  antiparalelas estabilizadas por 3 ligações de cisteína; esse arranjo estrutural é principalmente encontrado nas toxinas de caracóis e aranhas (Smith et al., 2011; Zhu et al., 2003). O ICK é uma modificação estrutural que é compartilhada com um grande grupo de polipeptídeos incluindo organismos evolutivamente distantes como plantas, fungos, moluscos marinhos e insetos (Zhu et al., 2003). Peptídeos isolados da peçonha de escorpiões que possuem esta modificação são poucos, e seus alvos moleculares são limitados a determinados receptores como canais de  $K^+$  ou receptores de Ryanodina (Gao et al., 2013). As toxinas de escorpião ImKTx1 e  $\lambda$ MK1 (Figura 4F) compartilham a modificação ICK e funcionalmente foram caracterizadas como bloqueadoras de canal de  $K^+$  (Gao et al., 2013).

### 3.3.6. $\epsilon$ -KTx

Com o descobrimento do peptídeo Ts11 isolado da peçonha do escorpião *T. serrulatus*, Cremonez e colaboradores (2016) demonstraram a estrutura terciária na toxina mediante RMN mostrando que a Ts11 não possui as estruturas secundárias clássicas ( $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ ) (Figura 4G). Segundo a análise funcional, pode-se inferir que essas toxinas são principalmente bloqueadoras de canal de  $K^+$  quando comparadas com outros alvos moleculares, e devido à sua baixa homologia com outras KTxs sugere-se que essas toxinas podem ser consideradas como os primeiros representantes de uma nova subfamília, nomeadas  $\epsilon$ -KTxs. Ts11 apresentou alta similaridade com o peptídeo Ts12; sendo que foram nomeadas como  $\epsilon$ -KTx 1.1 e  $\epsilon$ -KTx 1.2, respectivamente (Cremonez et al., 2016).

## 3.4. Toxinas que modulam os canais de Cálcio

Toxinas que bloqueiam ou modulam a atividade dos canais de cálcio dependentes de voltagem têm sido isoladas de várias espécies, principalmente das aranhas (King, 2007). No entanto, a  $\omega$ -conotoxina isolada do caracol marinho tem sido a toxina mais estudada e melhor caracterizada (Norton and Olivera, 2006; Olivera et

al., 1994). A maioria das toxinas que têm sido isoladas e caracterizadas nas peçonhas de escorpiões são principalmente bloqueadoras ou moduladoras para canais de  $K^+$  e  $Na^+$ , mas poucas para canais de  $Ca^{2+}$  têm sido descritas (Norton and McDonough, 2008). Existem basicamente dois grupos: o primeiro deles inclui as toxinas que interagem com os canais de  $Ca^{2+}$  de membrana e possuem cadeia longa, como por exemplo, a Kurtoxina, com 63 resíduos de aminoácidos isolada da peçonha do escorpião *Parabuthus transvaalicus* que modifica a condutância do íon no canal de cálcio do tipo T (Chuang et al., 1998).

O segundo grupo amplamente estudado é o das calcinas, peptídeos que possuem 33 ou 35 resíduos de aminoácidos (Schwartz et al., 2009) e que interagem com os receptores de Ryanodina presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, induzindo a liberação de cálcio intracelular (Valdivia and Possani, 1998). As calcinas são peptídeos extremamente básicos, propriedades que as tornam bons candidatos para permear a membrana (Lindgren et al., 2000; Rorsman et al., 2012b). Por exemplo, temos a Imperotoxina (Zamudio et al., 1997), Maurocalcina (Fajloun et al., 2000), Hemicalcina (Shahbazzadeh et al., 2007), Hadrucalcina (Schwartz et al., 2009) e Opicalcinas 1 e 2 (Zhu et al., 2003), sendo que esses dois últimos ainda não foram purificados nem testados quanto à suas atividades biológicas.

#### **4. Canal de Potássio**

Os sinais elétricos são essenciais para o desenvolvimento dos processos fisiológicos dos organismos, sendo esses processos dependentes do bom funcionamento dos canais iônicos (Frank et al., 2005). Os canais de  $K^+$  são muito importantes na regulação de processos fisiológicos como excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, regulação de secreção de fluidos, secreção de hormônios e ativação de linfócitos (Wickenden, 2002). Mais de 100 subtipos de canais seletivos a  $K^+$  foram descritos, com uma ampla distribuição nos tecidos (Miller, 2000).

Os  $K_v$ s constituem a maior família dos canais responsáveis pelo impulso nervoso, os quais podem se ativar ou não, em decorrência ao gradiente de voltagem que passa pela membrana plasmática. Esse tipo de canal é caracterizado por ter na

sua estrutura basicamente quatro subunidades homologas; cada uma com seis hélices transmembrânicas. Esses canais iônicos interagem frequentemente com as toxinas isoladas de animais venenosos, seja obstruindo o poro do canal (bloqueando o canal) ou modulando e alterando as propriedades físicas do mesmo (Mouhat et al., 2008).

Os canais de  $K^+$  estão localizados nas membranas celulares e têm como função controlar o transporte e o fluxo do íon  $K^+$  nas células; eles são extremamente importantes para o funcionamento das células tanto excitáveis quanto as não excitáveis presentes em todas as espécies, exceto alguns parasitas (Kuo et al., 2005). Uma vez elucidada a estrutura do canal de  $K^+$  da bactéria *Streptomyces lividans* nomeado de KcsA pelo grupo de MacKinnon (Doyle et al., 1998), identificou-se que esse canal primitivo é um tetrâmero formado por 4 subunidades idênticas com 2 domínios transmembrânicos (TM) ligados por uma região chamada poro, onde reside o filtro de seletividade do canal que basicamente está formado por uma série de resíduos de aminoácidos altamente específicos (T/SXGXGX) (Heginbotham et al., 1994).

O canal de  $K^+$  está formado principalmente pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que a subunidade  $\alpha$  é responsável pela estrutura e a maioria das funções do canal; enquanto a subunidade  $\beta$  afeta a cinética do canal (Pongs et al., 1999; Rettig et al., 1994; Scott et al., 1994) com a capacidade de influenciar e/ou modular as propriedades farmacológicas e biofísicas dos canais (Heinemann et al., 1996; Wickenden, 2002).

As pesquisas realizadas sobre canais de  $K^+$  mostram que é necessário o uso de ferramentas moleculares altamente específicas que possam modular a atividade do canal. Quimicamente, existem três tipos de ligantes que podem interagir com os canais de  $K^+$ ; os principais são: íons metálicos, substâncias de baixa massa molecular e polipeptídios (Wulff and Zhorov, 2008), que podem bloquear (fisicamente obstruem o poro) ou alterar a cinética do canal, modificando suas propriedades (Catterall et al., 2007). Entre esses ligantes, as toxinas de escorpião têm sido usadas principalmente para entender melhor o papel fisiológico dos canais de  $K^+$ .

De acordo com a estrutura primária e secundária, as KTxs podem atuar sobre subtipos específicos de canais para potássio (Panyi et al., 2006). Esta propriedade das KTx foi fundamental na caracterização da função e na identificação dos diversos subtipos de canal iônico (Abdel-Mottaleb et al., 2008; Martin-Eauclaire and Bougis, 2012; Rodriguez De La Vega et al., 2003). Portanto, baseado na estrutura e função, dos canais de  $K^+$ , estes podem ser agrupados em 4 famílias: (Figura 9): Canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ , com 12 subfamílias) (Gutman et al., 2005), Canais de  $K^+$  ativados por cálcio ( $K_{ca}$ , com 5 subfamílias) (Wei et al., 2005), canais de  $K^+$  retificadores de influxo ( $K_{IR}$ , com 7 subfamílias) (Kubo et al., 2005) e, finalmente, canais de  $K^+$  com 2 poros *in tandem* ( $K2P$ , com 16 subfamílias) (Goldstein et al., 2005).

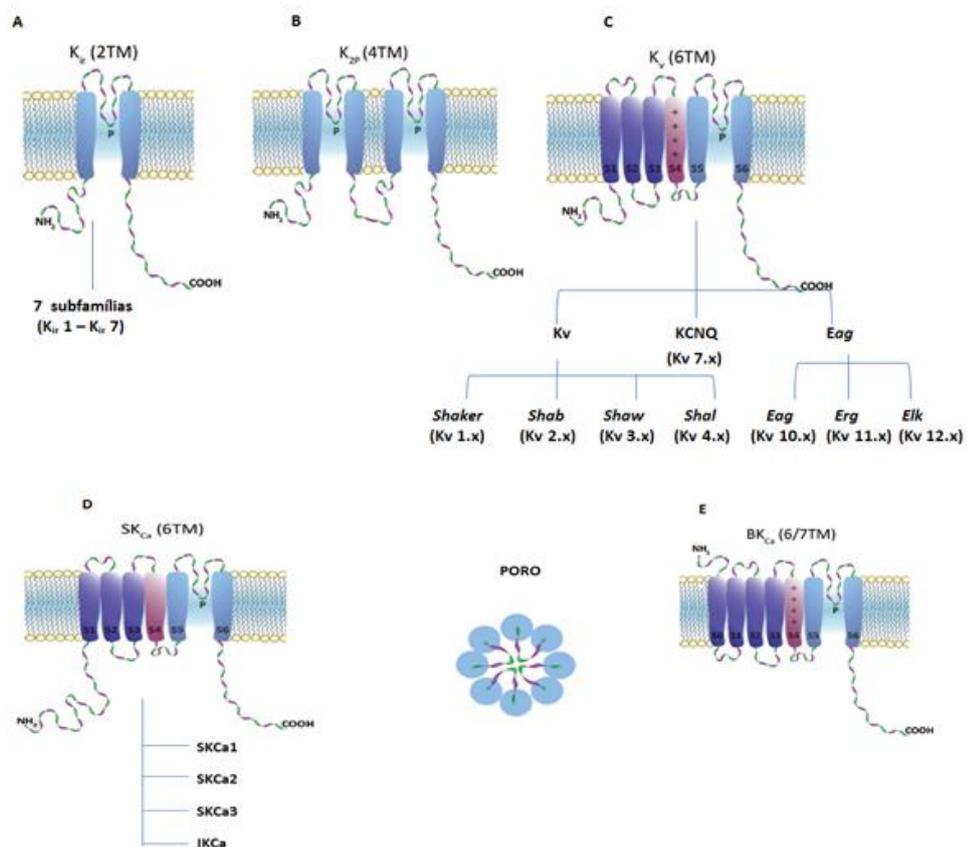
#### **4.1. Canais de $K^+$ retificadores de influxo ( $K_{IR}$ )**

A família do tipo  $K_{IR}$  caracteriza-se por apresentar o padrão estrutural do canal  $KcsA$ , suas subunidades contêm 2 segmentos transmembrânicos (TM) ligados ao domínio formador do poro e organizados como tetrâmeros. Têm se descrito para mamíferos 15 genes diferentes que codificam esse tipo de canal e estão agrupados em 7 subfamílias ( $K_{IR}$  1.x a  $K_{IR}$  7.x) (Hibino et al., 2010; Kubo et al., 2005). A função desse tipo de canal é regulada pelos nucleotídeos (ATP, ADP), fosforilação, proteína G e fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. Esses canais favorecem a entrada de  $K^+$  na célula que podem ser reguladas pelo íon  $Mg^{2+}$  e pela presença do ATP que interagem com o poro permitindo assim, manter o potencial de repouso (Hibino et al., 2010; Kubo et al., 2005) (Figura 9A). Esta família de canais inclui os retificadores internos fortes ( $K_{IR}$  2.1-2.4), os ativados por proteínas G ( $K_{IR}$  3.1-3.4) e os sensíveis ao ATP ( $K_{IR}$  6.1-6.2) que possuem receptores do tipo sulfonilureia (SUR) (Alexander Sph, 2009).

##### **4.1.2. Canal de $K^+$ dependente de ATP ( $K_{ATP}$ )**

O canal de  $K^+$  dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ) foi detectado pela primeira vez nos miócitos cardíacos distribuídos nas membranas do sarcolema (Noma, 1983) e pode ser encontrado nas células  $\beta$  pancreáticas (Henquin, 2000), neurônios (Amoroso et al., 1990; Ashford et al., 1988), coração, músculo esquelético (Bernardi et al., 1993; Spruce et al., 1987) e músculo liso vascular (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999; Spruce

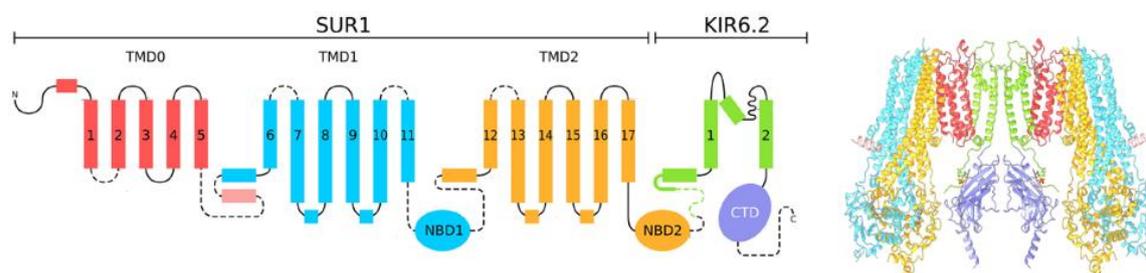
et al., 1987). O papel do canal  $K_{ATP}$  é muito importante na relação entre o metabolismo energético da célula e excitabilidade da membrana, devido à atividade desses canais ser reduzida pela presença do ATP intracelular e incrementada pela presença de MgADP (Koster et al., 2005; Schwappach et al., 2000). A redução do metabolismo celular leva à abertura dos canais  $K_{ATP}$ , produzindo efluxo de  $K^+$ , gerando a hiperpolarização da membrana e supressão da atividade elétrica, consequentemente inibindo a contração muscular, a liberação de neurotransmissores ou a secreção de hormônios (Ashcroft, 2005).



**Figura 9.** Esquema representativo das principais estruturas dos canais iônicos para potássio. A. Canal  $K_{IR}$ ; B. Canais  $K_{2P}$ ; C. Canal  $K_V$ ; D e E. Canais ativados por cálcio  $SKCa$  e  $BKCa$ , respectivamente. Adaptado e modificado de (Kuzmenkov et al., 2015).

O canal  $K_{ATP}$  está formado por 4 subunidades ( $K_{IR6}$ ) e 3 receptores do tipo Sulfonilureia ( $SUR1$ ,  $SUR2A$ , e  $SUR2B$ ) (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999; Babenko and Bryan, 2003; Clement et al., 1997; Chan et al., 2003; Inagaki et al., 1997; Koster et al., 2005). As subunidades  $K_{IR}$  possuem 2 domínios transmembranares (M1 e M2) e os receptores  $SUR$  17 domínios transmembranares (TMD1-17) que se acoplam

formando uma estrutura de estequiometria octamérica (Nichols, 2006; Shyng and Nichols, 1997). Essa conformação pode mudar dependendo do tipo de tecido no qual é expresso, como por exemplo o canal  $K_{ATP}$  expresso nas células  $\beta$  do pâncreas e nos neurônios está composto por  $K_{IR}6.2/SUR1$  e no músculo cardíaco e esquelético por  $K_{IR}6.2/SUR2A$  (Inagaki et al., 1997; Isomoto et al., 1996; Kinoshita et al., 2004; Koster et al., 2005; Miura et al., 2003; Okuyama et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998; Suzuki et al., 2001; Teramoto, 2006) (Figura 10).



**Figura 10.** Estrutura do canal de  $K_{ATP}$   $K_{IR}6.2/SUR1$  humano. O receptor de sulfonilurías (SUR1) que possui 17 segmentos transmembrana juntamente com 2 domínios de ligação de nucleotídeos intracelulares chamados NBD1 e NBD2. Modificado de (Lee et al., 2017).

Os receptores SUR são sensores intracelulares da relação ATP/ADP, que por sua vez regulam as atividades das subunidades  $K_{IR}$  e portanto, a ele tem sido atribuída a responsabilidade de ativar o canal; enquanto, as subunidades  $K_{IR}$  são responsáveis pela formação do poro do canal iônico e a inibição do mesmo. Portanto, a inibição do ATP resulta da interação com as subunidades  $K_{IR}6$  enquanto que a ativação pelos nucleotídeos com  $Mg^{+2}$  refletem a interação com os receptores SUR (Quayle et al., 1997). Farmacologicamente, tem se descrito que na presença de compostos como glibenclamida e tolbutamida (sulfonilurías) e pinacidil e cromakalim o fechamento e abertura do canal  $K_{ATP}$  estão, respectivamente, favorecidos (Ashcroft and Ashcroft, 1990; Dörschner et al., 1999; Doyle and Egan, 2003; Uhde et al., 1999). Como por exemplo, o aumento na relação ATP/ADP ou a presença de sulfonilurías induzem a inativação do canal e em decorrência, a despolarização da membrana, o que leva à abertura de canais de cálcio favorecendo o fluxo do íon ao interior da célula (aumento na concentração do cálcio intracelular), gerando processos fisiológicos como contração muscular (Gollasch et al., 1996; Jackson, 2000, 2005; Kinoshita et al., 2004;

Miura et al., 2003); ou liberação de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas (Ashcroft and Rorsman, 1989; Koster et al., 2005).

#### **4.2. Canais de $K^+$ com 2 poros *in tandem***

A família do tipo  $K_{2P}$  é codificada por 15 genes diferentes nos mamíferos e apresenta 4 segmentos transmembrânicos (TM) na sua estrutura; onde as subunidades  $\alpha$  sofrem dimerização na formação do canal. O primeiro gene que codifica para  $K_{2P}$  foi isolado do tecido neuromuscular de *Drosophila melanogaster* (Goldstein et al., 1996). Esses canais são regulados por uma ampla gama de fatores como pH, temperatura e a voltagem da membrana celular (Goldstein et al., 2005; Plant et al., 2005) (Figura 9B).

#### **4.3. Canais de $K^+$ dependentes de voltagem ( $K_v$ )**

Os canais  $K_v$  como proteínas transmembranares têm um papel importante na sinalização do  $Ca^{2+}$  intracelular, na regulação da pressão sanguínea (Brenner et al., 2000b), secreção de hormônios (Boyd, 1992), na imunidade (Deutsch et al., 1991), na liberação de neurotransmissores e na condução do impulso nervoso (Hu et al., 2001), na proliferação e migração celular, entre outros. Nas células excitáveis são os principais responsáveis pela repolarização da membrana celular, após o disparo do potencial de ação. Os  $K_v$  representam a família mais abundante dos canais de  $K^+$  previamente descritos, sendo codificados por genes diferentes em humanos (Gutman et al., 2005; Pongs and Schwarz, 2010) (Figura 9C). Os  $K_v$  podem ser classificados em 12 subfamílias, cujas subunidades reguladoras têm sido organizadas segundo o grau de similaridade nas sequências (Chandy, 1991; Gutman et al., 2005).

##### **4.3.1. Canal de $K^+$ do tipo Shaker ( $K_v1.1$ - $K_v1.8$ )**

O canal de  $K^+$  do tipo *Shaker* está associado com à subfamília  $K_v1$ , com oito genes diferentes descritos ( $K_v1.1$ - $K_v1.8$ ) assim: genes *KCNA* para mamífero (humano) e tipo *Shaker* para *Drosophila melanogaster* (Kamb et al., 1987), sendo evidente que esta subfamília é expressa tanto em células de mamífero quanto de inseto, mas com

variações estruturais. Segundo sua função, esse grupo de canais pode ser classificado em dois grupos; o primeiro deles está formado pelos canais do tipo retificadores retardados  $K_v1.1$ - $K_v1.8$ , e o segundo com um único representante de ativação rápida, o  $K_v1.4$  (Gutman et al., 2005). Esta subfamília tem sido amplamente estudada, inferindo-se que existe um grande número de peptídeos específicos isolados de animais venenosos que têm a capacidade de interagir e bloquear esses canais.

Os  $K_v1$  apresentam uma ampla distribuição: Cérebro ( $K_v1.1$ - $K_v1.4$ ,  $K_v1.6$ - $K_v1.8$ ), sistema nervoso ( $K_v1.1$ - $K_v1.2$ ), coração ( $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$  e  $K_v1.4$ - $K_v1.8$ ), músculo esquelético ( $K_v1.1$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.7$  e  $K_v1.8$ ), músculo liso ( $K_v1.2$  e  $K_v1.5$ ), pâncreas ( $K_v1.1$ - $K_v1.3$ ), pulmão ( $K_v1.7$ ), placenta ( $K_v1.7$ ), rim ( $K_v1.5$  e  $K_v1.8$ ), retina ( $K_v1.1$  e  $K_v1.2$ ), cólon ( $K_v1.5$  e  $K_v1.6$ ), células hematopoiéticas, linfócitos e osteoclastos ( $K_v1.3$ ) e a maioria dos peptídeos bloqueadores desses canais foram isolados de serpentes, escorpiões e anêmonas e são caracterizados por terem uma alta afinidade para os subtipos  $K_v1.1$  e  $K_v1.3$ ; enquanto que os subtipos  $K_v1.4$  e  $K_v1.5$  não tiveram ligantes peptídicos específicos descritos até o momento (Mouhat et al., 2008).

#### **4.3.2. Canal de $K^+$ do tipo *Shab* ( $K_v2.1$ e $K_v2.2$ )**

Os dois subtipos de canais que fazem parte dessa subfamília são codificados por dois genes (*KCNB*).  $K_v2.1$  e  $K_v2.2$  estão distribuídos no cérebro, coração, rim, músculo esquelético, pulmão, retina e pâncreas. Os peptídeos naturais que têm sido descritos com a capacidade de interagir como esses subtipos de canal foram caracterizados e isolados da peçonha de aranhas (Mouhat et al., 2008) e, até a data, somente um ligante peptídico de escorpião interage com o subtipo  $K_v2.1$  (Bagdáany et al., 2005) (<http://kaliumdb.org/> 03-04-2019).

#### **4.3.3. Canal de $K^+$ do tipo *Shaw* ( $K_v3.1$ - $K_v3.4$ )**

Quatro genes do tipo *KCNC* codificam para os subtipos  $K_v3.1$ - $K_v3.4$ . As propriedades eletrofisiológicas desses canais sugerem um papel específico na

repolarização da membrana (Kanemasa et al., 1995; Weiser et al., 1994). As correntes do canal  $K_v3$  não são afetadas por toxinas de escorpião nem toxinas de serpente que bloqueiam outros  $K_v$  (Coetzee et al., 1999; Rudy et al., 1999) mas tem sido reportado que peptídeos presentes na peçonha de anêmona *Anemonia sulcata* bloqueiam os subtipos  $K_v3.2$  e  $K_v3.4$  (Diochot et al., 1998; Mouhat et al., 2008). Estes canais estão distribuídos assim: Músculo esquelético ( $K_v3.1$  e  $K_v3.4$ ), pâncreas ( $K_v3.2$  e  $K_v3.4$ ), fígado ( $K_v3.3$ ), baço e linfócitos ( $K_v3.1$ ) (Mouhat et al., 2008).

#### **4.3.4. Canal de $K^+$ do tipo *Shal* ( $K_v4.1$ - $K_v4.3$ )**

Os subtipos de canal  $K_v4.1$ - $K_v4.3$  que fazem parte desta subfamília são codificados por 3 genes do tipo *KCND*, distribuídos principalmente no cérebro, coração, músculo liso, neurônios e apresentam um mecanismo de inativação rápida (Isbrandt et al., 2000; Mouhat et al., 2008). Os três subtipos são bloqueados por toxinas isoladas de escorpiões e aranhas; como por exemplo, a toxina AmmTX3 isolada da peçonha do escorpião *Androctonus mauretanicus* bloqueia com alta afinidade os subtipos  $K_v4.2$  e  $K_v4.3$  (Maffie et al., 2013) enquanto que as toxinas das aranhas interagem com o sensor da voltagem do  $K_v4$  (Swartz, 2007; Wang et al., 2004). As correntes caracterizam esses subtipos de canais são bloqueadas especificamente por pequenas toxinas de escorpião da subfamília das  $\alpha$ -KTx15, uma interação diferente quando comparada com a interação das toxinas de aranha conhecidas como moduladoras (Bougis and Martin-Eauclaire, 2015).

#### **4.3.5. Canal de $K^+$ do tipo $K_v7$ ( $K_v7.1$ - $K_v7.5$ )**

O canal de  $K^+$  desse tipo é codificado por cinco genes do tipo *KCNQ* dando origem aos subtipos  $K_v7.1$ - $K_v7.5$  e cada um deles desenvolve papéis fisiopatológicos diferentes, em vários tipos de células (Soldovieri et al., 2011). Estes subtipos de canal encontram-se distribuídos assim:  $K_v7.1$  (coração, pâncreas, orelhas, rim, pulmão, cólon e placenta),  $K_v7.2$  (gânglio nervo simpático e cérebro),  $K_v7.3$  (cérebro, retina, cólon, olhos),  $K_v7.4$  (orelha) e  $K_v7.5$  (cérebro, músculo esquelético e nervo simpático) (Howard et al., 2007). A estrutura deste tipo de canal caracteriza-se por ter um domínio

C-terminal longo (300-500 resíduos de aminoácidos) com quatro  $\alpha$ -hélices, sendo que as duas hélices próximas facilitam a oligomerização (Howard et al., 2007). Recentemente, foi identificado o primeiro peptídeo ativador do subtipo  $K_v7.4$  isolado da peçonha do escorpião *Androctonus australis* nomeado AaTXKb(2-64) quem aumenta as correntes máximas do canal a 50  $\mu\text{g/mL}$  da toxina; AaTXKb(2–64) também ativa os canais  $K_v7.3$   $K_v7.2$  e  $K_v7.5$  (Landoulsi et al., 2013).

#### 4.3.6. Canal de $K^+$ do tipo EAG

O canal EAG está formado por representantes de três subfamílias que são:  $K_v10$ , também conhecido como “*Ether-a-gogo*”, que incluem os subtipos  $K_v10.1$  e  $K_v10.2$ ;  $K_v11$  também conhecido como “*Eag-related gene*” com os subtipos  $K_v11.1$ - $K_v11.3$  e “*Eag-like*” com os subtipos  $K_v12.1$ - $K_v12.3$  (Engeland et al., 1998; Ludwig et al., 1994; Saganich et al., 1999; Sanguinetti et al., 1995; Shi et al., 1998; Shi et al., 1997). A estrutura deste tipo de canal é caracterizada por um domínio PAS (per-Ant-Sim) no N-terminal e um domínio cNBHD (*cyclic nucleotide binding*) no C-terminal; onde resíduos de aminoácidos conservados presentes nos dois domínios são importantes para determinar a cinética de ativação do canal, uma vez que acontece a mutação de algum desses resíduos, a oligomerização desses domínios não acontece (Stevens et al., 2009).

Estes canais são encontrados no sistema nervoso central e são pouco estudados, exceto o canal  $K_v11.1$ , melhor conhecido como canal ERG1. O subtipo  $K_v10.1$  (EAG1) tem despertado interesse devido à sua relação com condições patológicas de proliferação anormal das células que levam ao desenvolvimento de processos ontogênicos (Pardo et al., 1999; Pardo and Stühmer, 2008; Rodríguez-Rasgado et al., 2012), o que pode sugerir que o canal  $K_v10.1$  possa ser um alvo molecular terapêutico (Huang and Jan, 2014; Ludwig et al., 2000; Martin et al., 2008; Ouadid-Ahidouch et al., 2016; Pardo et al., 2012). Peptídeos inibidores para os subtipos  $K_v10.1$  e  $K_v11.1$  foram descritos em escorpiões, aranhas e anêmonas (Jiménez-Vargas et al., 2012).

#### 4.4. Canal do tipo Kligand (Canal de K<sup>+</sup> ativado por ligantes)

Este tipo de canal possui 2 ou 6 segmentos transmembrânicos e um domínio citosólico (usualmente o C-terminal), que atua como domínio receptor para permitir a ligação de diferentes mensageiros como cAMP (Clayton et al., 2008), íon cálcio (Jiang et al., 2002; Yuan et al., 2010) e NADP (Albright et al., 2006; Roosild et al., 2002). Dependendo do mensageiro que se ligue ao canal, eles podem ter propriedades e características estruturais diferentes, mas o mecanismo de *gating* é similar entre todos eles.

#### 4.5. Canais de K<sup>+</sup> ativados por Cálcio

Os canais de potássio ativados por cálcio são ativados por voltagem e pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Estes canais podem ser divididos em três grupos: os canais do tipo BK<sub>Ca</sub>, de elevada condutância; IK<sub>Ca</sub>, canais com condutância intermédia, e SK<sub>Ca</sub>, canais de baixa condutância. Os canais IK<sub>Ca</sub> e os SK<sub>Ca</sub> são sensíveis à voltagem e são ativados a baixas concentrações de cálcio intracelular (<1µM) e desempenham um papel importante nos processos dependentes da sinalização do cálcio nas células excitáveis e não excitáveis (Wei et al., 2005).

A família do tipo IK<sub>Ca</sub> e SK<sub>Ca</sub> estão formados por subunidades que contêm 6 segmentos TM (S1-S6) com uma região formadora de poro (P) localizada entre os segmentos S5 e S6. No canal IK<sub>Ca</sub>, o segmento S4 é quase insensível às mudanças do potencial de membrana. Estes tipos de canais são caracterizados por serem codificados por 4 genes e serem ativados pelo íon cálcio via calmodulina (Kohler et al., 1996; Wei et al., 2005) (Figura 9D).

Os representantes da família BK<sub>Ca</sub> são codificados por 4 genes do tipo *Slo* em humanos. Os membros desta subfamília caracterizam-se por serem ativados tanto pelas mudanças do potencial de membrana quanto pela presença dos íons Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> dependendo da isoforma do canal (Salkoff et al., 2006) (Figura 9E). Os canais BK<sub>Ca</sub> apresentam 11 segmentos transmembranares (S0-S10), onde os segmentos (S0-S6) constituem a parte central do canal e os segmentos S7-S10 são os responsáveis pela sensibilidade do canal ao íon Ca<sup>2+</sup>. Destaca-se que o segmento S0

interage com a subunidade  $\beta$ , responsável pela cinética de abertura e fechamento do canal. Esta subunidade  $\beta$  está formada por dois domínios transmembrânicos com uma grande alça extracelular, e as porções  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  terminais estão localizadas no citoplasma (Berkefeld et al., 2006; Ghatta et al., 2006; Wang and Sigworth, 2009).

## 5. Propriedades eletrofisiológicas dos $K_v$

Os canais de potássio dependentes de voltagem possuem propriedades eletrofisiológicas heterogêneas relacionadas com os diferentes tipos de corrente, com o grau de sensibilidade aos compostos farmacológicos, com as variações na voltagem, entre outros. Primeiramente, a corrente do tipo A caracteriza-se por ser uma corrente transitória com baixo limiar de ativação, que é evidente principalmente nos subtipos  $K_v1.4$ ,  $K_v3.3$ ,  $K_v3.4$  e  $K_v4$ , além de se caracterizarem por apresentarem uma inativação rápida e serem extremamente sensíveis ao composto 4-AP (4-aminopiridina) (Mouhat et al., 2008). No entanto, os canais  $K_v1$  similares aos subtipos  $K_v2$ ,  $K_v3.1$ ,  $K_v3.2$ ,  $K_v7.1$  até  $K_v7.5$  caracterizam-se por apresentarem uma inativação lenta (Gutman et al., 2005; Mouhat et al., 2008).

A corrente do tipo M está relacionada principalmente aos canais  $K_v7.2$ ,  $K_v7.3$  e  $K_v7.5$  que é ativada a baixas despolarizações (variações da voltagem próximas ao potencial de ação). Suas propriedades de inativação não estão muito bem elucidadas, exceto para o subtipos  $K_v7.2$  (Gutman et al., 2005; Mouhat et al., 2008). Os membros da família *Eag* ( $K_v10$  e  $K_v12.1$ ) caracterizam-se por serem ativados lentamente e sua inativação acontecer durante a repolarização, enquanto que nos subtipos  $K_v12.2$  e  $K_v12.3$  a inativação é independente da voltagem e as correntes retificadoras do influxo ocorrem a valores de voltagem próximas ou inferiores ao potencial de repouso (Gutman et al., 2005; Mouhat et al., 2008).

Diferentes membros das famílias  $K_v5$ ,  $K_v6$ ,  $K_v8$  e  $K_v9$  não são canais propriamente ditos. Estes subtipos têm sido nomeados como subunidades modificadoras que são responsáveis por aumentar a diversidade funcional de outros tipos de canais; como por exemplo, os subtipos  $K_v5.1$ ,  $K_v6.1$  e  $K_v6.2$  podem regular a

atividade do canal  $K_v2.1$  ou  $K_v9.1$  até  $K_v9.3$  que modulam a atividade dos canais do tipo *Shab* (Gutman et al., 2005; Kramer et al., 1998; Zhu et al., 1999).

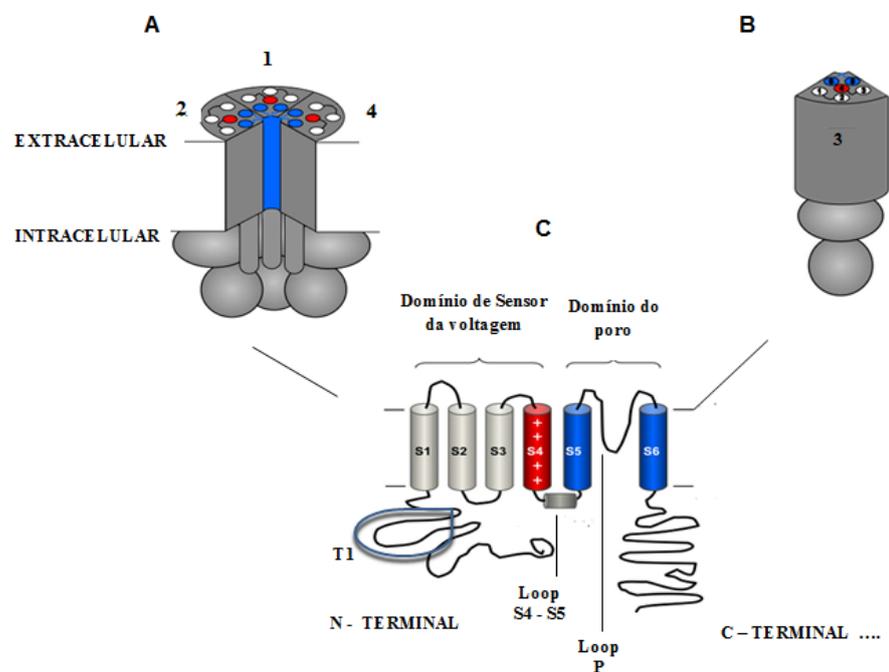
## 6. Mecanismo de ação do canal de $K^+$

O canal de potássio é fundamental na repolarização da membrana, após a despolarização mediada pelo íon sódio (algumas vezes pelo íon cálcio) quando acontece o potencial de ação; e para se obter o balanço iônico, a seletividade do canal tem que ser extremamente alta com um fluxo iônico abundante. Esse fluxo iônico é controlado pelo “*gating*” do canal (abertura e fechamento); uma vez que o canal esteja aberto, a passagem dos íons de  $K^+$  ocorre através do filtro de seletividade, e quando o canal fechar, esse fluxo é interrompido e controlado. A abertura e fechamento do canal de  $K^+$  dependente de voltagem ( $K_v$ ) são gerados como resposta às mudanças na voltagem da membrana.

O  $K_v$  é um tetrâmero que está composto por seis segmentos transmembrânicos, os 4 primeiros segmentos (S1-S4) correspondem ao módulo da detecção da voltagem que é fundamental para gerar a resposta frente às mudanças do potencial de membrana. Esse processo envolve a transformação da energia do campo elétrico acumulado na membrana em energia mecânica que é transferida para o domínio do poro (S4) e induz as alterações conformacionais necessárias que levam à abertura do canal (Jiang et al., 2003; Long et al., 2005; Long et al., 2007). O segmento S4 é o sensor da voltagem (Cha et al., 1999; Glauner et al., 1999), e os dois últimos segmentos (S5-S6) formam o domínio do poro (Figura 11).

O S4 percebe a alteração do potencial de membrana, o que leva a uma mudança conformacional que por sua vez está acoplada ao portão (*gate*) do domínio formador do poro (Miller, 2000; Panyi et al., 2006). Os resíduos de aminoácidos positivos e básicos do sensor de voltagem (S4) estão em contato por ligações salinas com as cabeças dos fosfolipídios da bicamada celular e com os resíduos de aminoácidos presentes nos segmentos S1 e S3. Uma vez que o segmento S4 entra em contato com as cabeças dos fosfolipídios detecta as variações da voltagem na membrana, fazendo com que as cadeias laterais iniciem um deslocamento sobre os

resíduos fixos presentes nos segmentos S1 e S3, levando consigo mudanças conformacionais (Treptow et al., 2009). É importante destacar que o processo de ativação do canal que leva à abertura do poro só acontece quando todos os quatro sensores da voltagem são ativados (Zagotta et al., 1994), permitindo o fluxo dos íons até a fase de inativação acontecer. A estrutura e o mecanismo de ação do poro desse canal é parecido com o funcionamento dos canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . O canal de  $\text{K}^+$  no seu estado aberto pode permitir o fluxo de  $10^6$  a  $10^8$  íons de  $\text{K}^+$  por segundo (Grissmer et al., 1994; Hess and Tsien, 1984).

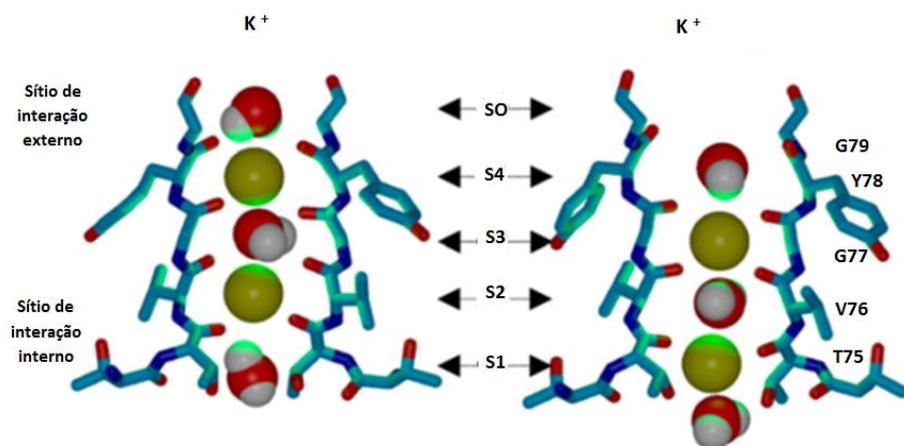


**Figura 11.** Representação esquemática da organização dos canais  $\text{K}_v$ . A. Estrutura do canal na sua conformação aberta. B. Estrutura do canal na sua conformação fechada. C. Representação de uma das  $\alpha$  subunidades do canal. Modificado de (Barros et al., 2012).

O sítio ativo do canal de  $\text{K}^+$  é o domínio do poro que resulta da interação de quatro subunidades  $\alpha$  diferentes, onde cada uma delas contribui em uma região específica para a formação do poro, o domínio sensor da voltagem e os quatro domínios citoplasmáticos. Além disso, esse sítio ativo está formado por quatro resíduos de aminoácidos conservados ( $\text{T}_{75}\text{V}_{76}\text{G}_{77}\text{Y}_{78}\text{G}_{79}$ ) que constituem o filtro seletivo do canal (*Loop P*) (Berneche and Roux, 2000; Heginbotham et al., 1994; Zhou

and MacKinnon, 2003), permitindo de maneira altamente específica a passagem dos íons de  $K^+$  (Sansom et al., 2002) (Figura 11).

Quando os íons de  $K^+$  são transportados no filtro de seletividade, passam por quatro seções uniformemente distribuídas formadas pelos átomos de oxigênio providos pelos grupos carbonilas da cadeia principal dos segmentos S5 e S6; nessas seções os íons se ligam em um estado desidratado essencialmente, rodeado por oito átomos de oxigênio da proteína, quatro acima e quatro embaixo de cada íon (Figura 12). A distribuição dos átomos de oxigênio no filtro de seletividade é muito semelhante à distribuição das moléculas de água em torno ao íon hidratado observado na cavidade central (Liu et al., 2012; Lockless et al., 2007; MacKinnon, 2003; Noskov and Roux, 2006; Thompson et al., 2009). Os oxigênios presentes nos grupos carbonila dos resíduos de aminoácidos Y78, G77, V76 e T75 das quatro subunidades formam entre si sítios de ligação para o íon  $K^+$  (S1-S4); portanto, cada íon está rodeado por 8 átomos de oxigênio simulando a hidratação do íon em solução (Figura 12). Essas seções têm um tamanho de aproximadamente 3 Å, constituindo a parte mais estreita do poro (Hille, 1973).



**Figura 12.** Representação do filtro de seletividade de KcsA, apresentando os sítios de interação do íon ao longo do filtro (S1, S2, S3, S4, S0) e a sequência de resíduos de aminoácidos que são responsáveis pela seletividade do poro (G79, Y78, G77, V76, T75). Modificado de (Treptow and Tarek, 2006).

No interior do poro, o íon de  $K^+$  tem o sítio de interação S1 formado pelos oxigênios das carbonilas e as hidroxilas do resíduo de aminoácido T75; enquanto na parte externa do poro, o íon tem o último sítio de interação que é o sítio S4 formado pelo grupo carbonila dos resíduos de aminoácidos Y78 e G77. Tem se descrito a

existência do sítio de ligação S0 formado pelos oxigênios da carbonila do resíduo de aminoácido Y78 e quatro moléculas de água, sendo o S0 o sítio de ligação do íon na superfície do poro do canal (Figura 12) (Cheng et al., 2011; Thompson et al., 2009). Sob concentrações fisiológicas, aproximadamente dois íons de  $K^+$  ocupam o filtro de seletividade (Zhou and MacKinnon, 2003). Finalmente, na região final ao interior do poro está presente uma estrutura nomeada T1 (Figura 11) que está ligada a uma proteína globular (no domínio citoplasmático), que é responsável pelo fechamento do poro; impedindo assim, o fluxo do íon e levando ao processo de inativação do canal, que também é regulada pela voltagem (Barros et al., 2012; Choe, 2002). O canal de  $K^+$  apresenta três estados conformacionais: Estado de repouso, ativado e inativado (inativação do tipo C e N) e todo esse processo é regulado pelo *Gating* (Jiang et al., 2003).

## 7. Interação das KTx com o canal de $K^+$

Acredita-se que a interação das toxinas escorpiônicas com os  $K_v$  dependem principalmente da presença de vários resíduos de aminoácidos localizados na folha  $\beta$  da toxina (Ménez, 1998; Miller, 1995). As toxinas que interagem com os canais de  $K^+$  podem ser bloqueadoras ou moduladoras, destacando-se que as toxinas isoladas da peçonha dos escorpiões são bloqueadoras. Sabe-se que as KTx afetam principalmente os  $K_v$  e, em grau menor, os canais  $BK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$ . Uma vez que a maioria dos peptídeos que apresentam o dobramento do tipo CS  $\alpha/\beta$  interagem com os  $K_v$ , foi estabelecido um modelo de interação baseado nesse tipo de toxinas (Catterall et al., 2007; Jiménez-Vargas et al., 2012; Swartz, 2004).

Existem toxinas que interagem com as  $\alpha$ -hélices do canal na região do torreão, localizada no *loop* extracelular entre o segmento S5 e o filtro de seletividade; sítio de interação descrito para toxinas isoladas de escorpião e anêmonas (Frénal et al., 2004; Xu et al., 2003). Como por exemplo, toxinas que interagem com o canal  $K_v11.1$  (Korolkova et al., 2004) que possui dois domínios de interação com o alvo: um resíduo de aminoácido hidrofóbico que interage com a região do torreão constituído principalmente por uma hélice anfipática, como também um domínio hidrofílico no contato com a parte inferior do vestíbulo exterior. A região hidrofóbica formada pelos resíduos de aminoácidos Y14, Y16 e F36 fornecem uma região de interação

fortemente hidrofóbica enquanto os resíduos de aminoácidos D3 e K25 fornecem a região principalmente hidrofílica (Xu et al., 2003). Este modelo de interação é conhecido como modelo de duas cabeças onde as toxinas como BeKm-1 (Zhang et al., 2003) e CnERG1 (Pardo-Lopez et al., 2002) fazem esse tipo de interação com o canal e são conhecidas como bloqueadores do tipo *turret* (Figura 13 A).

O modelo nomeado “anel de resíduos básicos” é representado por quatro resíduos de aminoácidos lisina ou arginina que estão presentes na maioria das toxinas bloqueadoras de canal de K<sup>+</sup>, onde os resíduos de aminoácidos carregados positivamente formam ligações salinas com os resíduos de aminoácidos carregados negativamente, presentes na subunidade  $\alpha$  do canal (M'barek et al., 2003; Mouhat et al., 2004)(Figura 14B). Estudos de modelagem molecular da interação da toxina Pi4 com o canal K<sub>v</sub>1.2 forneceram informações adicionais do processo de reconhecimento e interação do canal com toxina; sendo evidente que o anel composto por 4 resíduos de aminoácidos básicos (Arg10, Arg19, Lys30 e Lys33) é fundamental para conhecer que existem mais pontos de interação da Pi4 e o canal além da díade funcional (M'barek et al., 2003). Toxinas como Pi1 (Fajloun et al., 2000) Pi2 (Gómez-Lagunas et al., 1996; Rogowski et al., 1996); e TsTX $\alpha$  (Ellis et al., 2001; Rogowski et al., 1994) possuem esse modelo de interação (anel) com o canal K<sub>v</sub>1.2 (M'barek et al., 2003).

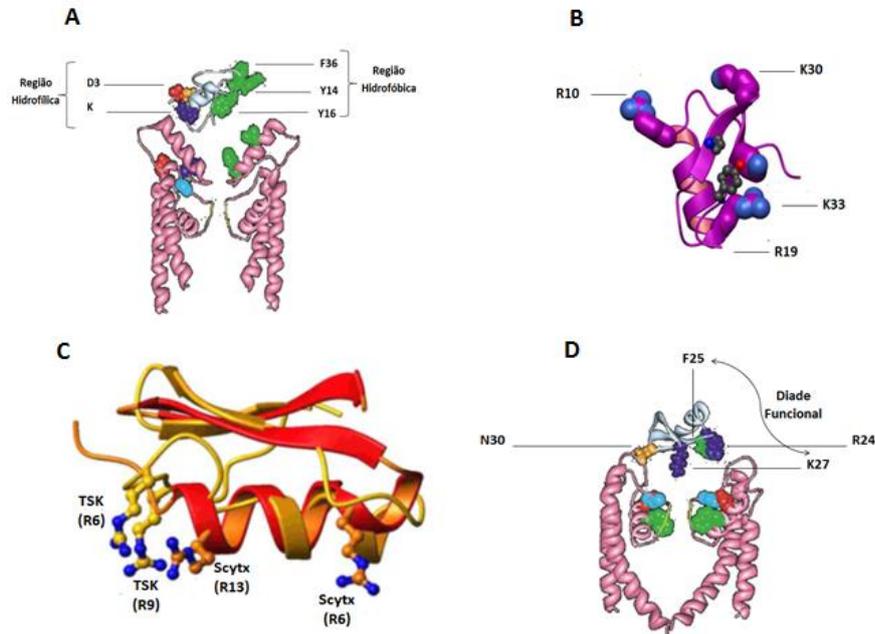
Estudos realizados com o segmento sintético da toxina Noxiustoxin sugeriram que não só a díade funcional seja importante para bloquear o canal K<sub>v</sub>1 (Martínez et al., 1998). Além disso, foi evidente que as toxinas podem interagir com o canal por meio da interação da  $\alpha$ -hélice, e não somente da folha  $\beta$  como já foi descrito. O segmento sintético da Noxiustoxin corresponde a estrutura da  $\alpha$  hélice (Frau et al., 2001) e tem a capacidade de bloquear as correntes do K<sub>v</sub> nas células granulares do cérebro. Estudos com as toxinas BeKm-1 (Korolkova et al., 2002), BmP05 (Wu et al., 2002), Pi1(Mouhat et al., 2004), PBTx1 (Huys et al., 2004) e BmTx3A (Isabelle et al., 2004) demonstraram o mesmo tipo de interação, onde a presença de resíduos básicos na  $\alpha$ -hélice da toxina interagem com o poro do canal, conhecido como modelo *apamina-like* (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004) (Figura 13C).

O tipo de interação de maior frequência encontrado entre os ligantes e o canal de  $K^+$  é aquele que envolve oclusão do poro do canal na presença da toxina; no caso das toxinas de escorpiões, basicamente a folha  $\beta$  da estrutura da toxina entra em contato com o poro do canal  $K_v$  (Jouirou et al., 2004). Tem sido descrito que essa atividade bloqueadora é dependente da “díade funcional” que é uma chave molecular importante para interagir com o canal  $K_v1$  (Dauplais et al., 1997); Espera-se que a cadeia lateral do resíduo básico (Lisina) da díade se posicione no poro do canal iônico, o que gera a sua oclusão. Atualmente, à díade funcional tem se atribuído a capacidade de bloquear o canal com alta afinidade.

Uma ampla variedade de KTxS possuem na sua estrutura a díade funcional (Dauplais et al., 1997) formada principalmente por dois resíduos de aminoácidos altamente conservados, o primeiro deles é a lisina e o segundo pode ser tirosina, fenilalanina (Dauplais et al., 1997; Shakkottai et al., 2001) ou leucina (Gasparini et al., 1998) separados por uma distância de 6-7 Å. O resíduo aromático ou alifático da díade funcional pode interagir com a tirosina ou com o triptofano de uma das subunidades  $\alpha$  via forças hidrofóbicas (Jouirou et al., 2004; M'barek et al., 2003; Mouhat et al., 2004). A importância da díade funcional no bloqueio do canal tem sido evidente quando realizadas substituições da lisina por outro resíduo de aminoácido, a toxina diminui sua afinidade consideravelmente (Banerjee et al., 2013; Carlier et al., 2000).

A díade funcional encontrada nas toxinas isoladas de animais peçonhentos, tem se estabelecido como uma característica molecular importante para garantir a interação das toxinas com o canal de  $K^+$  dependente de voltagem do tipo  $K_v1$ , principalmente (Dauplais et al., 1997; Gasparini et al., 1998; Gilquin et al., 2002; Ménez, 1998; Savarin et al., 1998), bloqueando o poro do canal e, em decorrência, o bloqueio total da corrente. No entanto, toxinas que não possuem essa díade podem ter afinidade para bloquear o fluxo dos íons de  $K^+$  quase em 100% (Batista et al., 2002; Huys et al., 2004; Huys and Tytgat, 2003) sugerindo que a falta da díade funcional pode ser crítica no reconhecimento do canal, mas não é tão crítica para o bloqueio da corrente. Finalmente, todas essas contribuições quanto às características da estrutura primária e o tipo de dobramento na estrutura terciária são chaves determinantes para

estabelecer o grau de reconhecimento, e a interação da toxina com os diferentes subtipos de canais.



**Figura 13.** Modelos de interação toxina-canal iônico para potássio e distribuição de aminoácidos chaves na toxina. A. Modelo da interação do tipo “Turret” da toxina ErgTx1 com o canal HERG. B. Resíduos de aminoácidos chaves para a interação do tipo “Anel de resíduos básicos” da toxina Pi4. C. Modelo *apamin-like* de duas toxinas, a Tsk e a Scytx com resíduos básicos situados na  $\alpha$ -hélice. D. Modelo da “Díade funcional” da toxina AgTx2 com o canal do tipo Shaker (Bloqueador do poro). Modificado de (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Xu et al., 2003).

## 8. Canal de Cálcio

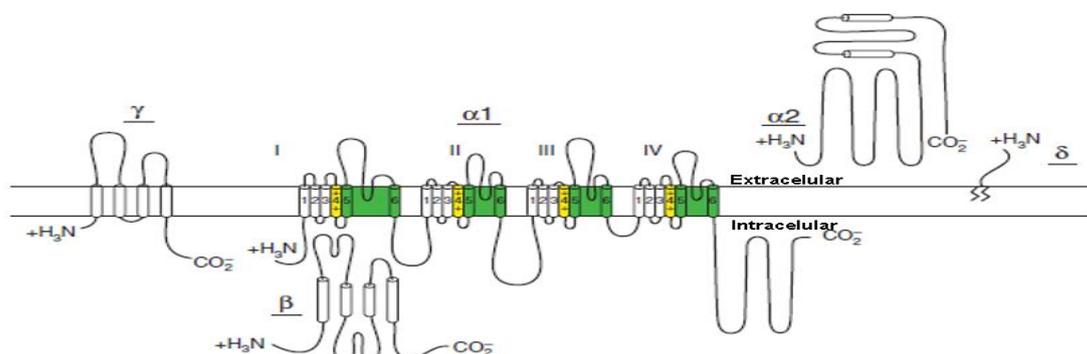
Canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) são proteínas com múltiplas subunidades encontradas nas membranas plasmáticas das células excitáveis, incluindo neurônios, miócitos (cardíaco, esquelético e músculo liso) e nas células  $\alpha$  e  $\beta$  do pâncreas (Hille, 2001). Eles são os alvos farmacológicos para o tratamento de um amplo espectro de patologias como hipertensão, arritmia cardíaca, epilepsia, perturbações do sono, dor crônica, doenças neurodegenerativas e diabetes (Norton and McDonough, 2008).

Os CCVDs são ativados após despolarização da membrana e controlam o influxo do íon em resposta a potenciais de ação. Dessa forma, o íon  $\text{Ca}^{+2}$  é usado como segundo mensageiro na sinalização elétrica desencadeando diversas funções

intracelulares como secreção de hormônios (Catterall et al., 2013), acoplamento de excitação-transcrição (Wheeler et al., 2012), acoplamento excitação-contração (Bannister and Beam, 2013).

Os CCVDs são complexos proteicos formados pela subunidade formadora de poro  $\alpha 1$  organizada em 4 domínios homólogos (I-IV) cada um deles com 6 segmentos transmembrânicos (S1-S6), onde o segmento S4 é responsável pelo sensor de voltagem. O *loop* formado entre os segmentos S5 e S6 em cada domínio contém um par de resíduos de glutamato que determina a condutância e a seletividade do canal para o íon cálcio (Catterall, 2000)(Figura 14).

O canal de cálcio caracteriza-se por ter múltiplas subunidades auxiliares na sua estrutura: a subunidade  $\beta$  (Ruth et al., 1989), a subunidade  $\gamma$  com 4 segmentos transmembrânicos que induzem pequenos mas significativos efeitos no *gating* do canal (Jay et al., 1990), a subunidade  $\alpha 2$  que contém vários sítios de glicosilação e várias sequências hidrofóbicas (Ellis et al., 1988); porém, alguns estudos indicam que é uma proteína de membrana extrínseca extracelular ligada à membrana por meio de ligações dissulfeto com a subunidade  $\alpha 2\delta$  (Gurnett et al., 1996). A subunidade  $\alpha 2\delta$  é codificada pelo mesmo gene que codifica a subunidade  $\alpha 2$ , e tem sido descrito que a presença dessa subunidade induz pequenos efeitos na expressão e no *gating* do canal (De Jongh et al., 1990; Jay et al., 1991).



**Figura 14.** Representação esquemática do canal de cálcio dependente de voltagem com cada uma das suas subunidades Modificado de (Catterall, 2011).

Sabe-se que as subunidades auxiliares modulam as propriedades do canal; porém, as características eletrofisiológicas e farmacológicas no canal de cálcio dependem principalmente da existência de múltiplas subunidades  $\alpha 1$  (Hofmann et al., 1994) que é o principal sitio de regulação por segundos mensageiros, fármacos e toxinas (Catterall, 2000).

Segundo o perfil eletrofisiológico e farmacológico têm sido identificados diferentes tipos de correntes de cálcio, originando a seguinte classificação e nomenclatura: a subfamília  $Cav_1$  ( $Cav_{1.1}$ - $Cav_{1.4}$ ) que inclui as correntes do tipo L (Hui et al., 1991; Snutch et al., 1991; Strom et al., 1998; Williams et al., 1992b); a subfamília  $Cav_2$  ( $Cav_{2.1}$ - $Cav_{2.3}$ ) que inclui as correntes dos tipos P/Q (Bourinet et al., 1999; Sather et al., 1993; Stea et al., 1994), N (Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992a) e R (Randall and Tsien, 1995; Soong et al., 1993; Zhang et al., 1993); a subfamília  $Cav_3$  ( $Cav_{3.1}$ - $Cav_{3.3}$ ) que inclui as correntes do tipo T (Perez-Reyes et al., 1998). No geral, os  $Cav$  são regulados por diferentes mecanismos como fosforilação de proteínas, interações com proteína G, interações com proteínas efetoras e pelo íon cálcio (informação adicional ver (Catterall, 2000).

### **8.1. $Cav_1$**

A subfamília  $Cav_1$  caracteriza-se por ter correntes do tipo L, devido às suas correntes de entrada de longa duração durante a despolarização, alta voltagem de ativação, alta condutância, inativação lenta dependente da voltagem (Reuter, 1983; Zamponi et al., 2015). Esse tipo de canal encontra-se principalmente no músculo esquelético, o que permitiu a purificação e caracterização bioquímica de suas subunidades e, a clonagem de subunidade  $\alpha 1$  formadora de poros (Zamponi et al., 2015).

Essa subfamília apresenta 4 isoformas:  $Cav_{1.1}$  presente no músculo esquelético e que pode interagir fisicamente com os canais sensíveis à Ryanodina (RyR1) no retículo sarcoplasmático levando a uma rápida liberação de cálcio (Tanabe et al., 1987).  $Cav_{1.2}$  e  $Cav_{1.3}$  presentes no coração, cérebro e células endócrinas, e que apresentam sensibilidade diferente aos antagonistas (Zamponi et al., 2015). Esses tipos de canais têm uma maior importância nas células pancreáticas, onde têm

sido melhor caracterizados, encontrando-se que o canal Cav1.2 nas células  $\beta$  pancreáticas de camundongos são responsáveis pela fase rápida da liberação de insulina (Barg et al., 2001; Schulla et al., 2003; Sinnegger-Brauns et al., 2004), e a sua deleção leva a irregularidades na liberação do hormônio e, uma intolerância na absorção da glicose (Schulla et al., 2003) enquanto que a presença do canal Cav1.3 não tem sido associada ao processo de secreção da insulina nos camundongos (Barg et al., 2001; Sinnegger-Brauns et al., 2004) mas, é necessário nos processos de proliferação das células  $\beta$  pancreáticas (Namkung et al., 2001).

No entanto, a presença do canal Cav1.3 nas células  $\beta$  pancreáticas no humano é mais predominante (Rorsman and Braun, 2013). Finalmente, o canal Cav1.4 está presente na retina e a expressão heteróloga desse canal permitiu identificar que as correntes mostram uma rápida ativação, inativação é lenta e, a abertura do canal se dá a potenciais de membrana mais negativos quando comparado com o canal Cav1.2 (Koschak et al., 2014).

Farmacologicamente, os Cav1 são o alvo molecular de vários bloqueadores que têm sido amplamente utilizado nas doenças cardiovasculares, sendo as 1,4-dihidropiridinas (DHPs) os mais utilizados e com maior afinidade para a o estado inativado do canal (Bean et al., 1986; Berjukow and Hering, 2001; Hamilton et al., 1987; Koschak et al., 2001); enquanto que compostos como fenilalquilaminas e benzotiazepinas têm uma maior afinidade pelo estado aberto bloqueando o poro (Shabbir et al., 2011).

Tem-se encontrado peptídeos bloqueadores de origem animal de alta afinidade para esses tipos de canais; como por exemplo, os peptídeos Calciseptine e FS2 isolados da peçonha da serpente *Dendroaspis polylepis* (de Weille et al., 1991; Watanabe et al., 1995), Glacontryphan-M isolado do veneno do *Conus* marinho *Conus marmoreus* (Hansson et al., 2004), CSTX-1 isolado da peçonha da aranha *Cupiennius salei* (Kubista et al., 2007) e Calcicludine isolado da peçonha *Dendroaspis angusticeps* (Schweitz et al., 1994).

## 8.2. Cav2

Os canais de cálcio do tipo Cav2 são codificados por três genes (CACNA1A, CACNA1B e CACNA1E) que codificam para os subtipos Cav2.1, Cav2.2 e Cav2.3, respectivamente (Dubel et al., 1992; Mori et al., 1991; Williams et al., 1992a). A subfamília do canal Cav2 caracteriza-se por apresentar diferentes tipos de correntes (P/Q, N e R) com propriedades biofísicas e farmacológicas específicas, em decorrência ao *splicing* alternativo presente nesses tipos de canais (Zamponi et al., 2015). No geral, este tipo de canais caracteriza-se por ter uma inativação a voltagens mais negativos e é mais rápida do que nas correntes do tipo L, porém mais positivas e lentas do que as correntes do tipo T (Nowycky et al., 1985). As três isoformas do canal Cav2 estão envolvidas não apenas na liberação rápida de neurotransmissores, mas também na liberação de hormônios pelas células secretoras (Albillos et al., 2000; Álvarez et al., 2013; Santana et al., 1999; Wykes et al., 2007). Ressaltando que a fase tardia na liberação de insulina nas células  $\beta$  pancreáticas é mais dependente do canal Cav2.3 nos camundongos (Jing et al., 2005).

Tem se descrito que as isoformas Cav2.1 e Cav2.2 interagem com os KCa de grande condutância e assim fornecer o influxo de cálcio necessário para sua ativação (Berkefeld and Fakler, 2008; Berkefeld et al., 2006); com isso, permite-se que os canais Cav2 regulem a excitabilidade alterando as condutâncias de potássio (Loane et al., 2007). Desde o ponto de vista farmacológico, o canal Cav2.1 primeiramente descrito nas células de Purkinge é bloqueado especificamente pelo peptídeo w-agatoxin IVA isolado da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta* (Adams et al., 1993; Olivera et al., 1994). O canal Cav2.2 (corrente tipo N) é bloqueado especificamente pelo peptídeo w-conotoxin GVIA isolado do caracol *Conus geographus* (Olivera et al., 1984). Desta forma, as toxinas w-conotoxina GVIA e a w-agatoxina IVA têm sido utilizadas como ferramentas experimentais para diferenciar as correntes do tipo N e P/Q; além disso, essas duas toxinas explicam os dois principais mecanismos de ação: w-conotoxina GVIA como bloqueador do poro (Ellinor et al., 1994; Feng et al., 2001; Reynolds et al., 1986) e w-conotoxina IVA que modifica o *gating* do canal, já que esse peptídeo principalmente bloqueia o movimento do sensor da voltagem do que ocluir o poro (Mintz et al., 1992).

O canal Cav2.3 é bloqueado, sem especificidade, pelo peptídeo sintético SNX-482 isolado da peçonha da aranha *Hysteroocrates gigas* (Newcomb et al., 1998) devido que essa toxina também tem como alvo molecular os canais Cav1.2 (Bourinet et al., 2001) e canais de potássio com correntes do tipo A (Kimm and Bean, 2014). Estas toxinas peptídicas são potentes bloqueadores da transmissão sináptica (Catterall, 2000); portanto, esses bloqueadores poderiam ser potencialmente utilizados em distúrbios convulsivos (Dibué et al., 2013) e na terapia da dor (Matthews et al., 2007). No entanto, para esse tipo de canais não foram descritos bloqueadores específicos (Schneider et al., 2013).

### 8.3. Cav3

O canal Cav3 ou também conhecido como canais do tipo T são codificados por 3 genes (CACNA1G, CACNA1H e CACNA1I) dando origem a 3 subunidades Cav3.1 (Perez-Reyes et al., 1998), Cav3.2 (Cribbs et al., 1998) e Cav3.3 (Lee et al., 1999) que, por sua vez, apresentam *splicing* alternativo, incrementando assim sua diversidade funcional (Swayne and Bourinet, 2008). As correntes no canal de cálcio do tipo Cav3 são ativadas a potenciais de membrana mais negativos, com inativação rápida, desativação lenta e pequena condutância (Carbone and Lux, 1984). Destaca-se que os Cav3 não precisam de subunidades auxiliares e são ideais para regular a excitabilidade neuronal (Zamponi et al., 2015).

Os canais do tipo T podem estar associados física e funcionalmente com membros do canal de potássio do tipo KCa (Anderson et al., 2013; Anderson et al., 2010; Engbers et al., 2012; Engbers et al., 2013; Rehak et al., 2013). Um exemplo dessa associação foi descrita na regulação dos disparos neuronais (Turner and Zamponi, 2014). Além da regulação da excitabilidade neuronal, os Cav3 têm sido associados com a secreção de hormônios, como liberação de catecolaminas das células cromafins (Carabelli et al., 2007) e mais recentemente, importante nas funções cardiovasculares e no sistema renina-angiotensina (Hansen, 2014).

Farmacologicamente, esses tipos de canais são insensíveis aos fármacos antagonistas que bloqueiam os Cav1 e aos peptídeos que bloqueiam o canal Cav2. O

peptídeo Kurtoxin isolado da peçonha do escorpião *Parabuthus transvaalicus* foi o primeiro descrito que inibe o canal Cav3.1 com alta afinidade (Chuang et al., 1998). No entanto, esse peptídeo interatua com outras isoformas de canal de cálcio, incluindo canais do tipo N e L (Sidach and Mintz, 2002) e canais de sódio (Zhu et al., 2009). Os peptídeos KLI e KLII presentes na peçonha do escorpião *P. transvaalicus* bloqueiam o canal de sódio e, com menor afinidade, também o subtipo Cav3.3 (Olamendi-Portugal et al., 2002).

Os peptídeos Protoxin I e II isolados da aranha *Thrixopelma pruriens*, descritos inicialmente como inibidores do canal de sódio (Schmalhofer et al., 2008), bloqueiam os canais Cav3 (Edgerton et al., 2010). Protoxin I bloqueia com afinidade maior o canal Cav3.1 que os canais Cav3.3 e Cav3.2 (Bladen et al., 2014; Ohkubo et al., 2010). Protoxin II tem maior afinidade pelo subtipo Cav3.2 e parece agir como modificador do *gating* do canal (Bladen et al., 2014; Edgerton et al., 2010). Uma descoberta interessante para esse tipo de canal foi o peptídeo PsPTx3 isolado da peçonha da aranha Theraphosidae quem aparentemente tem seletividade para o canal Cav3.2 (aplicação de patente FR2940973; França).

## II. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Para estudar um canal iônico é necessário o uso de metodologias que permitam medir, mesmo que indiretamente, a atividade do canal. O uso de técnicas eletrofisiológicas como *Patch-Clamp* facilita medir e avaliar essas atividades, permitindo identificar moduladores ou bloqueadores do canal, que alteram o fluxo normal do íon na célula. Tem-se descrito diferentes compostos que podem modular a atividade desses canais, o que tem contribuído para um conhecimento maior em relação à estrutura-função do próprio canal, destacando-se que as toxinas isoladas de animais peçonhentos principalmente de escorpiões. Por serem compostos altamente específicos com alvo molecular principalmente os canais iônicos, essas toxinas são ferramentas farmacológicas úteis nos estudos eletrofisiológicos (Rodriguez De La Vega et al., 2003).

As pesquisas realizadas com toxinas isoladas de escorpiões têm sido focadas em baixa porcentagem de compostos bioativos, levando em conta que existem mais de 1500 espécies de escorpiões conhecidas, sendo que os compostos mais estudados foram isolados de peçonhas de escorpiões da família Buthidae, devido à sua importância médica (Possani et al., 2000). Existem famílias de escorpiões que não são de interesse clínico; portanto, os estudos com essas peçonhas são poucos sendo que os alvos moleculares e o potencial farmacológico dessas toxinas são desconhecidos.

Com base na literatura, pode se perceber que a maioria das KTx descritas geram alterações eletrofisiológicas, atividades biológicas consideráveis a baixas concentrações (na ordem de pM), o que pode ser interpretado como uma especificidade da toxina por um subtipo de canal. OcyC9 faz parte da subfamília das conhecidas  $\kappa$ -KTx, cujas atividades biológicas têm sido avaliadas sobre diferentes subtipos de  $K_v$ , evidenciando que as alterações eletrofisiológicas geradas estão na ordem de  $\mu$ M, principalmente sobre os  $K_v$  do tipo *Shaw* (Camargos et al., 2011; Chagot et al., 2005; Nirthanan et al., 2005; Srinivasan Kellathur et al., 2002); sugerindo, assim, que a especificidade destas toxinas para um alvo molecular em particular não está definido ainda.

## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Caracterizar eletrofisiológica o peptídeo OcyC9, uma k-KTx originalmente descrita a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*, e seu análogo

#### 1.1. Objetivos específicos

- Identificar se o peptídeo OcyC9 está presente na peçonha bruta.
- Purificar o peptídeo OcyC9 mediante cromatografia líquida de alta eficiência RP-HPLC e espectrometria de massa MALDI-TOF.
- Desenhar o peptídeo análogo da OcyC9 e sintetiza-lo.
- Avaliar os peptídeos sintéticos OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 quanto à atividade nos canais de potássio do tipo  $K_v1.3$ ,  $K_v2.1$ , BK ( $K_{Ca1.1}$ ),  $K_{ATP}$  ( $K_{IR} 6.2/SUR 1$ ) e canais de cálcio do tipo  $Ca_v1.2$  e  $Ca_v1.3_s$  por meio de ensaios eletrofisiológicos em *patch-clamp*.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1. Animais**

Exemplares de *Opisthacanthus cayaporum* (machos e fêmeas) coletados em Palmas, Tocantins, sob licença do IBAMA nº 048/2007-CGFAU, foram mantidos em terrários apropriados no Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília, com água *ad libitum* e alimentados com baratas.

#### **2. Extração e Quantificação da peçonha**

A peçonha dos escorpiões adultos de *O. cayaporum* foi extraída por meio de estimulação elétrica próxima ao telson. A peçonha foi solubilizada em água ultrapura (Milliq) e centrifugada a 10.000 *g* por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado, seco a vácuo e armazenado a -20°C, até seu uso. A quantificação foi realizada por espectrofotometria a 280 nm. O processo de extração foi realizado uma vez por mês.

#### **3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Alíquotas de 1 mg de peçonha bruta do escorpião *O. cayaporum* foram fracionadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa utilizando uma coluna C18 analítica (250 x 4,60 mm, 4 micron, Phenomenex, Inc, USA). A cromatografia foi realizada em um gradiente linear da solução A (0,12% ácido tricloroacético -TFA em água) a 60% da solução B (0,10% TFA em acetonitrila), com um fluxo de 1 mL/min, por 60 min. A detecção foi realizada por leitura das absorbâncias a 216 e 280nm. As frações foram coletadas manualmente e secadas a vácuo, e armazenadas a -20°C até seu uso.

Os procedimentos anteriormente descritos foram realizados pela Doutora Thalita Camargos.

#### **4. Recromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC).**

As frações de interesse da peçonha do escorpião *O. cayaporum* foram recromatografadas em RP-HPLC utilizando coluna de fase-reversa C18 analítica (250 x 4,60 mm, 4 mícron, Phenomenex, Inc.,USA) e injetadas em um volume de 200 µL (Milliq). A recromatografia foi realizada com gradientes otimizados da solução B (0,10% TFA em acetonitrila), a um fluxo de 1 mL/min, por 55 min. A detecção foi realizada por leitura das absorvâncias a 216 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C, até seu uso.

#### **5. Determinação das massas moleculares por espectrometria de massa**

A identificação das massas moleculares da fração OcyC9 foi realizada no espectrómetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha). Cada fração recromatografada foi ressuspensa em um volume de 10 µL de água deionizada (Milliq). Posteriormente, cada fração foi misturada com uma matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) dissolvida em acetonitrila/água/TFA3%, na proporção 3:1 (3 µL matriz: 1 µL amostra). As amostras para analisar foram depositadas em uma placa do tipo Anchorchip (600 mm), e secas à temperatura ambiente. As massas moleculares obtidas foram medidas no modo refletivo positivo, e os espectros de massas foram elaborados utilizando o *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha).

O sequenciamento do peptídeo OcyC9 foi realizado por MS/MS utilizando a solução tampão redutora bicarbonato de amônio 100 mM/DTT 50 mM e a matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) como explicado abaixo:

Uma vez que a amostra do peptídeo OcyC9 foi dissolvida em 10 µL de água ultrapura (Milliq), foram tomados 1 µL do peptídeo e misturados com 1 µL da solução redutora (bicarbonato de amônio 100 mM/DTT 50 mM) previamente depositada em tubo de PCR. Posteriormente, o tubo foi colocado à temperatura de 60°C por 30 min no termociclador. Após o tempo de incubação, 1 µL da amostra na solução redutora (peptídeo + solução redutora) foi misturado com 2 µL da matriz HCCA e depositadas

em uma placa do tipo Anchorchip (600 mm), e secas à temperatura ambiente. Destaca-se que a solução redutora tem que ser preparada na hora do ensaio.

Após aquisição, os espectros foram analisados mediante o programa FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Alemanha). As massas moleculares e a sequência obtida foram comparadas com a sequência encontrada na análise do transcrito da glândula de peçonha de *O. cayaporum* (Silva et al., 2009).

## **6. Desenho do peptídeo análogo**

O desenho do peptídeo análogo (OcyC9 MOD) foi realizado baseado nas análises de homologia entre as sequências que apresentaram maior grau de similaridade com o peptídeo OcyC9, utilizando a ferramenta BLAST.

## **7. Síntese de peptídeos**

A toxina sintética OcyC9 (nativa e o análogo) foram adquiridas da Pepmic Co., Ltd, Suzhou, China, que posteriormente foram confirmadas mediante cromatografia HPLC e espectrometria de massa do tipo MALDI–TOF. O peptídeo OmTx2, presente na peçonha do escorpião. *O. madagascariensis* foi adquirido como controle das atividades.

## **8. Caracterização eletrofisiológica**

### **8.1. Transformação das células**

1  $\mu$ L de cada cDNA formadora do canal  $K_v2.1$  foi transferido para tubos eppendorf contendo 100  $\mu$ L de células competentes (ET12567). As amostras foram colocadas no gelo durante 20 minutos, logo depois transferidas a 42°C por 1 minuto e depois 2 minutos a mais no gelo (choque térmico). Após choque térmico, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 mL contendo 900  $\mu$ L de meio SOC (Sigma) e incubadas a 37°C durante uma hora. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm.

Volumes de 30 mL de agar e 30  $\mu$ L de antibiótico ampicilina (100 mg/mL) foram misturados em tubos falcon de 50 mL e posteriormente transferidos para as placas de petri. Uma vez que o meio se solidifica e com ajuda da açã bacteriológica, o *pellet* obtido das amostras foi transferido e levado para incubação *overnight* a 37°C para o crescimento das colônias de bactéria. Uma das colônias produzidas foi isolada e transferida para 100  $\mu$ L de meio LBBS (*Broth medium*) suplementado com 100  $\mu$ L ampicilina (100 mg/mL) e levada para a incubadora com agitação *overnight*. Posteriormente, o cDNA amplificado foi obtido conforme as instruções do kit “Pure yield plasmid Maxiprep system” (Promega) e quantificado no NanoDrope para posterior transfecção.

## **8.2. Transfecção e Cultura de Células de linhas estáveis**

### **8.2.1. Canal do tipo Shaker ( $K_v1.3$ ) e BK ( $KCa1.1$ )**

Células HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) expressando canais de potássio do tipo *Shaker* ( $K_v1.3$ ) em mamíferos e humanos BK ( $KCa1.1$ ) foram cultivadas em 5 mL de meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. No caso das células expressando o canal  $KCa1.1$  foi acrescentado 100  $\mu$ L de G418 (50 mg/mL) (Sigma) no médio de cultura. As células foram incubadas em atmosfera umedecida contendo 5% de  $CO_2$  a 37°C.

### **8.2.2. Canal do tipo Shab ( $K_v2.1$ )**

Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) foram transfectadas com o vetor contendo 0,1  $\mu$ g de cDNA do canal do tipo *Shab* ( $K_v2.1$ ) (0,48  $\mu$ g/  $\mu$ L), 0,1  $\mu$ g de GFP (0,043  $\mu$ g/  $\mu$ L) e 4  $\mu$ L de LIPOFECTAMINE (1mg/mL)(Invitrogen) em 208  $\mu$ L de meio OPTIMEM (Gibco). As células foram incubadas em atmosfera umedecida contendo 5% de  $CO_2$  a 37°C e após dos dias, usadas nos ensaios eletrofisiológicos.

### **8.2.3. Canal $K_{ATP}$**

Células HEK (*Human Embryonic Kidney-stable cell line*) expressando canais humanos para potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) do tipo  $K_{IR} 6.2/Sur1$  doadas pelo professor Andrew Tinker (Universidade de Londres). As células foram descongeladas e mantidas em meio MEM (*Minimum essential medium Eagle's*) (Sigma)

suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina /estreptomicina durante uma semana. Após adesão e divisão, as células foram transferidas para o médio seletivo MEM + 727 µg/ µL de G418 (Sigma) + 364 µg/ µL de Zeocin (Invitrogen) e incubadas em atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A transferência das células para o meio seletivo garantirá as características de uma linha celular estável. Para maiores informações de como foi transformada, transfectada e estabilizada a linha celular ver (Giblin et al., 1999).

#### **8.2.4. Canal Cav1.2, e Cav1.3s (*C-terminally short splice variant*)**

Linhagens celulares estáveis HEK 293 que expressam constitutivamente as subunidades auxiliares β3 e α2δ-1 foram induzidas com Doxycycline para expressar a subunidade α1 dos canais Cav1.2, Cav1.3s e Cav2.3. As células expressando Cav1.2 e Cav1.3s foram cultivadas em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen), 10 U/mL penicilina G (Sigma) e mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. 24 horas após o plaqueamento das células em placas de petri de 35 mm, a expressão da subunidade α1 foi induzida usando 1 µg/mL de Doxycycline (Sigma) e logo depois, as células foram mantidas a 5% de CO<sub>2</sub> a 30°C. Experimentos foram realizados após 20-72 h da indução. Para maiores informações das condições para manter as linhas celulares estáveis ver (Ortner et al., 2017).

### **8.3. Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp***

#### **8.3.1. Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp* (Kv1.3)**

Registros eletrofisiológicos de fixação de voltagem (*voltage-clamp*) no modo *Whole-Cell* foram realizados à temperatura ambiente (22-25°C) em amplificador EPC-10 *patch-clamp* (HEKA Eletronics, Rheinland-Pfalz, Germany) e logo depois analisados com o software Fitmaster 2.4 (HEKA Eletronics). As micropipetas foram forjadas com o *micropipette puller* (Model P-1000; sutter instruments U.S.A). As micropipetas utilizadas tiveram uma resistência de 0,9-1,4 MΩ. As correntes de potássio foram registradas com filtro (2,9 kHz). Para os experimentos, foram utilizadas células que apresentarem uma resistência em série (Rs) menor que 6 MΩ e uma

compensação da  $R_s$  de no mínimo, 70%. As micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 140 KF, 2  $MgCl_2$ , 1  $CaCl_2$ , 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7,2 ajustado com KOH. Para a mensuração das correntes foi usada uma solução externa contendo (mM): 155 NaCl, 4,5 KCl, 1  $MgCl_2$ , 2  $CaCl_2$ , 5 HEPES, pH 7,4 ajustado com NaOH.

### **8.3.2. Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp* $K_v2.1$ , BK (KCa 1.1), $K_{ATP}$ ( $K_{IR}$ 6.2/SUR 1)**

Registros eletrofisiológicos de fixação de voltagem (*voltage-clamp*) no modo *Whole-Cell* foram realizados à temperatura ambiente (22-25°C) usando os amplificadores Multiclamp 700B e Axopatch 200A e o digitalizador Axon Digidata 1440 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e logo depois analisados com o software pClamp 10.2 (Molecular Devices). As micropipetas foram forjadas com o *micropipette puller* (Model P-1000; sutter instruments U.S.A) com uma resistência de 2 a 5 M $\Omega$  no banho.

Como solução de banho foi usada Normal Ringer contendo (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1  $MgCl_2$ , 2,5  $CaCl_2$ , 5,5 glicose, 10 HEPES, com pH 7,35 e osmolaridade de 300 mOsm/L para os registros das correntes nos canais  $K_v2.1$  e BK (KCa1.1). No caso do canal de  $K_{ATP}$  ( $K_{IR}$  6.2/Sur1) foi usada solução de banho contendo (mM): 140 KCl, 1,2  $MgCl_2$ , 2,6  $CaCl_2$ , 5 HEPES, com pH 7,4 ajustado com KOH.

Para os registros das correntes de potássio ( $K_v2.1$  e BK (KCa1.1)), as micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 55 EGTA, 5  $CaCl_2$ , 10  $MgCl_2$ , 140 KF, 10 HEPES, pH 7,22 ajustado com KOH; para os registros das correntes do canal  $K_{ATP}$  ( $K_{IR}$ 6.2/Sur1) contendo (mM): 140 KCl, 1,2  $MgCl_2$ , 1  $CaCl_2$ , 10 EGTA, 5 HEPES, 1 MgATP, 0,5 Na UDP, pH 7,2 ajustado com KOH. Usando o programa online "*Maxquillator*" foi determinado a quantidade de ATP livre disponível na solução interna e conferido que estivesse dentro dos parâmetros normais para diminuir o efeito bloqueador do canal na presença do nucleotídeo livre.

Os dados foram coletados usando um filtro primário do tipo Bessel a 10kHz e ou filtro secundário Bessel a 2,9kHz. A compensação da resistência em série foi até 60% para minimizar o erro da voltagem e ter boas condições no *voltage-clamp* e, foram analisadas 3 células para cada subtipo de canal.

### 8.3.3. Experimentos em *Whole-cell Patch-Clamp Cav1.2 e Cav1.3s*

Os registros eletrofisiológicos foram realizados na configuração *Whole-cell* a temperatura ambiente (22-25°C) usando um amplificador Axopatch 200 B (Molecular Devices). Os registros foram digitalizados usando Digidata 1322A (Molecular Devices) a 40-50 kHz, e logo depois analisados com o software pClamp 10.2 (Molecular Devices). A correção do *leak* foi realizada online usando o protocolo P/4 ou off-line. A resistência em série foi compensada entre 60-90%. Todas as voltagens foram corrigidas com potencial de junção líquida de 9 mV. As micropipetas foram forjadas com o *micropipette puller* (Model P-1000; sutter instruments U.S.A) e polidas com MF-830 Microforge (Narishige) com uma resistência de 2 a 3 MΩ no banho.

Como solução de banho contendo (mM): 2 CaCl<sub>2</sub>, 170 cloreto -Cl, 1 MgCl<sub>2</sub>, e 10 HEPES, pH 7,3 ajustado com CsOH foi usada. Para os registros das correntes de Cálcio (Cav1.2 e Cav1.3s), as micropipetas foram preenchidas com solução interna contendo (mM): 135 CsCl, 10 Cs-EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, e 4 ATP-Na<sub>2</sub>, pH 7,4 ajustado com CsOH. Foi usado 2 mM Ca<sup>+2</sup> como carregador.

### 8.4. Protocolo Experimental

O efeito dos peptídeos OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 sobre as correntes iônicas nos diferentes canais foram avaliados como segue:

As células foram perfundidas por um sistema de perfusão acionado por pressão de ar (BPS-8 Valve Control System, ALA Scientific Instruments) ou por gravidade com solução de banho contendo 0,1 mg/mL de Albumina sérica bovina (BSA) na presença ou ausência de toxina, e fluxo de ~0,6 mL/min. Para excluir a possibilidade de contaminação do sistema de perfusão e para ter o controle dos efeitos potenciais da própria perfusão, cada dia antes de medir os efeitos das toxinas, os registros de controle com a solução de banho foram realizadas usando o mesmo tubo que subsequentemente foi usado para as toxinas. Para garantir que as células exibam as propriedades farmacológicas típicas foram usados controles positivos adequados para cada subtipo de canal.

As correntes de potássio no canal  $K_v1.3$ , foram registradas a partir do potencial de repouso de -80 mV por 10 ms, seguido de um estímulo de 50 mV por 15 ms e uma hiperpolarização de -120 mV por 15 ms. O protocolo P/4 (*leak subtraction*) foi utilizado nessas condições. No canal  $K_v2.1$  as correntes foram registradas cada 15 segundos, com variações de voltagem de -100 mV a + 50 mV, e potencial de repouso de -100 mV, O protocolo P/4 foi usado e como controle positivo 10 mM TEA, enquanto que no canal BK ( $KCa1.1$ ) as correntes foram registradas cada 15 segundos, com variações de voltagem de -90 mV a + 50 mV, e potencial de repouso de -90 mV, e controle positivo de 100 mM TEA.

No canal  $K_{ATP}$  as correntes foram ativadas cada 100 ms com variações de voltagem de -100 mV a + 50 mV com incrementos de 10 mV a partir de potencial de repouso de 0 mV. As correntes foram registradas em condições simétricas de potássio (140 mM), e após 5 minutos de estabelecida a configuração *whole cell*. Foi usado o protocolo de rampa (-100 mV a + 50 mV) para a administração da toxina e usado como controle positivo 100  $\mu$ M de Tolbutamide (Sigma).

No canal de cálcio, uma vez estabelecida a configuração *Whole-cell* e após a abertura da célula, o protocolo I-V foi aplicado para determinar a Voltagem máxima da célula ( $V_{max}$ ). Logo depois, o protocolo de 100 ms/ 0.1 Hz a partir de -89 mV até o  $V_{max}$  foi aplicado e depois de alguns *sweeps*, o tubo 1 (sempre contendo apenas solução de banho com 0,1 mg/mL de BSA) foi aberto, normalmente a corrente aumenta devido à perfusão líquida. Assim que a corrente se estabilizou (3 *sweeps* constantes), as células foram perfundidas com a solução de banho contendo 0,1 mg/mL de BSA no tubo 2 (registros de controle) ou as soluções de toxina. No final dos registros, as correntes foram completamente bloqueadas pelo inibidor Isradipine (3  $\mu$ M para  $Ca_v1.2$  e  $Ca_v1.3s$ )

A relação (I-V) foi obtida aplicando um pulso de 20 ms (*long square pulse*) em várias voltagens partindo do potencial de repouso de -89 mV. As curvas I-V resultantes foram ajustadas com a seguinte equação:

$$I = G_{max} (V - V_{rev}) / (1 + \exp[-(V - V_{0.5})/k])$$

Onde  $I$  é a amplitude do pico da corrente,  $G_{\max}$  é a condutância máxima,  $V$  é a voltagem,  $V_{\text{rev}}$  é potencial de reversão extrapolado,  $V_{0.5}$  a voltagem de ativação meia-máxima, e  $k$  é o fator de inclinação.

Os compostos foram testados a 100 ms (*long square pulse*) a partir do potencial de repouso de  $-89$  mV até a  $V_{\max}$  para cada célula por separado com uma frequência de 0,1 Hz. Um pequeno prépulso de  $-99$  mV foi usado para a subtração do *leak offline*.

### **9. Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey) e prova t de *student* ( $p < 0,05$ ) segundo o caso e tamanho da amostra. As análises foram realizadas usando o *software* Graph Pad Prisma versão 5.

## V. RESULTADOS

### 1. Purificação, identificação e sequenciamento do peptídeo OcyC9.

OcyC9 é um peptídeo cuja sequência de aminoácidos foi deduzida de uma das EST (*Expressed Sequences Tag*) da biblioteca de cDNA construída a partir do RNA poli (A)<sup>+</sup> obtido da glândula da peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*, que codifica para um peptídeo maduro de 24 resíduos de aminoácidos (Figura 15) (Silva et al., 2009) e com uma massa monoisotópica teórica de 2548,09 Da.

Schwartz e colaboradores, em 2008, reportam o *fingerprint* das massas moleculares das frações da peçonha bruta do escorpião, encontrando-se uma massa próxima de 2.545,2 Da que elui entre 29 e 33 min (Schwartz et al., 2008); portanto, foram esses parâmetros levados na conta para comprovar se o peptídeo OcyC9 de fato era produzido na peçonha.

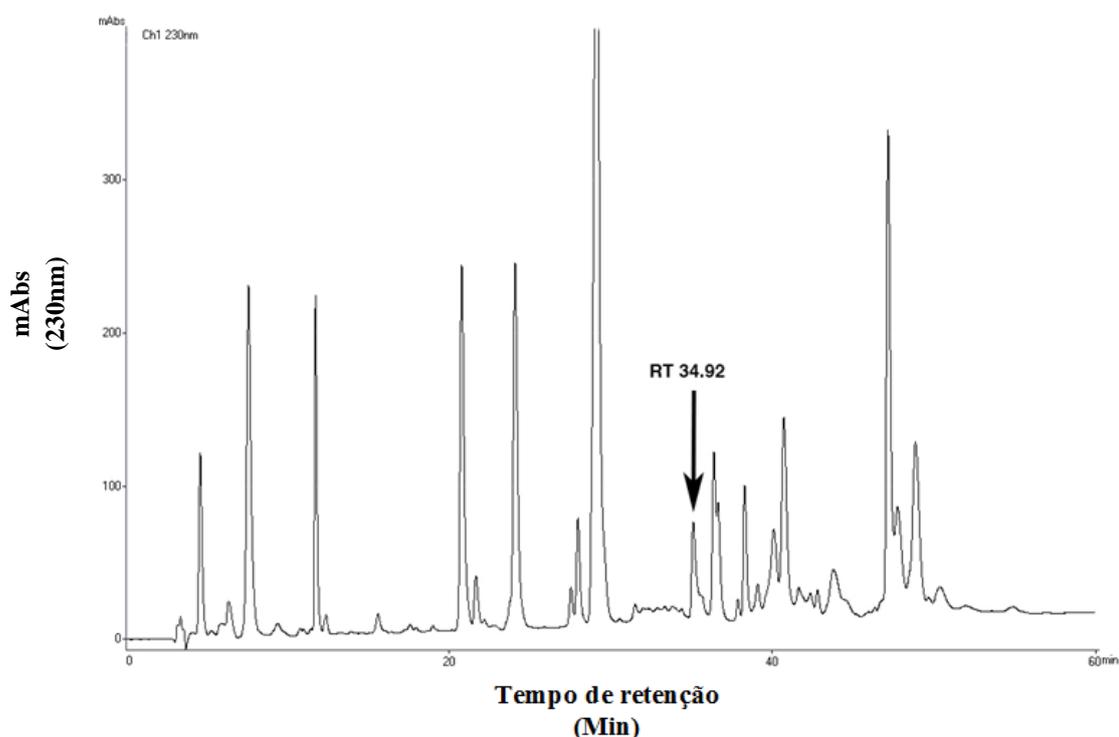
1	ATG	AAG	ACT	TCT	AAG	ATG	ATT	TGT	GCT	TTT	CTA	TTG	GTT	CTG	GTT	45
1	M	K	T	S	K	M	I	C	A	F	L	L	V	L	V	15
46	GTC	GGA	ACA	TTC	AAT	GAT	ATA	AGT	GGA	GCA	TAT	GGA	GAA	TAC	GTG	90
16	V	G	T	F	N	D	I	S	G	A	Y	G	E	Y	V	30
91	GAG	GAC	CAG	CAC	AGC	TTC	AAA	ATT	GAA	AGG	CGT	TTT	CCA	CCA	TGC	135
31	E	D	Q	H	S	F	K	I	E	R	R	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	45
136	GTA	GAA	GTA	TGC	GTT	CAG	CAT	ACT	GGC	AAT	GTA	AAA	GAA	TGT	GAA	180
46	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	60
181	GCA	GCA	TGC	GGT	GAA	TAA										198
61	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	*										

**Figura 15.** Sequência deduzida do peptídeo OcyC9 a partir de um clone de cDNA. Peptídeo sinal os primeiros 27 resíduos de aminoácidos, pro-peptídeo de 28-39 resíduos de aminoácidos e a sequência do peptídeo maduro sublinhada. Tomada de (Silva et al., 2009).

Alíquotas de 1 mg da peçonha bruta do escorpião *O. cayaporum* foram usadas para o fracionamento em coluna C18 analítica mediante HPLC em fase reversa com gradiente linear de 0% a 60% de ACN, observando-se um total de 80 frações cromatográficas (Figura 16). Analisando-se o perfil cromatográfico é evidente que seis frações com uma intensidade maior a 200 mV são as frações mais representativas e

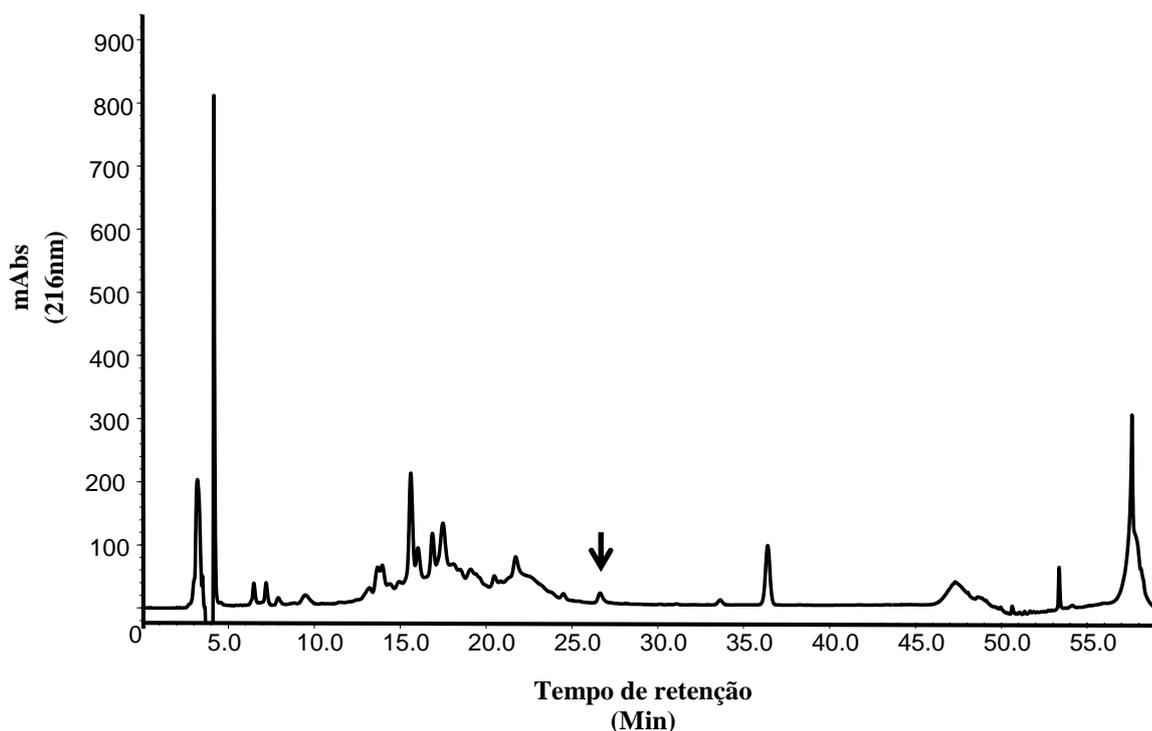
abundantes da peçonha e, poderia-se dizer que a maioria dos compostos presentes na peçonha é de natureza hidrofóbica que eluem a partir de 20% de ACN (Figura 16).

Uma vez conhecida a provável sequência madura linear da toxina OcyC9 (Figura 15) determinou-se sua massa teórica monoisotópica de  $[M+H]^+=2549,09$  Da. Um componente com massa molecular aproximada de  $[M+H]^+= 2545,09$  Da (massa oxidada) foi procurado nas frações cromatográficas que eluem na faixa de 29 e 33 min (Schwartz et al., 2008) mediante análise de espectrometria de massa MALDI-TOF, encontrando-se a fração com tempo de retenção de 34,92 minutos (Figura 16).



**Figura 16.** Perfil cromatográfico da peçonha bruta do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*. A fração indicada (seta) foi recromatografada para posterior identificação e purificação do peptídeo.

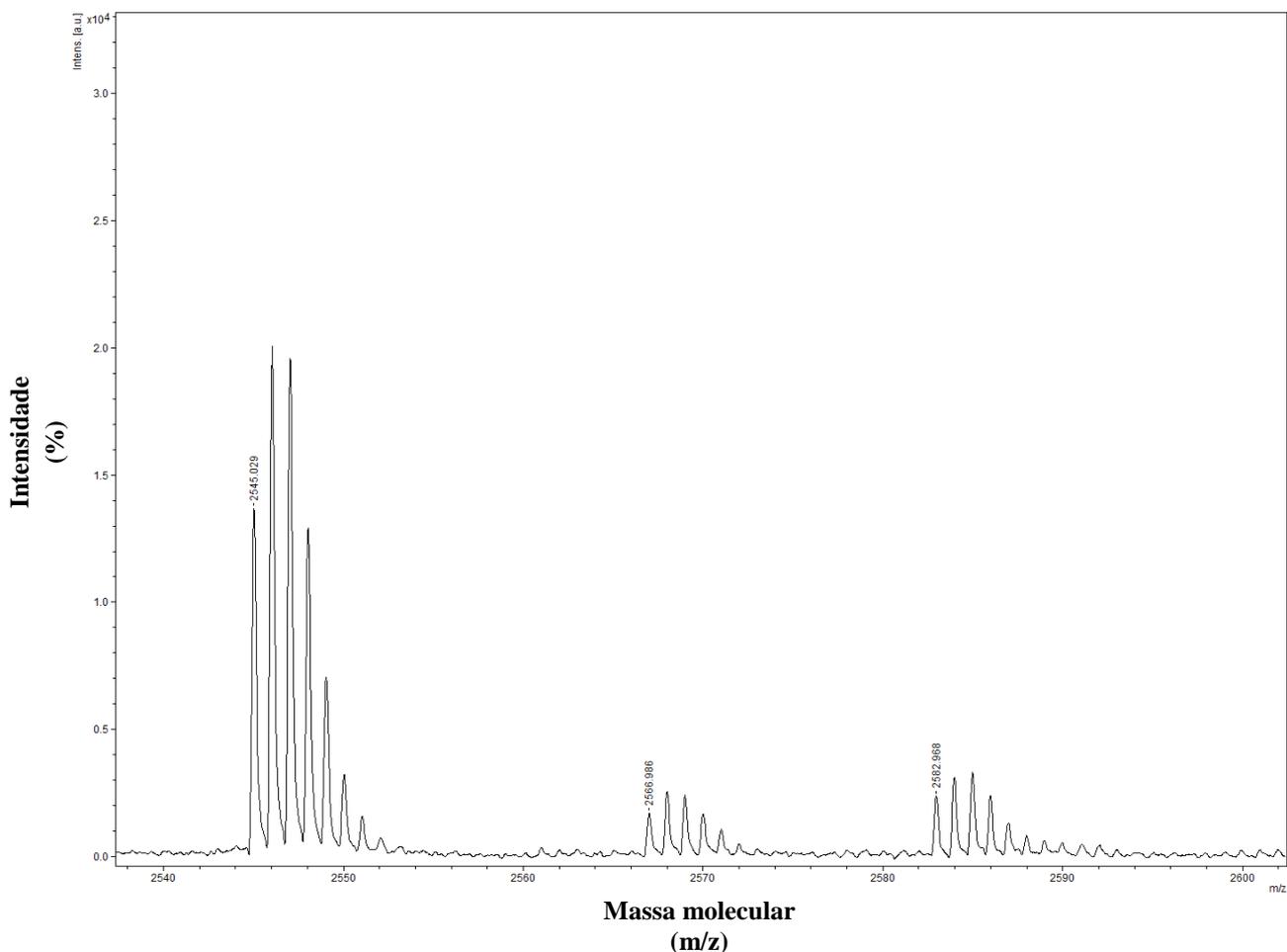
Posteriormente, essas frações foram recromatografadas (Figura 17) e as massas moleculares dos componentes foram determinadas; conseguindo identificar uma massa monoisotópica experimental de  $[M+H]^+ : 2.545,03$  Da (Figura 18) que corresponderia ao peptídeo OcyC9 que eluiu aproximadamente aos 27% de ACN. Observa-se também no espectro de massa a presença da massa do íon molecular ligado ao íon  $Na^+$  e  $K^+$  com massas de  $[M+H]^+ : 2566,98$  e  $2582,97$ , respectivamente.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico da recromatografia do peptídeo OcyC9. A fração indicada (seta) que elui com RT 27 min corresponde ao peptídeo identificado e purificado da peçonha bruta do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*. Gradiente de 15 a 40% de B, em 55 minutos, a fluxo de 1 mL /min.

A sequência do peptídeo OcyC9 representa o estado reduzido da toxina onde as ligações dissulfeto entre as cisteínas presentes na sua sequência não estão formadas ainda; uma vez que as ligações dissulfeto são formadas, o peptídeo OcyC9 encontra-se no seu estado oxidado, sendo esse último o estado no qual a toxina encontra-se na peçonha. Portanto, para determinar a totalidade da sequência da toxina OcyC9 foi importante usar a solução redutora (bicarbonato de amônio 100 mM/DTT 50mM) para transformar a toxina de seu estado oxidado para seu estado reduzido; e assim, conseguir visualizar aqueles resíduos de aminoácidos presentes entre as ligações dissulfeto.

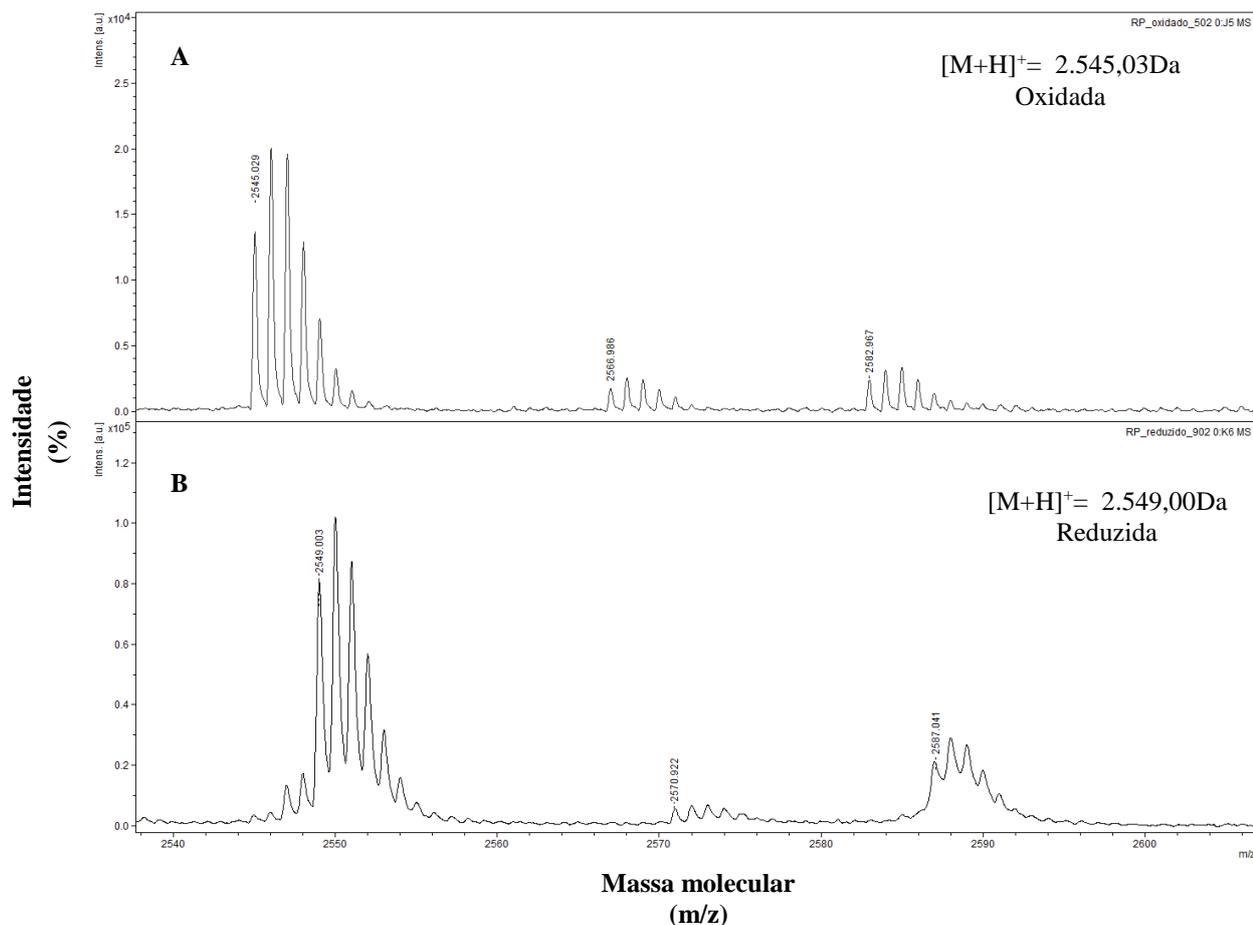
Destaca-se que na solução o DTT (Dithiothreitol) ou também conhecido como reagente de Cleland, é o agente redutor normalmente utilizado para reduzir as ligações dissulfeto presentes nas proteínas, e assim evitar a formação das ligações dissulfeto intramoleculares e intermoleculares entre os resíduos de cisteínas.



**Figura 18.** Espectrograma da massa molecular de OcyC9. A figura ilustra a resolução monoisotópica do peptídeo OcyC9  $[M+H]^+$ : 2.545,03 Da obtido em MALDI TOF/TOF.

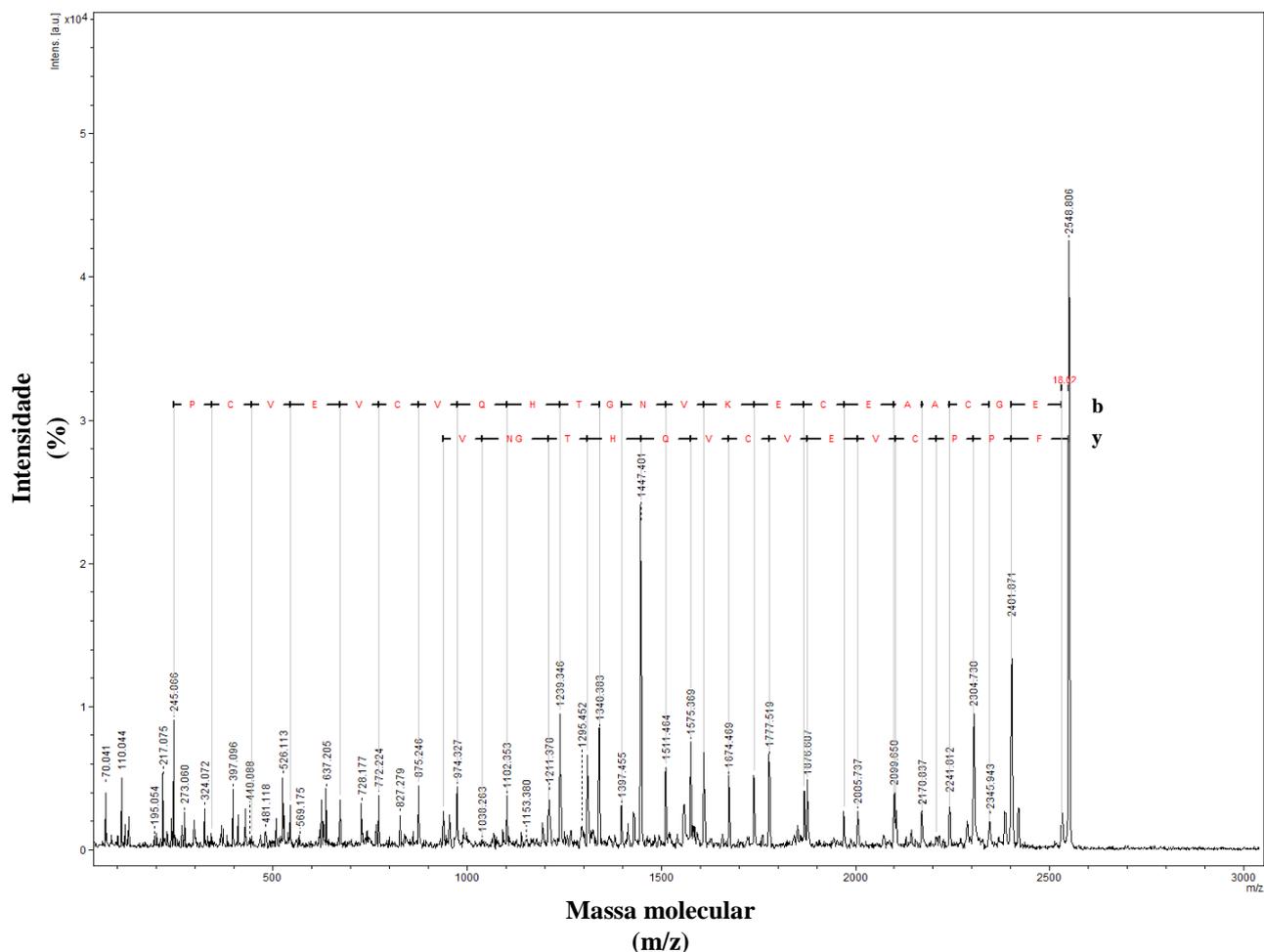
No entanto, o DTT não conseguiu reduzir aquelas ligações dissulfeto inacessíveis aos solventes, sendo necessário que o processo de redução seja realizado sob condições desnaturantes como por exemplo, o uso de altas temperaturas (Cleland, 1964; Lukesh III et al., 2012).

O peptídeo OcyC9 foi misturado com a solução de bicarbonato de amônio 100 mM/DTT 50mM a temperatura de 60°C por 30 minutos; 1  $\mu$ L daquela mistura foi aplicado na placa de MALDI com 2  $\mu$ L de matriz HCCA, e levado para análise por espectrometria de massa; conseguindo identificar que o peptídeo OcyC9 possui no seu estado oxidado uma massa de  $[M+H]^+$ : 2545,03 Da e no estado reduzido de  $[M+H]^+$ : 2549,00Da (Figura 19) conferindo assim, o sucesso da redução e obtenção da toxina reduzida, estado ideal para seu posterior sequenciamento.



**Figura 19.** Espectrograma da massa molecular de OcyC9 no seu estado oxidado e reduzido. A figura ilustra a resolução monoisotópica do peptídeo OcyC9: A. OcyC9 com uma massa  $[M+H]^+$ : 2.545,03 Da (Estado oxidado); B. OcyC9 com uma massa  $[M+H]^+$ : 2.549,00 Da (Estado reduzido) obtido em MALDI TOF/TOF.

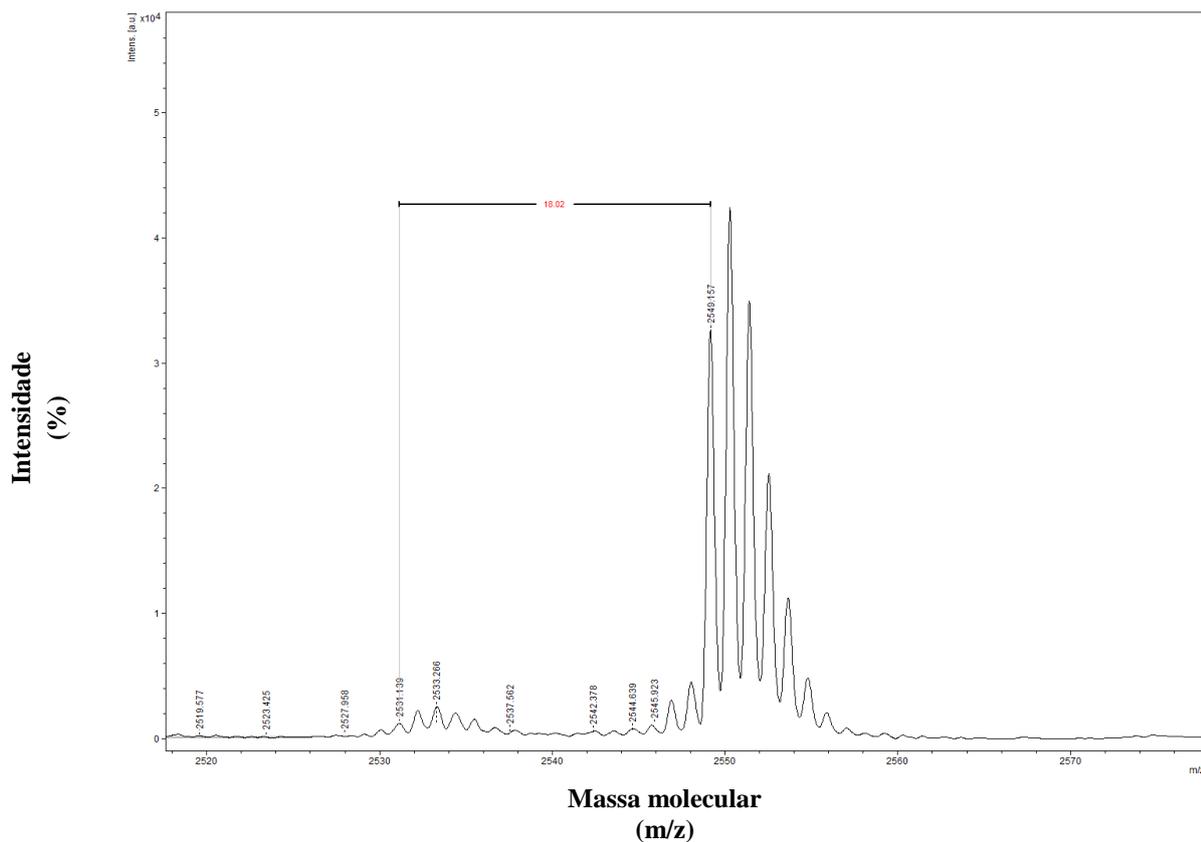
Após identificação, purificação e redução do peptídeo OcyC9, mediante análise de espectrometria de massas MALDI-TOF (MS/MS) foi determinada a sequência total do peptídeo (FPPCVEVCVQHTGNVKECEAACGE) de 24 resíduos de aminoácidos com a presença de 4 cisteínas formando 2 ligações dissulfeto (Figura 20); que quando comparada com a sequência reportada por Silva e colaboradores (Silva et al., 2009); foi possível conferir que de fato o animal produz a toxina encontrada no transcrito.



**Figura 20.** Sequência completa do peptídeo OcyC9. As séries “b” e “y” estão apresentadas no topo direito.

Destaca-se que a presença da amidiação do extremo C-terminal também pode ser importante na atividade para algumas neurotoxinas, quanto que para outras toxinas não é relevante (Estrada et al., 2011; Merkler, 1994); portanto, era necessário analisar e conferir se o peptídeo OcyC9 era amidado ou não.

Usando as análises dos espectros de massa obtidos após fragmentação do peptídeo, pode-se observar (Figura 21) uma diferença de 18,02 Da entre a massa do íon molecular e a perda da molécula de água no primeiro resíduo de aminoácido do C-terminal “E”.



**Figura 21.** Espectro de massa de OcyC9. A figura ilustra a diferença de 18,02 Da entre a massa molecular do íon  $[M+H]^+$ : 2.549,15 e a perda da molécula de água no primeiro resíduo de aminoácido do C- terminal “E”.

Além disso, a ausência do sinal de amidação na sequência (Figura 15), a concordância entre as massas teórica e experimental monoisotópica de  $[M+H]^+$ :2549,09Da e  $[M+H]^+$ :2.549,00, respectivamente, determinou-se que o peptídeo OcyC9 não é amidado.

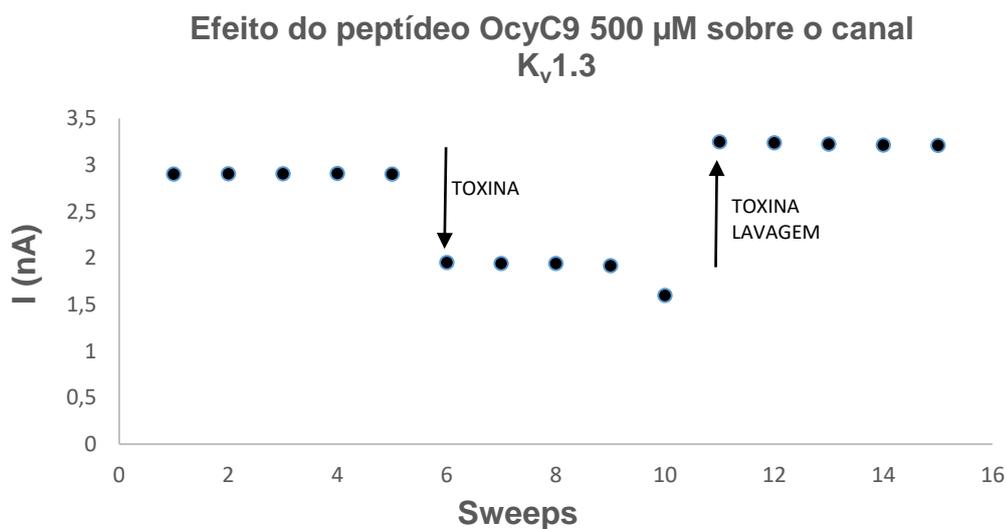
## 2. Atividade eletrofisiológica

### 2.1. Efeito dos peptídeos sobre o canal $K_v1.3$

#### 2.1.1. Efeito de 500 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9 sobre o canal $K_v1.3$

O peptídeo OcyC9 na concentração de 500  $\mu\text{M}$  (n=5) gera uma diminuição da corrente do canal  $K_v1.3$  que é dada exclusivamente pela presença da toxina (Figura 22). Foi determinado que o peptídeo OcyC9 na concentração avaliada inibe em 58,5% (RCF= 0,4150) a corrente com erro padrão de 0,02 e uma significância estatística em

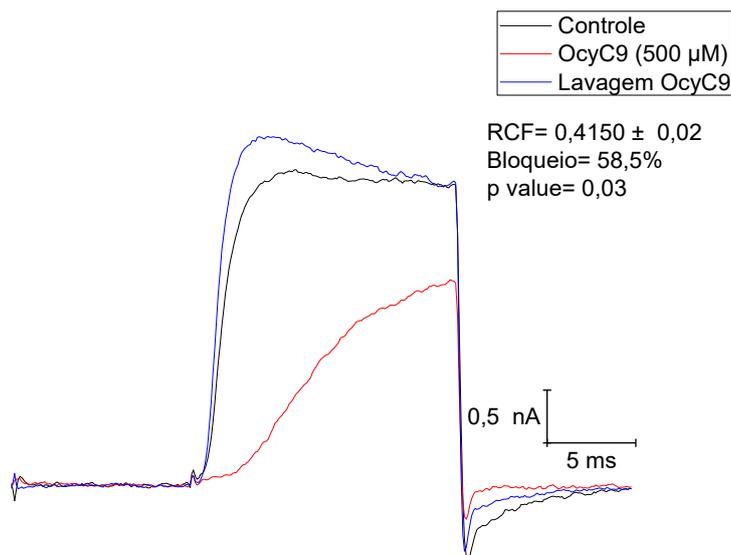
$p=0,03$ . Além disso, pode-se observar que, na presença do peptídeo, a fase da ativação do canal se vê alterada (Figura 23), o que foi analisado no deslocamento da constante de tempo de ativação (Tau) com uma variação de 1,087 ms no controle para 4,405 ms na presença do peptídeo (Tabela 1). Portanto, poderia se sugerir que o peptídeo poderia modular a cinética de ativação do canal.



**Figura 22.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $K_v1.3$  ( $n=5$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $K_v1.3$  na presença do peptídeo OcyC9 (500  $\mu$ M). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.

**Tabela 1.** Análise do deslocamento do TAU no canal  $K_v1.3$  na presença do peptídeo OcyC9.

Média TAU	Erro	Média TAU	Erro
controle	Padrão da média	toxina	padrão da média
1,087 ms	0,07	4,405 ms	1,30



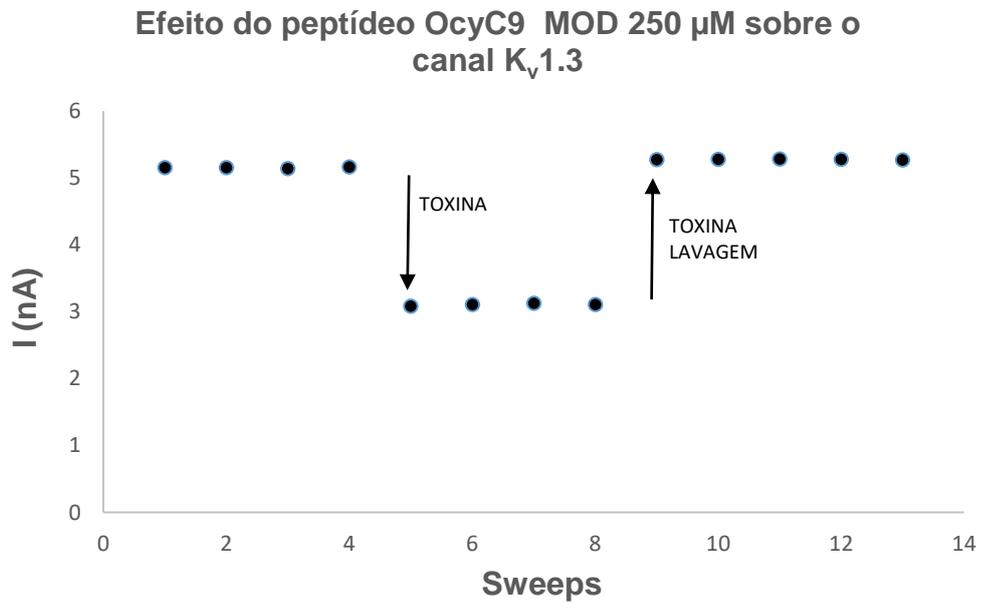
**Figura 23.** Efeito de 500  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{K}_v1.3$  ( $n=5$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{K}^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 e na cor azul a corrente após lavagem da toxina. \*RCF= corrente persistente; \* S.E.M.=Erro padrão da média; *p value*= significância estatística (*t student*).

### 2.1.2. Efeito de 250 $\mu\text{M}$ OcyC9 MOD sobre o canal $\text{K}_v1.3$

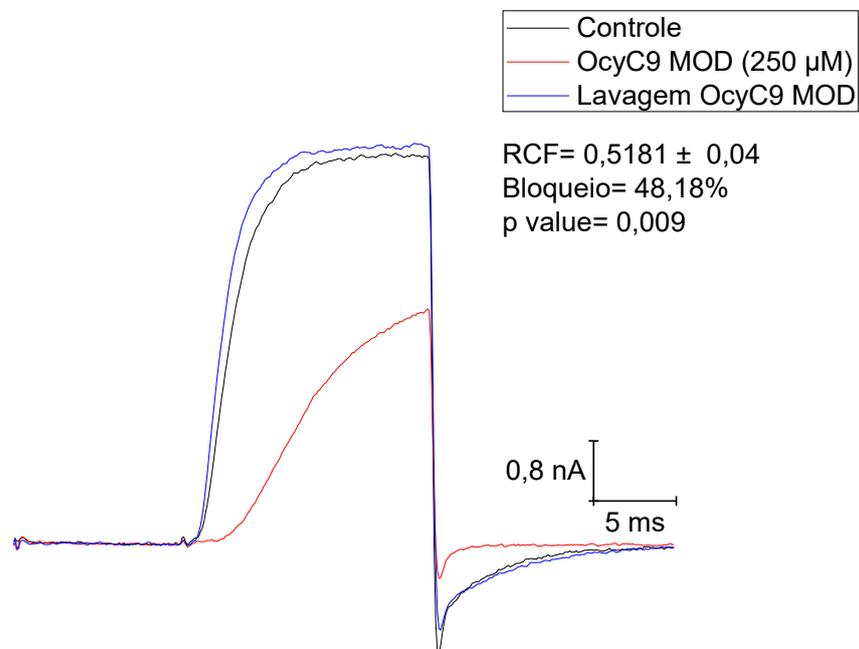
O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 250  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) gera uma diminuição da corrente do canal  $\text{K}_v1.3$  que é dada exclusivamente pela presença da toxina (Figura 24). Foi determinado que o peptídeo OcyC9MOD na concentração avaliada inibe em 48,18% (RCF= 0,5181) a corrente com erro padrão de 0,04 e uma significância estatística em  $p= 0,009$ . Além disso, pode-se observar que na presença do peptídeo a fase da ativação do canal se vê alterada (Figura 25), o que foi analisado no deslocamento do Tau com uma variação de 2,21 ms no controle para 8,621ms na presença do peptídeo (Tabela 2). Portanto é possível que o peptídeo module a cinética de ativação do canal.

**Tabela 2.** Análises do deslocamento do TAU no canal  $\text{K}_v1.3$  na presença do peptídeo OcyC9 MOD.

Média TAU	Erro	Média TAU	Erro
controle	Padrão da média	toxina	padrão da média
2,21 ms	0,16	8,621 ms	0,39



**Figura 24.** Efeito de 250  $\mu$ M do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $K_v1.3$  (n=3). A figura ilustra a cinética ou “Time-course” do canal  $K_v1.3$  na presença do peptídeo OcyC9MOD (250  $\mu$ M). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.

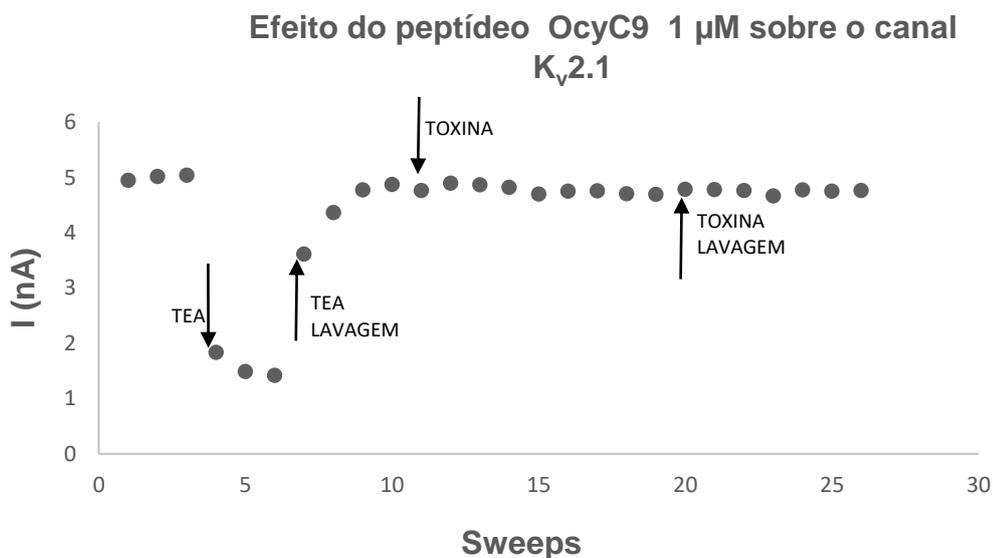


**Figura 25.** Efeito de 250  $\mu$ M do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal  $K_v1.3$  (n=3). A figura ilustra as correntes do íon  $K^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD e na cor azul a corrente, após lavagem da toxina. \*RCF= corrente persistente; \* S.E.M.= Erro padrão da média; p value= significância estatística (*t student*).

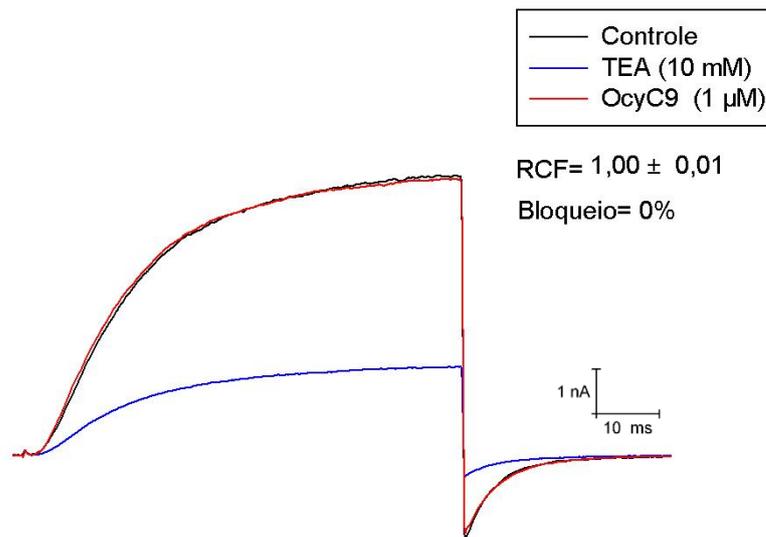
## 2.2. Efeito dos peptídeos sobre o canal Kv2.1

### 2.2.1. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9 sobre o canal Kv2.1

O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) não gerou efeito sobre a corrente do canal Kv2.1, observando-se que na presença da toxina não há mudanças na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo TEA (10 mM) (Figura 26). Portanto, foi determinado que o peptídeo OcyC9 na concentração avaliada não inibe a corrente ( $\text{RCF}=1$ ), sendo que a corrente controle e a corrente na presença da toxina (Figura 27) são as mesmas, e é mantida após lavagem da toxina. O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal Kv2.1 ou alterou a cinética de ativação e inativação do canal (Figura 27).



**Figura 26.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal Kv2.1 ( $n=3$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal Kv2.1 na presença do controle positivo TEA (10 mM) e o peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.

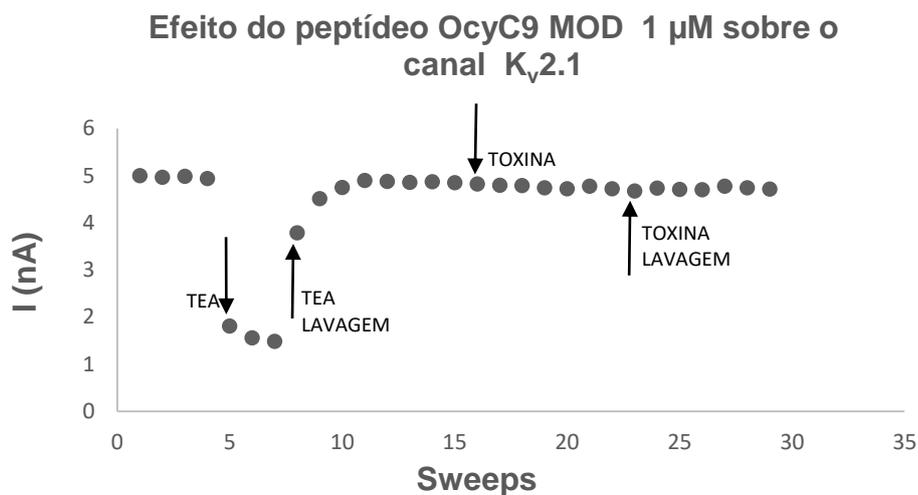


**Figura 27.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{K}_{\text{v}2.1}$  ( $n=3$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{K}^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1 $\mu\text{M}$ ) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (10 mM). \*RCF: corrente persistente; \* S.E.M= Erro padrão da média.

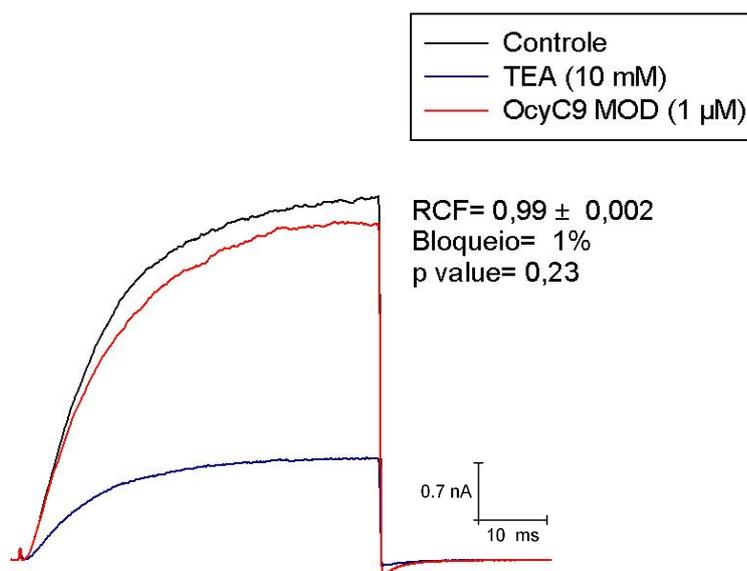
### 2.2.2. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal $\text{K}_{\text{v}2.1}$

O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) não gera efeito nenhum sobre a corrente do canal  $\text{K}_{\text{v}2.1}$ , observando-se que na presença da toxina não há mudanças na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo TEA (10 mM) (Figura 28). No entanto, nas análises comparativas dos traços controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OcyC9MOD na concentração avaliada parece inibir a corrente em 1% (RCF=0,99) com erro padrão de 0,002, porém não foi estatisticamente significativo em  $p=0,23$  (Figura 29).

Essa pequena diminuição da corrente na presença da toxina pode ser em decorrência ao decréscimo da corrente ao longo do experimento, o que foi verificado com os traços após lavagem da toxina, os quais se mantêm na mesma posição da corrente na presença da toxina. É importante lembrar que o gráfico escolhido é aquele que representa a média dos dados. O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal  $\text{K}_{\text{v}2.1}$  ou alterou a cinética de ativação e inativação do canal (Figura 29).



**Figura 28.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal  $K_v2.1$  (n=3). A figura ilustra a cinética ou “Time-course” do canal  $K_v2.1$  na presença do controle positivo TEA (10 mM) e o peptídeo OcyC9 MOD (1  $\mu$ M). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.

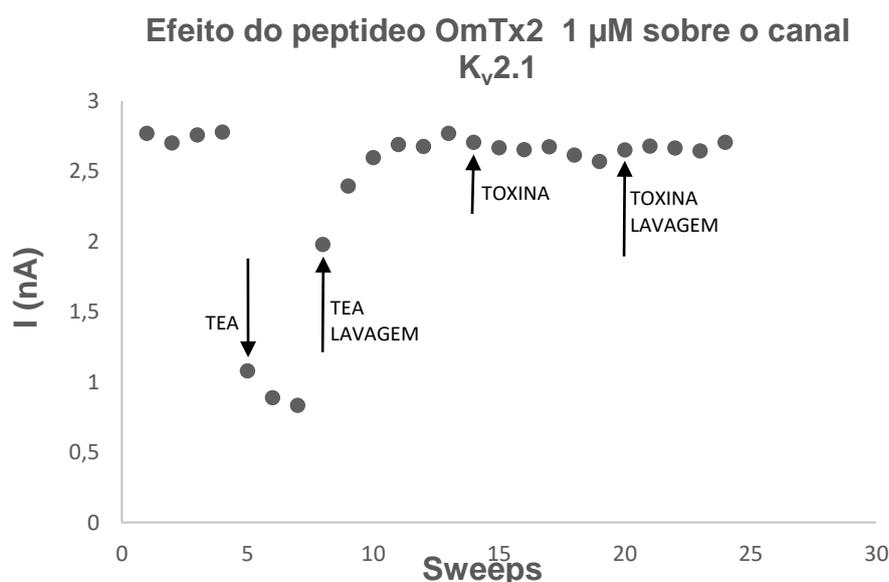


**Figura 29.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal  $K_v2.1$  (n=3). A figura ilustra as correntes do íon  $K^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD (1  $\mu$ M) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (10mM). \*RCF=corrente persistente; \* S.E.M. = Erro padrão da média; p value= significância estatística (*t student*).

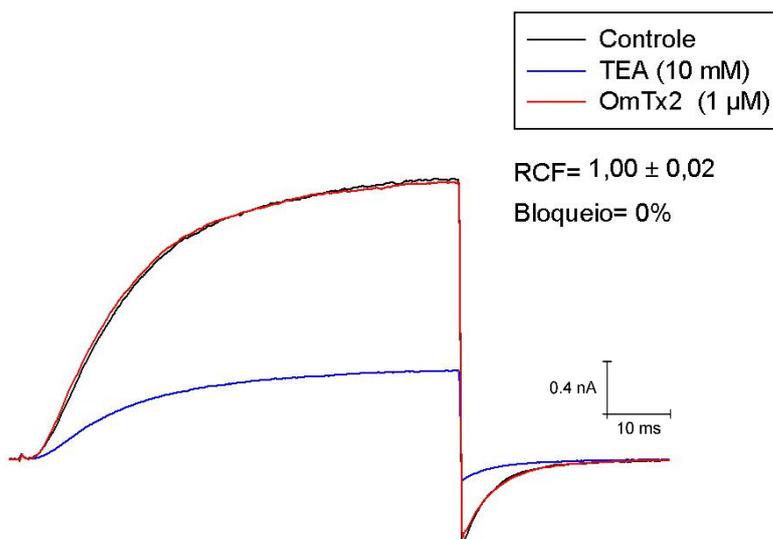
### 2.2.3. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OmTx2 sobre o canal $K_v2.1$

O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu$ M (n=3) não gera efeito nenhum sobre a corrente do canal  $K_v2.1$ , observando-se que na presença da toxina não há mudanças na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo

TEA (10 mM) (Figura 30). Portanto, foi determinado que o peptídeo OmTx2 na concentração avaliada não inibe a corrente (RCF=1,01) sendo que a corrente controle e a corrente na presença da toxina (Figura 31) são as mesmas, e é mantida após lavagem da toxina. O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal  $\text{K}_v2.1$  ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 31).



**Figura 30.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{K}_v2.1$  ( $n=3$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{K}_v2.1$  na presença do controle positivo TEA (10 mM) e o peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.

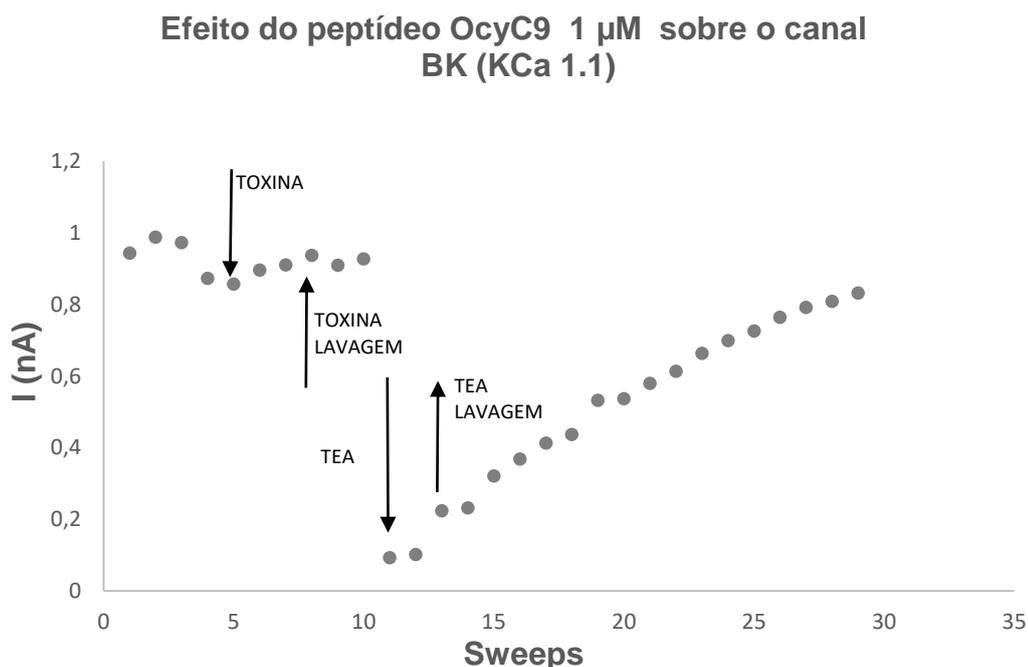


**Figura 31.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{K}_v2.1$  ( $n=3$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{K}^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (10mM). \*RCF= corrente persistente; \* média  $\pm$  S.E.M. = Erro padrão.

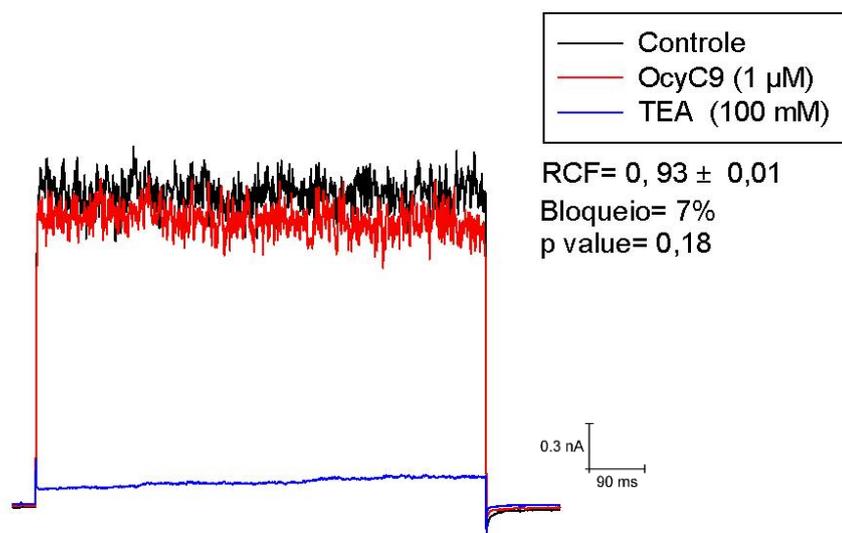
## 2.3. Efeito dos peptídeos sobre o canal BK (KCa1.1)

### 2.3.1. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9 sobre o canal BK (KCa1.1)

O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) não produziu efeito sobre a corrente do canal BKCa1.1, observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo TEA (100 mM) (Figura 32). No entanto, nas análises dos traços do controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OcyC9 na concentração avaliada parece inibir a corrente em 7% ( $\text{RCF}=0,93$ ), com erro padrão de 0,01, porém não significativo estatisticamente em  $p= 0,18$  (Figura 33). O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal BKCa1.1 ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 33).



**Figura 32.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal KCa1.1 ( $n=3$ ). A figura ilustra a cinética ou “Time-course” do canal BKCa1.1 na presença do controle positivo TEA (100 mM) e o peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.

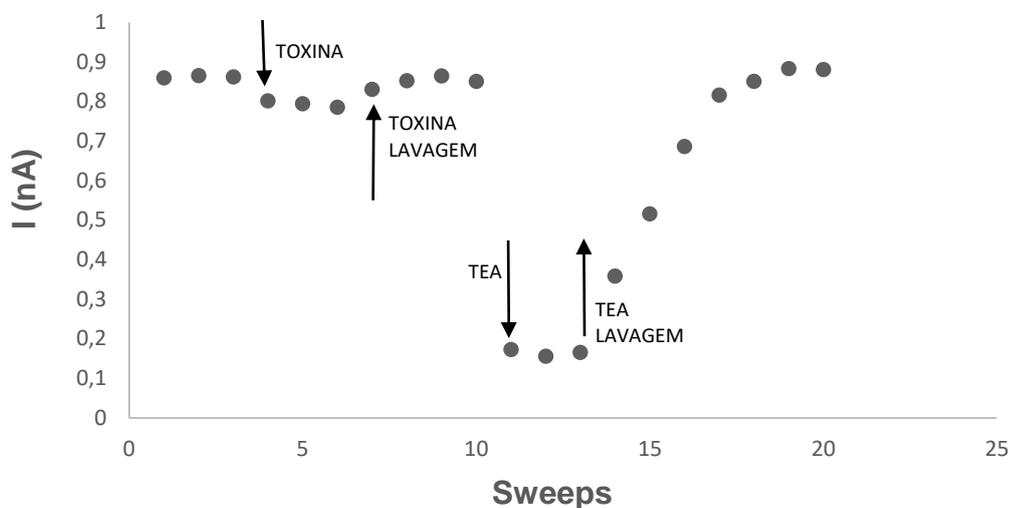


**Figura 33.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{K}^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1 $\mu\text{M}$ ) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (100mM). \*RCF= corrente persistente; \* S.E.M. = Erro padrão da média; p value= significância estatística (*t student*).

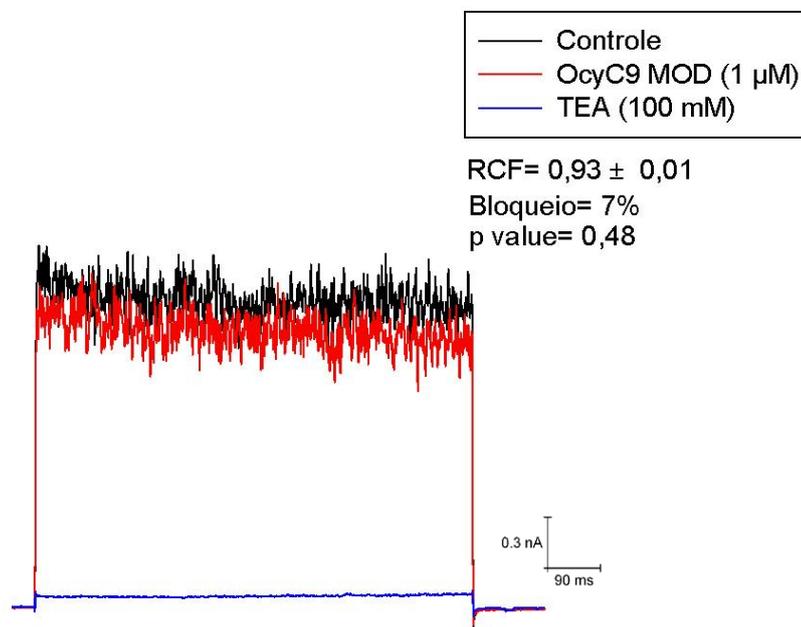
### 2.3.2. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal BK (KCa 1.1)

O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (n=3) não gera efeito sobre a corrente do canal BKCa1.1, observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo TEA (100 mM) (Figura 34). No entanto, nas análises dos traços do controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OcyC9MOD na concentração avaliada parece inibir a corrente em 7% (RCF=0,93) com erro padrão de 0,01, porém não significativo estatisticamente em  $p= 0,48$  (Figura 35). O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal BKCa1.1 ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 35).

### Efeito do peptídeo OcyC9 MOD 1 $\mu\text{M}$ sobre o canal BK (KCa1.1)



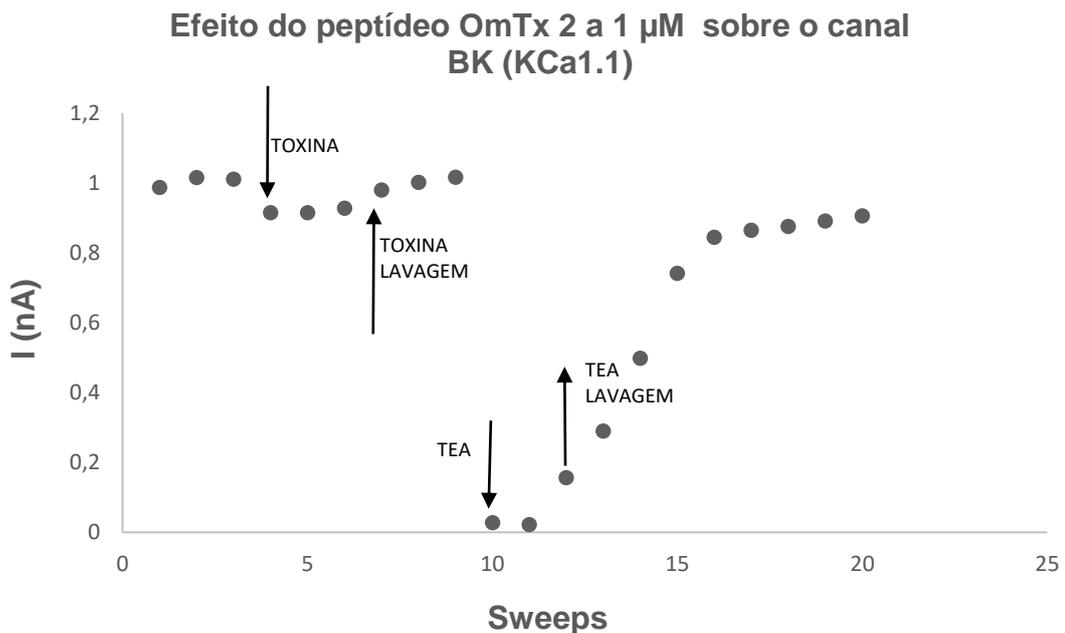
**Figura 34.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal BKCa1.1 ( $n=3$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal BKCa1.1 na presença do controle positivo TEA (100mM) e o peptídeo OcyC9 MOD (1 $\mu\text{M}$ ). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.



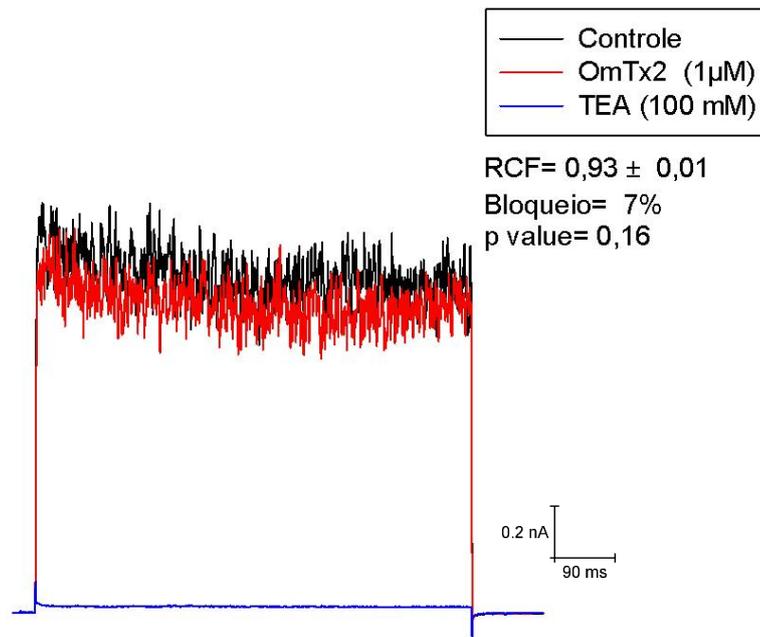
**Figura 35.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal BKCa1.1 ( $n=3$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{K}^+$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (100 mM). \*RCF= corrente persistente; \* S.E.M. = Erro padrão da média; *p value* = significância estatística (*t student*).

### 2.3.3. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OmTx2 sobre o canal BK (KCa1.1)

O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) não gera efeito sobre a corrente do canal BKCa1.1, observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo TEA (100 mM) (Figura 36). No entanto, nas análises dos traços do controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OmTx2 na concentração avaliada parece inibir a corrente em 7% (RCF=0,93) com erro padrão de 0,01, porém não significativo estatisticamente em  $p=0,16$  (Figura 37). O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal BKCa1.1 ou alterou a cinética de ativação e inativação do canal (Figura 37).



**Figura 36.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal BKCa1.1 ( $n=3$ ). A figura ilustra a cinética ou "Time-course" do canal BKCa1.1 na presença do controle positivo TEA (100mM) e o peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ). As setas correspondem ao momento da aplicação e remoção do composto.



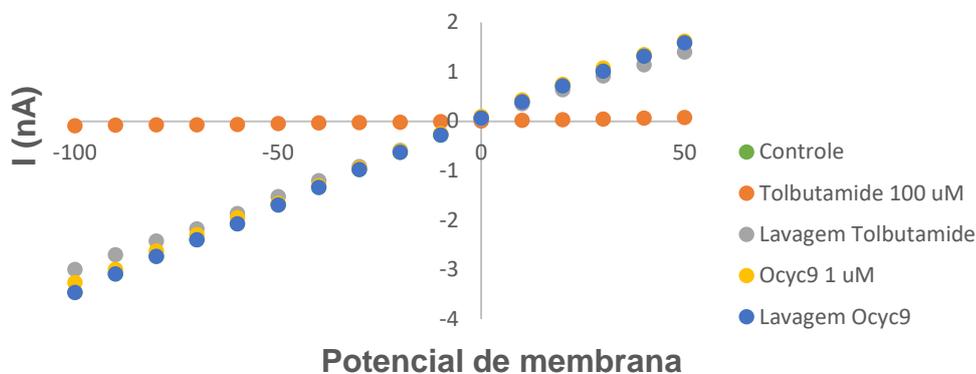
**Figura 37.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OmTx2 sobre o canal BKCa1.1 (n=3). A figura ilustra as correntes do íon K<sup>+</sup>. Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1 $\mu$ M) e na cor azul a corrente do controle positivo TEA (100mM). \*RCF= corrente persistente; \* S.E.M. = Erro padrão da média; p *value*= significância estatística (*t student*).

## 2.4. Efeito dos peptídeos sobre o canal K<sub>ATP</sub> (K<sub>IR</sub> 6.2/SUR 1)

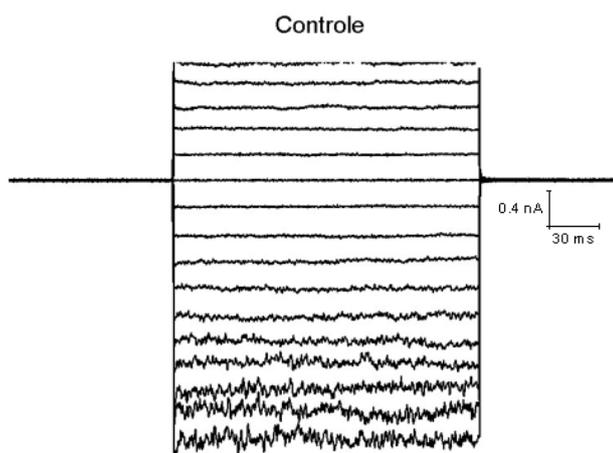
### 2.4.1. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal K<sub>ATP</sub> (K<sub>IR</sub> 6.2/SUR 1)

O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu$ M (n=3) não gera efeito sobre a corrente do canal K<sub>ATP</sub> (K<sub>IR</sub> 6.2/SUR1), observando-se que na presença da toxina não há redução das correntes positivas ou negativas do íon K<sup>+</sup> (Figura 38). Para um melhor entendimento, visualização da farmacologia característica desse tipo de canal e o efeito dos compostos testados, apresentamos os traços das correntes do íon K<sup>+</sup> nas figuras 39, 40 e 41.

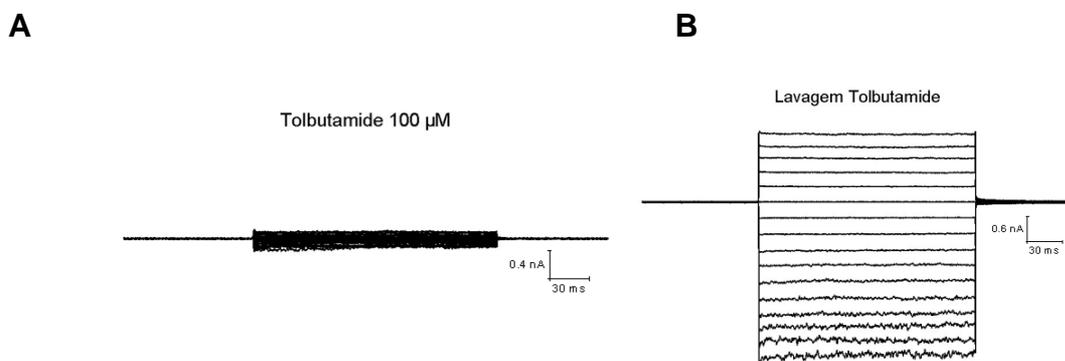
### Efeito do peptídeo OcyC9 1 $\mu$ M sobre o canal $K_{IR}$ 6.2/SUR 1



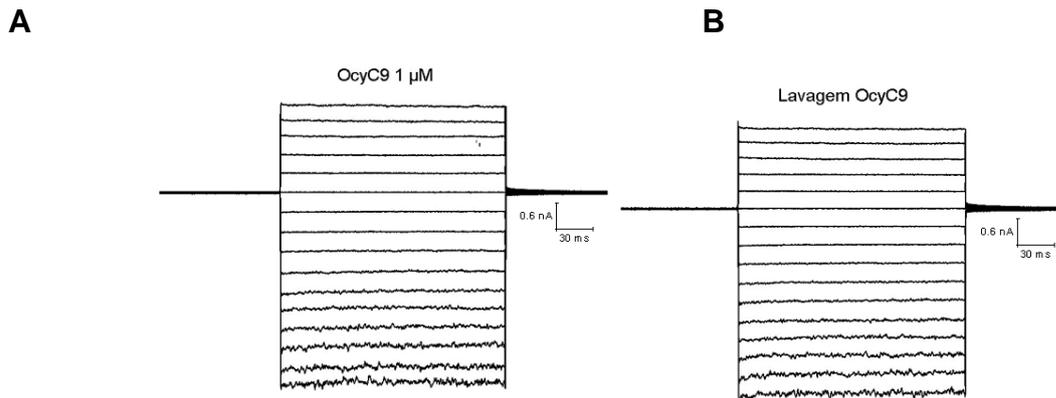
**Figura 38.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $K_{IR}$ 6.2/SUR1 (n=3). A figura ilustra o efeito dos compostos testados nas correntes do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR}$ 6.2/SUR1. Corrente controle na cor azul, corrente na presença do controle positivo Tolbutamide (100  $\mu$ M) na cor vermelha, corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu$ M) e, na cor verde e azul claro as respectivas lavagens dos compostos.



**Figura 39.** Traços das correntes controle do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR}$ 6.2/SUR1.



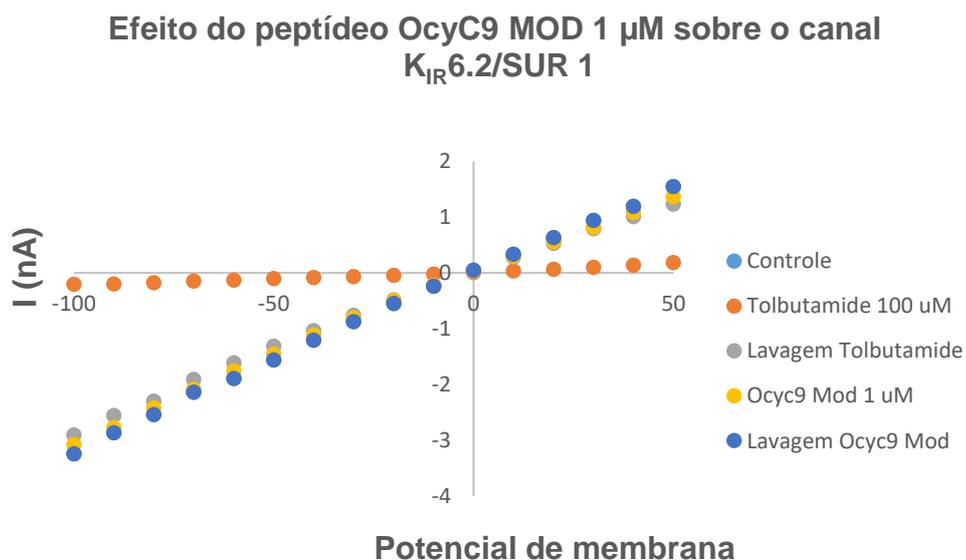
**Figura 40.** Traços das correntes do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR}$ 6.2/SUR1 (n=3). A. Na presença de Tolbutamide (100  $\mu$ M). B. Após lavagem de Tolbutamide.



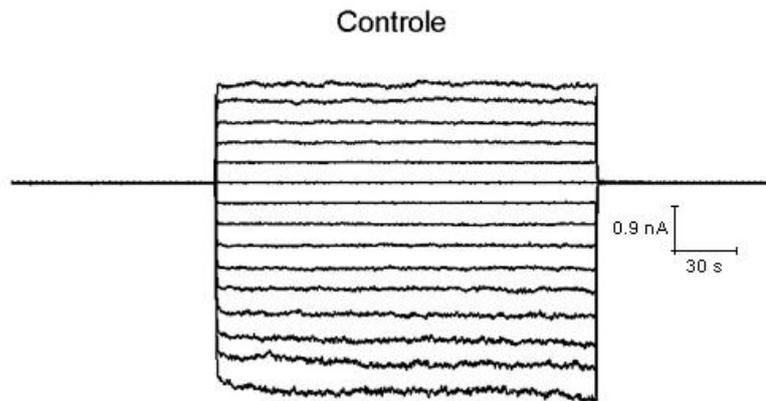
**Figura 41.** Traços das correntes do íon K<sup>+</sup> no canal K<sub>IR</sub>6.2/SUR1 (n=3). A. Na presença do peptídeo OcyC9 (1 μM). B. Após lavagem do peptídeo.

#### 2.4.2. Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K<sub>ATP</sub> (K<sub>IR</sub> 6.2/SUR 1)

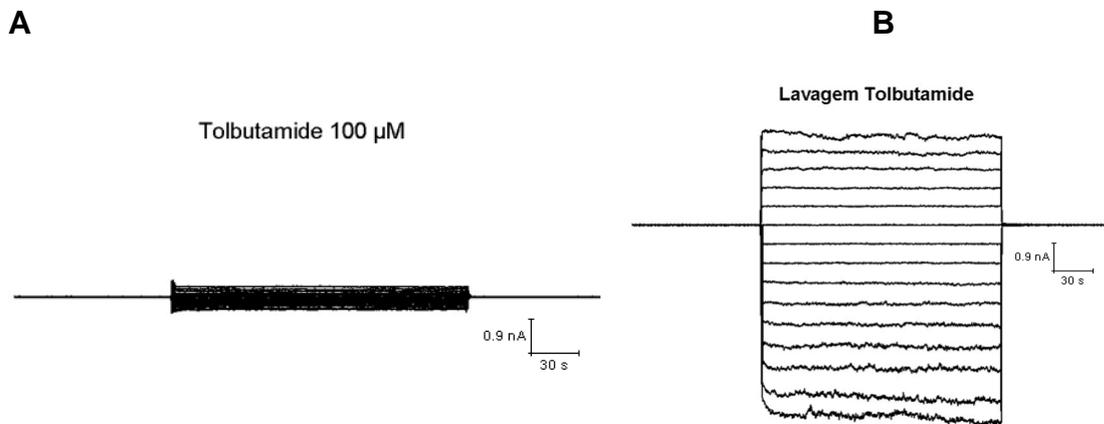
O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1 μM (n=3) não gera efeito sobre a corrente do canal K<sub>ATP</sub> (K<sub>IR</sub> 6.2/SUR1), observando-se que na presença da toxina não há redução das correntes positivas ou negativas do íon K<sup>+</sup> (Figura 42). Para um melhor entendimento, visualização da farmacologia característica desse tipo de canal e o efeito dos compostos testados, apresentamos os traços das correntes do íon K<sup>+</sup> nas figuras 43, 44 e 45.



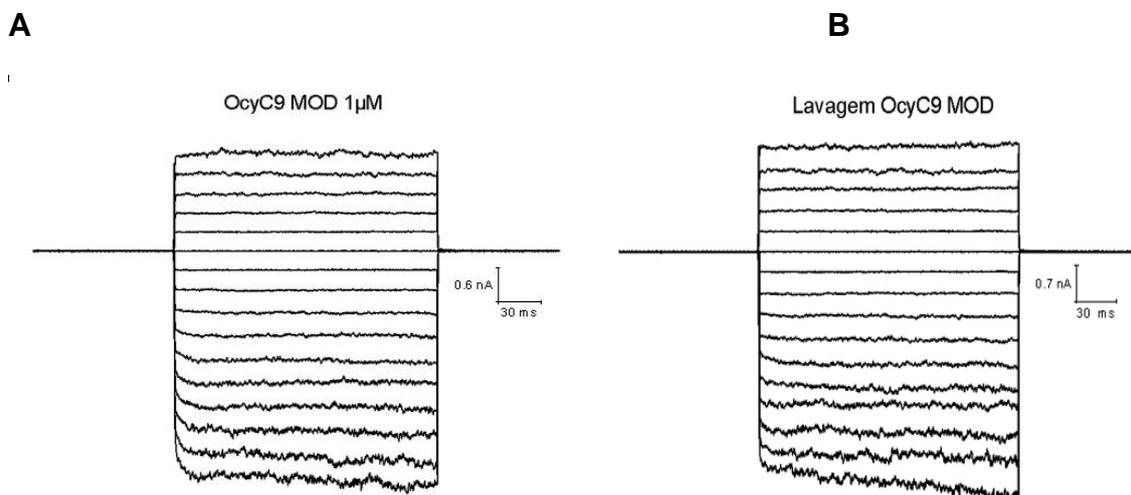
**Figura 42.** Efeito de 1 μM do peptídeo OcyC9 MOD sobre o canal K<sub>IR</sub>6.2/SUR1 (n=3). A figura ilustra o efeito dos compostos testados nas correntes do íon K<sup>+</sup> no canal K<sub>IR</sub>6.2/SUR1. Corrente controle na cor azul, corrente na presença do controle positivo Tolbutamide (100 μM) na cor vermelha, corrente na presença do peptídeo OcyC9 MOD (1 μM) e, na cor verde e azul claro as respectivas lavagens dos compostos.



**Figura 43.** Traços das correntes controle do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR6.2/SUR1}$ .



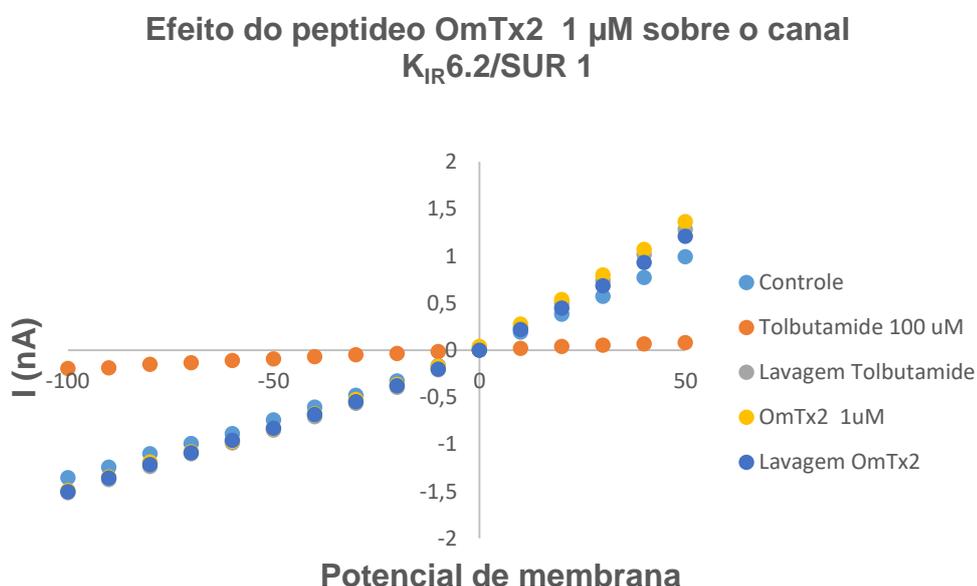
**Figura 44.** Traços das correntes do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR6.2/SUR1}$ . A. Na presença de Tolbutamide ( $100 \mu M$ ). B. Após lavagem de Tolbutamide.



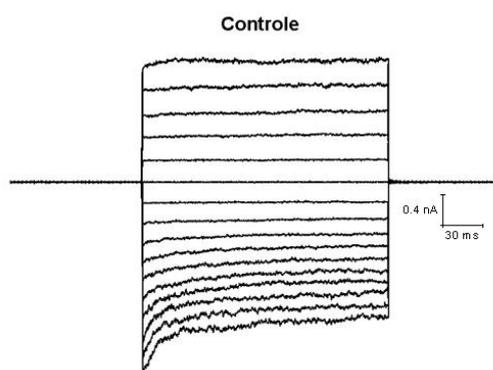
**Figura 45.** Traços das correntes do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR6.2/SUR1}$ . A. Na presença do peptídeo OcyC9 MOD ( $1 \mu M$ ). B. Após lavagem do peptídeo.

### 2.4.3. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OmTx 2 sobre o canal $\text{K}_{\text{ATP}}$ ( $\text{K}_{\text{IR}} 6.2/\text{SUR} 1$ ).

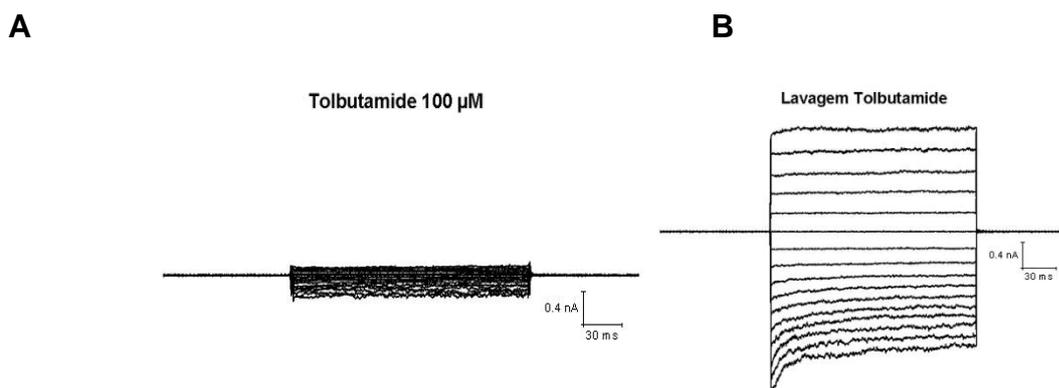
O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $n=3$ ) não gera efeito sobre a corrente do canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  ( $\text{K}_{\text{IR}} 6.2/\text{SUR}1$ ), observando-se que na presença da toxina não há redução das correntes positivas nem negativas do íon  $\text{K}^+$  (Figura 46). Para um melhor entendimento, visualização da farmacologia característica desse tipo de canal e o efeito dos compostos testados, apresentamos os traços das correntes do íon  $\text{K}^+$  nas figuras 47, 48 e 49.



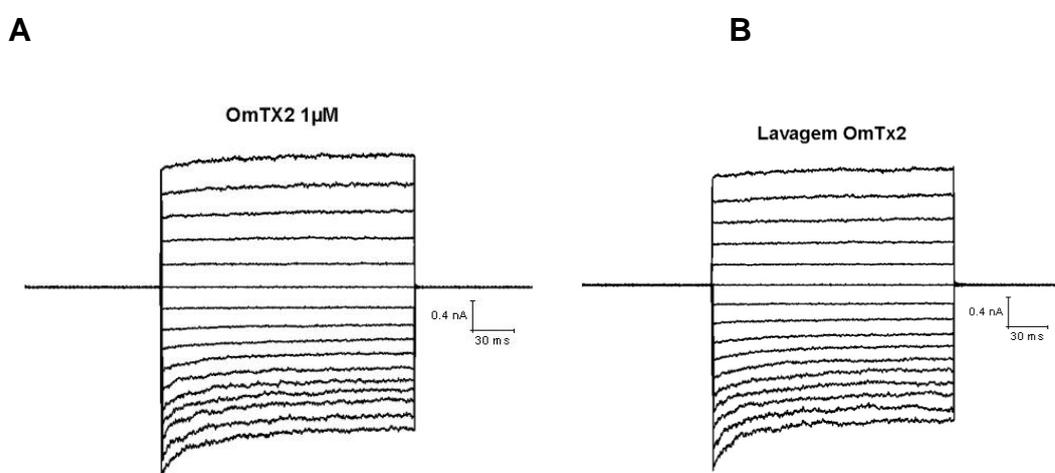
**Figura 46.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR}1$  ( $n=3$ ). A figura ilustra o efeito dos compostos testados nas correntes do íon  $\text{K}^+$  no canal  $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR}1$ . Corrente controle na cor azul, corrente na presença do controle positivo Tolbutamida (100  $\mu\text{M}$ ) na cor vermelha, corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ) e, na cor verde e azul claro as respectivas lavagens dos compostos.



**Figura 47.** Traços das correntes controle do íon  $\text{K}^+$  no canal  $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR} 1$ .



**Figura 48.** Traços das correntes do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR6.2}/SUR1$ . A. Na presença de Tolbutamide ( $100 \mu M$ ). B. Após lavagem de Tolbutamide.



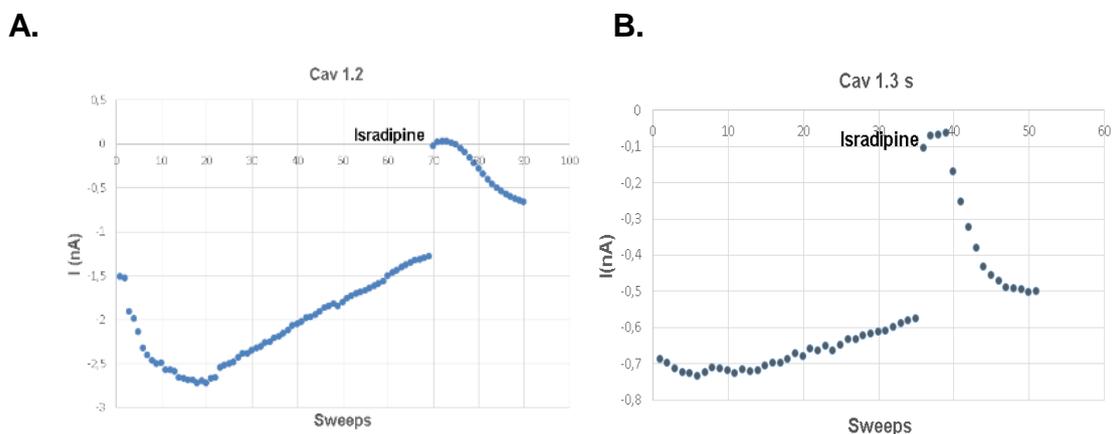
**Figura 49.** Traços das correntes do íon  $K^+$  no canal  $K_{IR6.2}/SUR1$ . A. Na presença do peptídeo OmTx2 ( $1 \mu M$ ). B. Após lavagem do peptídeo.

## 2.5. Cinética nos Canais $Ca_v1.2$ e $Ca_v1.3_s$ na presença dos controles positivos e negativos

Nos registros controle nas linhagens celulares expressando canais  $Ca_v1.2$  e  $Ca_v1.3_s$ , as correntes do íon  $Ca^{+2}$  caracterizam-se por ter um comportamento randômico, uma diminuição linear constante ao longo do tempo “*Rundown*”; portanto, para avaliar os efeitos dos peptídeos, o comportamento randômico próprio do canal tem que ser corrigido.

Na figura 50 apresenta-se como exemplo a relação  $I$  vs  $\#$  de *sweeps* controle de uma célula para cada canal avaliado, observando-se o “*Rundown*” e os efeitos dos controles positivos (Isradipine para  $Ca_v1.2$  e  $Ca_v1.3_s$ ), dessa forma pode-se diferenciar

o que de fato é o efeito do composto e assim verificar que a farmacologia do canal funciona. Pode se inferir que os canais Cav1.2 e Cav1.3s têm um comportamento randômico similar (“*Rundown*” no canal Cav1.3s é um pouco menor do que Cav1.2),



**Figura 50.** Cinética nos Canais Cav1.2 e Cav1.3s na presença dos controles positivos e negativos (n=1). A. Cinética do canal Cav1.2. B. Cinética do canal Cav1.3s.

O comportamento randômico aqui observado é próprio da linha celular estável expressando esses tipos de canais que tem sido farmacologicamente caracterizados (Ortner et al., 2017).

## 2.6. Efeito dos peptídeos sobre o Canal Cav1.2

### 2.6.1. Efeito de 1 $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal Cav1.2

O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu$ M (n=2) não gera efeito nenhum sobre a corrente do canal Cav1.2, observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo Isradipine (3  $\mu$ M) (Figura 52).

Para determinar a porcentagem de bloqueio com maior acurácia é corrigido o comportamento randômico do canal; para isso, é necessário estimar o valor da corrente controle ( $I_{pred, controle}$ ) correspondente ao mesmo tempo do valor da corrente

na presença da toxina; assumindo a tendência randômica linear na ausência da toxina, levando em consideração o número de *sweeps* decorridos a partir da aplicação da toxina. A porcentagem de bloqueio foi determinada com a seguinte fórmula:

$I_{pred, controle} =$

$$(I_{Lavagem\ toxina} - I_{controle}) / (\#SW_{lavagem\ toxina} - \#SW_{controle}) * (\#SW_{toxina} - \#SW_{controle}) + I_{controle}$$

Onde;

$I_{controle}$  = corrente do último *sweep* antes da aplicação da toxina;

$I_{toxina}$  = corrente do último *sweep* na presença da toxina;

$I_{Lavagem\ toxina}$  = corrente do último *sweep* da lavagem da toxina;

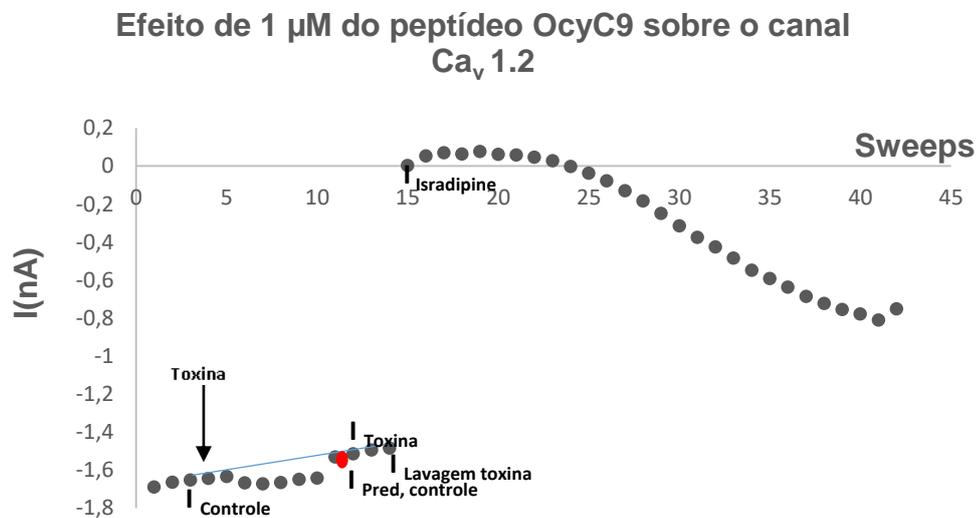
$I_{pred, controle}$  = amplitude da corrente, assumindo o linear “*Rundown*” entre  $I_{controle}$  e

$I_{Lavagem\ toxina}$ ;

#  $sw_{controle}$  = Número do *sweep* no qual a  $I_{controle}$  foi medida;

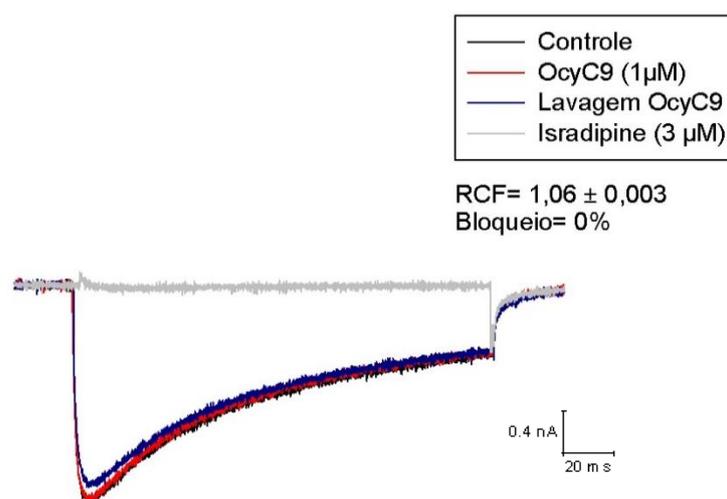
#  $sw_{toxina}$  = Número do *sweep* no qual a  $I_{toxina}$  foi medida;

#  $sw_{lavagem\ toxina}$  = Número do *sweep* no qual a  $I_{lavagem\ toxina}$  foi medida;



**Figura 51.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $Ca_v 1.2$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $Ca_v 1.2$  na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu$ M) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu$ M).  $I_{controle}$  =  $I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{toxina}$  =  $I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{Lavagem\ toxina}$  =  $I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{pred, controle}$  = Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{controle}$  e  $I_{Lavagem\ toxina}$ .

Portanto, foi determinado que o peptídeo OcyC9 na concentração avaliada não inibe a corrente (RCF=1,06), sendo que a corrente controle e a corrente na presença da toxina (Figura 53) se sobrepõem, e é mantida após lavagem da toxina. O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal  $\text{Ca}_v1.2$  ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 53).



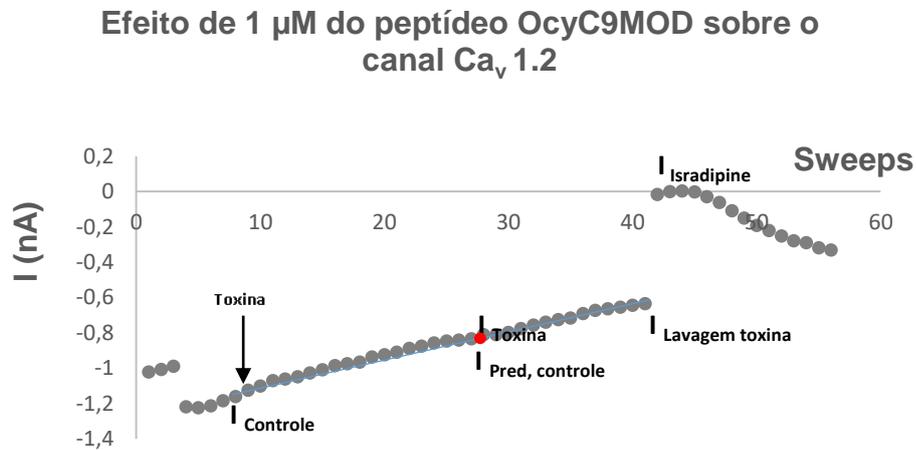
**Figura 52.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.2$  (n=2). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média

### 2.6.2. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal $\text{Ca}_v1.2$

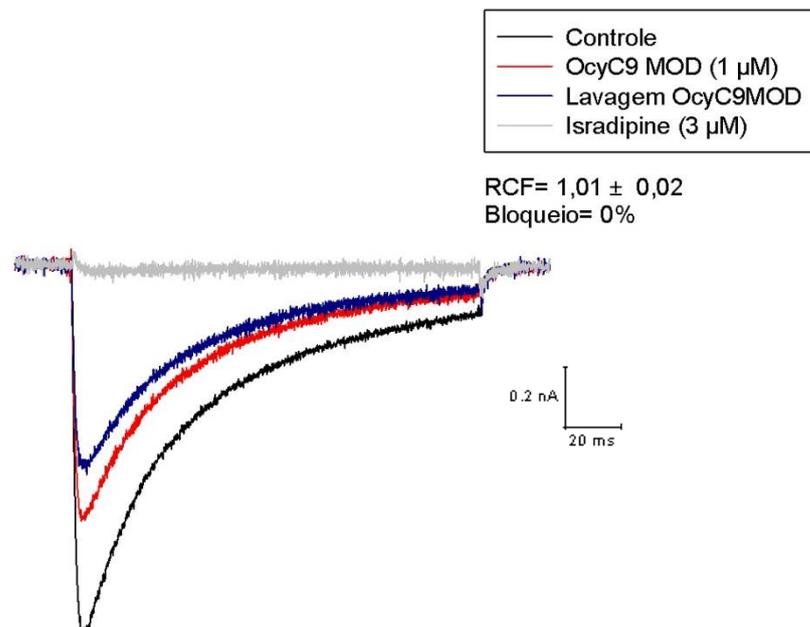
O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (n= 2) não gera efeito sobre a corrente do canal  $\text{Ca}_v1.2$ , observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que se acontece na presença do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ) (Figura 54). Portanto, foi determinado que o peptídeo OcyC9MOD na concentração avaliada não inibe a corrente (RCF=1,01) ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 55).

Na figura 55, pode-se observar que sob efeito do peptídeo OcyC9MOD, mesmo gerando 0% de bloqueio, os traços das correntes controle e da toxina não coincidem. Isso é reflexo do comportamento randômico do canal ao longo do tempo (Figura 54),

o que também é visualizado no traço correspondente à corrente após lavagem da toxina. Daí a importância de prever a corrente controle ( $I_{pred, controle}$ ) para a definir o efeito da toxina.



**Figura 53.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $Ca_v1.2$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $Ca_v1.2$  na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu$ M) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu$ M).  $I_{controle}$ = I último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{toxina}$ = I último *sweep* na presença da toxina.  $I_{lavagem\ toxina}$ = I último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{pred, controle}$ = amplitude da corrente, assumindo o linear “rundown” entre  $I_{controle}$  e  $I_{lavagem\ toxina}$ .

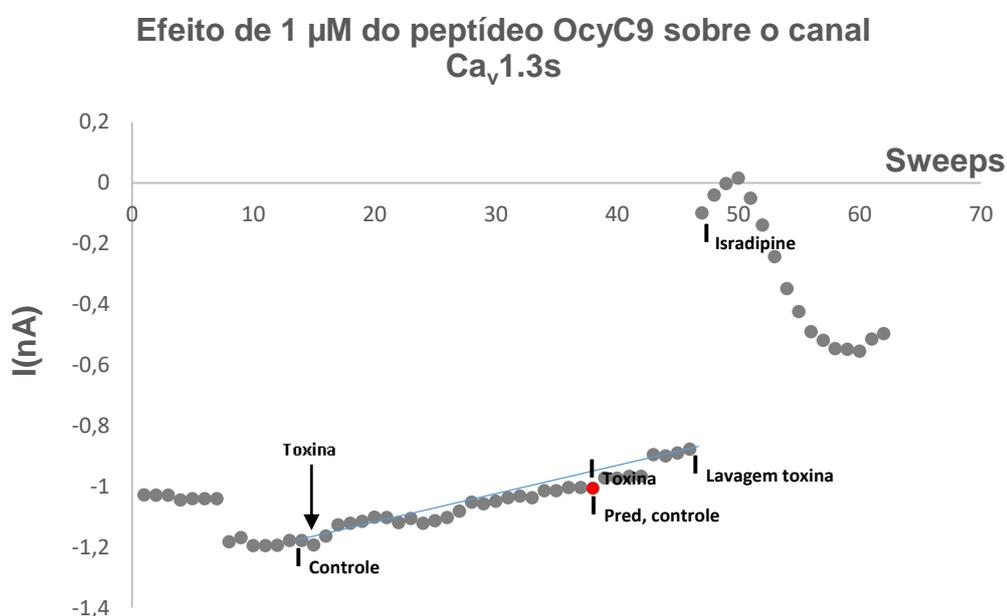


**Figura 54.** Efeito de 1  $\mu$ M do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $Ca_v1.2$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $Ca^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu$ M), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu$ M). \*RCF= corrente persistente; \* SEM: Erro padrão da média.

## 2.7. Efeito dos peptídeos sobre o canal $Ca_v1.3$

### 2.7.1. Efeito de $1 \mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9 sobre o canal $Ca_v1.3_s$

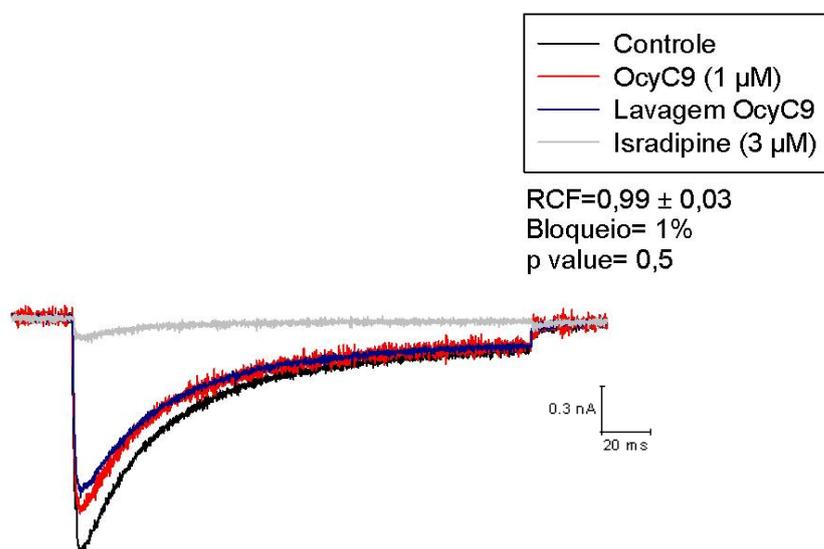
O peptídeo OcyC9 na concentração de  $1 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ) não gera efeito sobre a corrente do canal  $Ca_v1.3_s$ , observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que acontece na presença do controle positivo Isradipine ( $3 \mu\text{M}$ ) (Figura 58).



**Figura 55.** Efeito de  $1 \mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $Ca_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou "Time-course" do canal  $Ca_v1.3_s$  na presença do peptídeo OcyC9 ( $1 \mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine ( $3 \mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}}$  =  $I$  último sweep antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{Toxina}}$  =  $I$  último sweep na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}}$  =  $I$  último sweep da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}}$  = Amplitude da corrente, assumindo o linear "rundown" entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ .

No entanto, nas análises dos traços do controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OcyC9 na concentração avaliada parece inibir a corrente em 1% (RCF=0,99) com erro padrão de 0,03, porém não significativo estatisticamente em  $p$ : 0,5 (Figura 59). Apesar dos traços da corrente na presença da toxina e após sua lavagem parecerem similares, é perceptível uma tendência do efeito de " Rundown" no

canal (Figura 58). O peptídeo OcyC9 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 59).



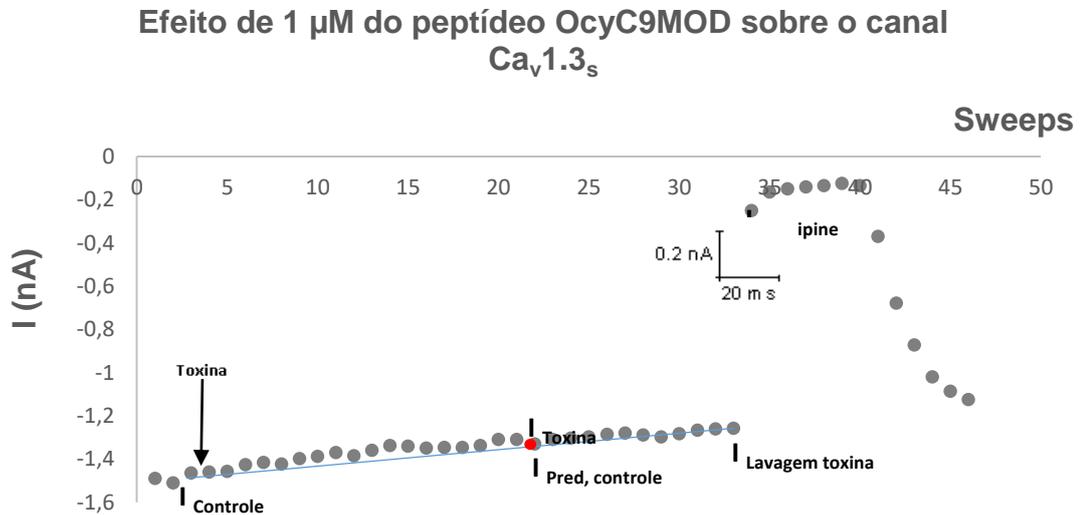
**Figura 56.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  (n=2). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9 (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e, na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média; p value= significância estatística (*t student*).

### 2.7.2. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal $\text{Ca}_v1.3_s$

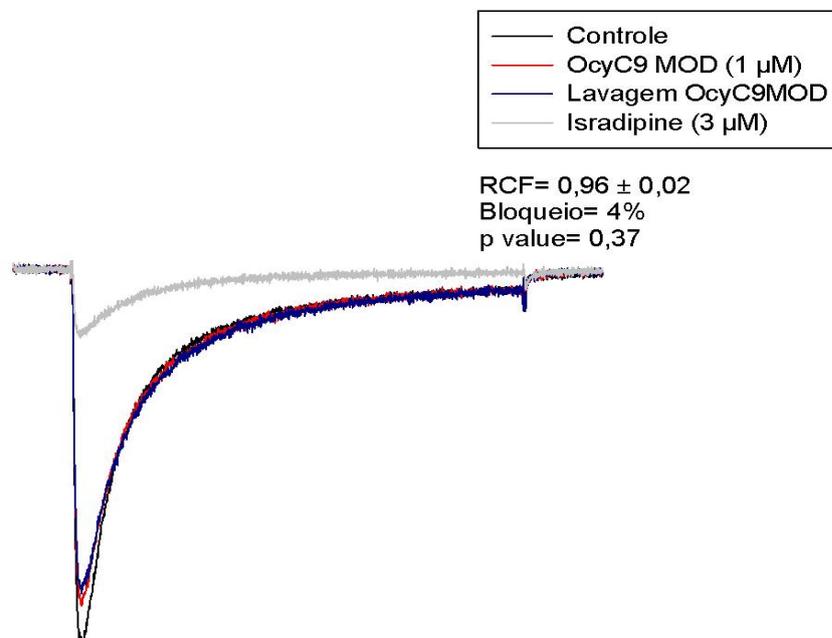
O peptídeo OcyC9MOD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (n=2) não gerou efeito sobre a corrente do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$ , observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que se aconteceu na presença do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ) (Figura 60).

No entanto, nas análises dos traços do controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OcyC9MOD na concentração avaliada parece inibir a corrente em 4% (RCF=0,96) com erro padrão de 0,02, porém não significativo estatisticamente em  $p=0,37$  (Figura 61). Apesar dos traços de corrente controle e na presença da toxina serem um pouco diferentes, após da lavagem da toxina é perceptível uma tendência do efeito de “*Rundown*” no canal (Figura 60). O peptídeo OcyC9MOD na concentração

de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ou alterou a cinética de ativação e inativação do canal (Figura 61).



**Figura 57.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}}$ =  $I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{toxina}}$ =  $I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ =  $I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}}$ = Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ .

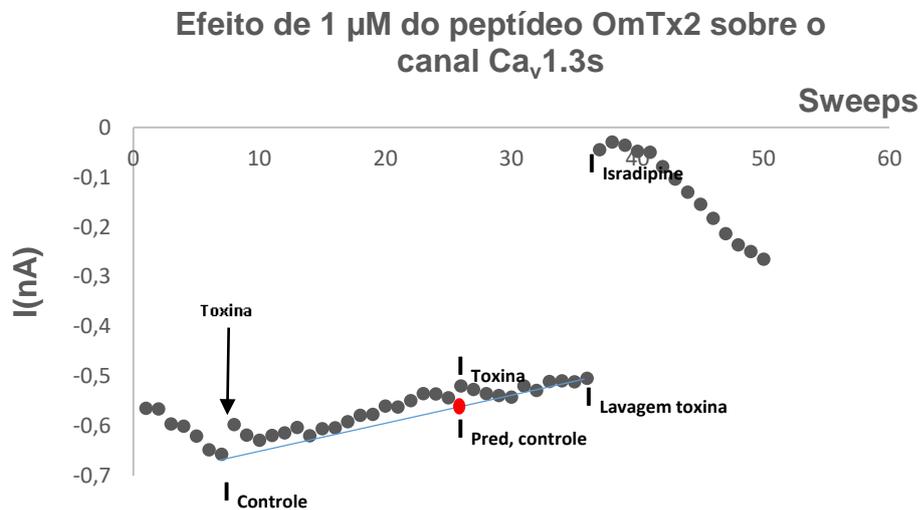


**Figura 58.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OcyC9MOD sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OcyC9MOD (1  $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média; p value = significância estatística (*t student*).

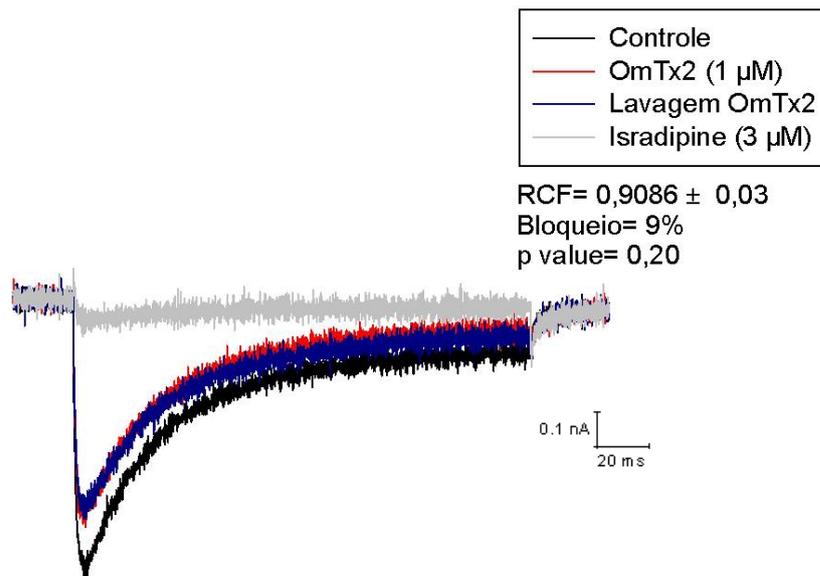
### 2.7.3. Efeito de 1 $\mu\text{M}$ do peptídeo OmTx2 sobre o canal $\text{Ca}_v1.3_s$

O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $n=2$ ) não gerou efeito sobre a corrente do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$ , observando-se que na presença da toxina não há mudanças significativas na cinética do canal; o que acontece na presença do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ) (Figura 62).

No entanto, nas análises dos traços do controle vs toxina, pode-se observar que o peptídeo OmTx2 na concentração avaliada parece inibir a corrente em 9% (RCF=0,9086) com erro padrão de 0,03, porém não significativo estatisticamente em  $p=0,20$  (Figura 63). Apesar dos traços de corrente do controle e na presença da toxina serem um pouco diferentes, após da lavagem da toxina a corrente permanece constante é perceptível uma tendência do efeito de “*Rundown*” no canal (Figura 62). O peptídeo OmTx2 na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não gerou efeito bloqueador sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ou alterou as cinéticas de ativação e inativação do canal (Figura 63).



**Figura 59.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra a cinética ou “*Time-course*” do canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  na presença do peptídeo OmTx2 (1  $\mu\text{M}$ ) e do controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ).  $I_{\text{controle}}$  =  $I$  último *sweep* antes da aplicação da toxina.  $I_{\text{Toxina}}$  =  $I$  último *sweep* na presença da toxina.  $I_{\text{Lavagem toxina}}$  =  $I$  último *sweep* da lavagem da toxina.  $I_{\text{pred, controle}}$  = Amplitude da corrente, assumindo o linear “*rundown*” entre  $I_{\text{controle}}$  e  $I_{\text{Lavagem toxina}}$ .



**Figura 60.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  do peptídeo OmTx2 sobre o canal  $\text{Ca}_v1.3_s$  ( $n=2$ ). A figura ilustra as correntes do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Na cor preta a corrente controle, na cor vermelha a corrente na presença do peptídeo OmTx2 (1 $\mu\text{M}$ ), na cor azul a corrente após lavagem da toxina e, na cor cinza o controle positivo Isradipine (3  $\mu\text{M}$ ). \*RCF= corrente persistente; \* SEM= Erro padrão da média; p *value* = significância estatística (*t student*).

## VI. DISCUSSÃO

Silva e colaboradores (2009) reportaram pela primeira vez o peptídeo OcyC9 cuja sequência de aminoácidos foi deduzida da biblioteca de cDNA construída a partir do RNA poli (A)<sup>+</sup> obtido da glândula da peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (Silva et al., 2009). Portanto, o desenvolvimento desse trabalho traz a purificação, identificação e caracterização eletrofisiológica do peptídeo na procura do seu alvo molecular. Nessa ordem de idéias, comprovou-se que o peptídeo OcyC9 está presente na peçonha do escorpião *O. cayaporum* (Figura 16) com massa molecular monoisotópica de [M + H]<sup>+</sup>: 2545,03 Da (Figura 18), constituído por 24 resíduos de aminoácidos, duas ligações dissulfeto e 100% da sequência foi determinada (Figura 20).

Bougis e colaboradores (1989) foram os primeiros a estudar a presença de modificações pós-traducionais das toxinas do escorpião *Androctonus australis*, analisando as sequências dos seus precursores e suas respectivas sequências maduras (Bougis et al., 1989). Além disso, sabe-se que a maioria das toxinas isoladas de escorpião caracterizam-se por ter modificações pós-traducionais, principalmente amidação no extremidade C-terminal, o que tem sido descrito como uma modificação importante para definir o potencial tóxico da toxina e, acredita-se que a carga adicional dada pela presença do grupo amino na sequência favorece a atividade biológica das toxinas (Benkhadir et al., 2004; Legros et al., 2005; Rodriguez de la Vega and Possani, 2005). Destaca-se que a presença da amidação do extremidade C-terminal pode ser importante na atividade para algumas neurotoxinas, mas que para outras toxinas não é relevante (Estrada et al., 2011; Merkler, 1994); portanto, era necessário analisar e conferir se o peptídeo OcyC9 é amidado ou não.

Baseados na literatura tem-se estabelecido que para toxinas de escorpião a presença de 3 resíduos de aminoácidos, principalmente GKK, localizados no final da extremidade C-terminal da sequência precursora, o que é conhecido como sinal de amidação (Coelho et al., 2014), sugere que a toxina seja amidada. O precursor da OcyC9 na sua extremidade C-terminal não possui esse sinal de amidação (Figura 15); portanto, pode-se inferir, *a priori*, que o peptídeo não é amidado. Este tipo de

modificação pós-traducional pode ser identificado usando diferentes técnicas como por exemplo esterificação de Fischer (Powell et al., 1995). Infelizmente, o uso dessas técnicas requer de uma quantidade suficiente de material para sua avaliação e, devido à pouca disponibilidade do peptídeo natural não foi possível usá-la. Nesse cenário, as análises dos espectros de massa obtidos na fragmentação do peptídeo foram usadas para identificar a presença ou não de amidação.

Baseados na natureza das reações químicas para esse tipo de compostos, a diferença de 18 Da entre a massa do íon molecular e a perda de uma molécula de água do primeiro resíduo de aminoácido do C-terminal "E" é um indicativo da presença do grupo carboxílico; pelo contrário, se apresentasse uma diferença de 17 Da seria o indicativo da presença do grupo amino. Baseado nesse parâmetro de análise, com uma diferença de 18,02 Da (Figura 21) e, a ausência do sinal de amidação na sequência precursora, além da concordância entre as massas teórica e experimental monoisotópica no estado reduzido de  $[M+H]^+=2549,09\text{Da}$  e  $[M+H]^+= 2.549,03$ , respectivamente, determinou-se que o peptídeo OcyC9 não é amidado naturalmente.

Como foi sugerido por Silva e colaboradores (Silva et al., 2009), o peptídeo OcyC9 apresenta uma alta similaridade com as chamadas Omtoxinas isoladas da peçonha do escorpião *O. madagascariensis*; membros da subfamília das  $\kappa$ -KTx; portanto, a sequência de aminoácidos do peptídeo OcyC9 foi classificado como  $\kappa$ -KTx 2.6. Atualmente, tem-se descritas 18 toxinas agrupadas em diferentes grupos levando em conta sua similaridade na suas sequências, as quais têm sido identificadas tanto por análise de transcrito como de proteoma (Camargos et al., 2011; Chagot et al., 2005; Jungo et al., 2012; Kuzmenkov et al., 2016; Ma et al., 2010; Schwartz et al., 2008; Silva et al., 2009). Mesmo assim, foram realizadas as análises de similaridade usando Blast e alinhamento usando Clustal ômega versão 2.1 para atualizar as análises sobre a similaridade do peptídeo OcyC9 com outras toxinas e, assim, tentar estabelecer o possível alvo molecular do mesmo.

Realizado o alinhamento verificou-se que o peptídeo de estudo apresenta maior similaridade com as Omtoxinas (Figura 6), principalmente OmTx1, OmTx2 e OmTx4 com 65,22 % (Figura 82).

Toxina		% (I)
OcyC9	FPPC <b>V</b> EV <b>C</b> VQHTGN <b>V</b> KE <b>C</b> EA <b>A</b> CGE-----	100
OcyC8	YD <b>A</b> CV <b>N</b> AC <b>L</b> EH <b>H</b> PN <b>V</b> RE <b>C</b> EE <b>A</b> CK <b>N</b> P <b>V</b> PP	45,83
OmTx1	-D <b>P</b> CV <b>E</b> V <b>C</b> L <b>Q</b> QHGN <b>V</b> KE <b>C</b> EE <b>A</b> CK <b>H</b> P <b>V</b> E-	65,22
OmTx2	-D <b>P</b> CV <b>E</b> V <b>C</b> L <b>Q</b> QHGN <b>V</b> KE <b>C</b> EE <b>A</b> CK <b>H</b> P <b>V</b> E <b>Y</b>	65,22
OmTx3	N <b>D</b> PC <b>E</b> EV <b>C</b> L <b>Q</b> HTGN <b>V</b> K <b>A</b> CE <b>E</b> AA <b>C</b> Q-----	62,22
OmTx4	-D <b>P</b> CV <b>E</b> V <b>C</b> L <b>Q</b> QHGN <b>V</b> KE <b>C</b> EE <b>A</b> CK <b>H</b> P-----	65,22
	* :.,*::: **: ** *,. .	

**Figura 61.** Alinhamento do peptídeo OcyC9. A figura ilustra a porcentagem de similaridade da toxina OcyC9 com as Omtoxinas da subfamília  $\kappa$ -KTx. "\*" resíduos de aminoácidos idênticos, ":" resíduos de aminoácidos conservativos e "." resíduos de aminoácidos semiconservativos.

A presença de resíduos de aminoácidos específicos nas sequências das toxinas isoladas da peçonha de escorpiões que favorecem sua interação com o canal de  $K^+$  tem sido amplamente descrita. Estudos sugerem a presença da díade funcional (Lys, Phe ou Tyr) como uma característica importante para que a toxina consiga interagir com os  $K_v$ , principalmente (Dauplais et al., 1997). Toxinas da subfamília das  $\kappa$ -KTx como as Omtoxinas (OmTx1, OmTx2 e OmTx4) (*O. madagascarienses*) caracterizam-se por terem na sua estrutura a presença da díade funcional (Y<sub>4</sub>-K<sub>22</sub>) (Chagot et al., 2005).

Mesmo assim, alguns estudos têm mostrado que a presença da díade funcional não é um pré-requisito para a ligação da toxina aos canais  $K_v$  (Martínez et al., 1998); nesse caso, outros resíduos podem atuar para formar "interações" com estes canais (Batista et al., 2002; Mouhat et al., 2004; Xu et al., 2003). É o caso da  $\kappa$ -KTx 2.5 de *O. cayaporum* que não possui a díade funcional e, na concentração de 16  $\mu$ M bloqueou os subtipos de canal  $K_v$ 1.4 (20%) e  $K_v$ 1.1 (50%) (Camargos et al., 2011). Toxinas de moluscos marinhos do gênero *Conus* que apresentam como arranjo estrutural Csd/ $\alpha$ , possuem atividade bloqueadora nos canais de  $K^+$ , mesmo sem possuírem a díade funcional (Möller et al., 2005).

Com base nos dados da literatura e no alinhamento aqui obtido, podemos inferir que a toxina OcyC9 poderia induzir os mesmos efeitos biológicos que aqueles induzidos pela toxina OmTx2, que sugere ter a capacidade de modular a liberação de insulina das células  $\beta$  pancreáticas, além de bloquear alguns subtipos do canal  $K_v$  (Chagot et al., 2005). OmTx 1, 2 e 3 foram avaliadas eletrofisiologicamente sobre os canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$  e  $K_v1.3$  expressos em oócitos de *Xenopus laevis*, com capacidade de interagir e bloquear esses canais na concentração de 500  $\mu$ M, destacando-se que, nessa concentração, o bloqueio gerado pela OmTx2 (8%  $K_v1.1$ , 10 %  $K_v1.2$  e 36%  $K_v1.3$ ) e OmTx 1 (17%  $K_v1.1$ , 12%  $K_v1.2$  e 24%  $K_v1.3$ ) foi pequeno; enquanto que OmTx3 gerou um bloqueio maior, principalmente no canal  $K_v1.3$  (33 %  $K_v1.1$  , 8 %  $K_v1.2$  e 70%  $K_v1.3$ ) (Chagot et al., 2005). OcyC9 quem tem similaridade com as OmTxs, poderia se supor que o peptídeo de estudo possa ter também atividade nesses subtipos de canal.

Os peptídeos sintéticos OcyC9 nativo e seu análogo foram avaliados nas células HEK expressando canais de potássio do tipo  $K_v1.3$  mamífero, encontrando-se que o peptídeo OcyC9 a 500  $\mu$ M bloqueia em 58,5% (Figura 23) e seu análogo OcyC9MOD a 250  $\mu$ M bloqueia em 48,18 % (Figura 25) da corrente do íon potássio no  $K_v1.3$ . Em termos de atividade bloqueadora, os resultados aqui obtidos são comparáveis com os resultados obtidos por Chagot e colaboradores em 2005 para a toxina OmTx2 (Chagot et al., 2005). Porém, pode-se inferir que o peptídeo OcyC9 gera um efeito bloqueador maior (58,5%) que o da toxina OmTx2 (36%) na mesma concentração avaliada; o que poderia significar que a ausência da díade funcional na toxina OcyC9 não é importante para interagir com os  $K_v$ , nesse caso  $K_v1.3$ . Como foi observado por Camargos e colaboradores em 2011, com o peptídeo  $\kappa$ -KTx 2.5 do escorpião *O. cayaporum* que não possui a díade funcional e na concentração de 16  $\mu$ M bloqueia 50% as correntes no canal  $K_v1.1$  (Camargos et al., 2011).

Mesmo assim, com 48,18% de bloqueio gerado pelo peptídeo análogo OcyC9 MOD (díade funcional incluída) na concentração de 250  $\mu$ M, poderia se inferir que a presença da díade funcional é importante ou ajuda de alguma forma ao reconhecimento e a interação com o canal, devido à porcentagem de bloqueio gerado com a metade da concentração usada com o peptídeo nativo.

É importante ressaltar que o peptídeo análogo foi avaliado a 500  $\mu\text{M}$ , mas não foi possível registrar o efeito devido a que no momento de colocar essa concentração no banho, imediatamente perdia-se a célula. Portanto, pode-se inferir que o bloqueio gerado no  $K_v1.3$  pelos peptídeos aqui avaliados, a presença ou não da díade funcional não é muito relevante para a interação com o canal ou, o mecanismo de interação dessas toxinas com o canal pode ser outro.

Pensar em um mecanismo de interação diferente, pode-se inferir pela possível alteração da cinética da ativação do canal  $K_v1.3$  na presença dos peptídeos OcyC9 e OcyC9MOD, já que é visível uma alteração no padrão normal do traço da corrente (Figuras 23 e 25). Segundo o parâmetro de análise TAU, pode-se observar que na presença da toxina há um deslocamento do Tau comparado com os valores Tau controle (Tabelas 2 e 3), o que poderia sugerir que as toxinas estariam modulando a cinética do canal  $K_v1.3$ , possivelmente retardando a abertura do canal.

Esse comportamento modulador observado é característico dos efeitos induzidos pelas toxinas de aranhas, que são de natureza moduladora, ressaltando que principalmente as toxinas modificadoras do *gating* do canal têm sido isoladas das peçonhas de aranhas, quem alteram a estabilidade relativa dos estados fechados, aberto ou inativados (Swartz, 2007). Toxinas de escorpião que modificam o *gating* do canal têm sido descritas para o canal de sódio; por exemplo, as  $\alpha$  e  $\beta$  toxinas presentes na peçonha do escorpião *Centruroides sculpturatus*, as primeiras toxinas modificadoras do *gating* descritas (Cahalan, 1975; Koppenhöfer and Schmidt, 1968a, b; Wang and Strichartz, 1983); porém, toxinas do tipo inibidoras têm sido descritos para os canais  $K_v$  e  $Ca_v$  (French and Zamponi, 2005; Swartz, 2007).

Hanatoxin, peptídeo isolado da peçonha da aranha *Grammostola spatulata* é, até o momento, o exemplo melhor descrito de peptídeo modificador do *gating* do canal que interage com o sensor da voltagem, originalmente descrito por induzir uma inibição fraca nos  $K_v$ s e um bloqueio forte nos canais  $K_v2.1$  e  $K_v4.2$  (Swartz and MacKinnon, 1995). Estudos de interação da toxina com o canal  $K_v2.1$  mostraram que a toxina interage com o domínio S1-S4, e inibe a abertura do canal, priorizando a estabilização do estado fechado. Ao contrário, foi observado no canal *Shaker*  $K_v$ , onde

a toxina muda o *shift* da relação condutância-voltagem para potenciais de membrana mais negativos, fazendo com que a abertura do canal com a despolarização da membrana seja mais fácil (Milescu et al., 2013).

Uma característica intrigante da interação da hanatoxin com o canal *Shaker* K<sub>v</sub> é a pronunciada fase lenta da abertura do canal que é observada na presença da toxina, o que pode ser comparável com os efeitos induzidos no canal K<sub>v</sub>1.3 na presença dos peptídeos OcyC9 e OcyC9MOD (Figuras 23 e 25). No caso da hanatoxin para esclarecer esse particular comportamento, análises específicas na cinética de ativação e inativação do canal foram realizadas, encontrando-se que ainda seja perceptível a leve abertura do canal, o efeito real está na pronunciada fase lenta da inativação do canal na presença da hanatoxin (Milescu et al., 2013); permitindo concluir que essa toxina interage com a alfa hélice S3b no domínio do sensor da voltagem S1-S4 no canal *Shaker* K<sub>v</sub>, priorizando a estabilidade do estado aberto do canal (Milescu et al., 2013).

Pode-se pensar que a alteração da cinética de ativação do canal K<sub>v</sub>1.3 na presença dos peptídeos aqui avaliados poderiam ser comparáveis aos induzidos com a hanatoxin no canal *Shaker* K<sub>v</sub> (pronunciada fase lenta da abertura do canal); portanto, o mecanismo de interação dos peptídeos OcyC9, OcyC9 MOD e hanatoxin poderiam ser similares. Mas para conferir essa premissa, seria necessário aprofundar na avaliação das cinéticas de ativação e inativação do canal na presença e ausência da toxina, usando protocolos eletrofisiológicos específicos e acurados nesse sentido. Desta forma, pode-se inferir simplesmente que a cinética do canal K<sub>v</sub>1.3 na presença dos peptídeos de estudo se vê drasticamente alterada.

Até o momento, não tem se reportado toxinas de escorpião com atividade moduladora para os canais de potássio; portanto sugerir que os resultados aqui encontrados correspondem a um novo mecanismo de interação é especulativo. Na procura de possíveis respostas a esse inesperado comportamento das k-KTx que tem sido classificadas como bloqueadoras dos K<sub>v</sub>, é importante analisar as características das membranas celulares das células de mamífero e dos oócitos de *Xenopus laevis*.

Tem-se descrito que o uso de oócitos nos ensaios eletrofisiológicos possuem algumas desvantagens, como por exemplo que a maioria dos agentes farmacológicos avaliados nos canais iônicos expressos nos oócitos são menos potentes, quando comparados com os efeitos nos canais iônicos expressos nas células de mamífero, ou nas células nativas; essa diferença na potência dos fármacos é em decorrência ao grande número de invaginações, células foliculares e a membrana vitelina que circunda a superfície do oócito, que fazem com que as células de mamífero sejam mais sensíveis (Goldin, 2006).

Portanto, pode-se analisar o fato de que concentrações na ordem de 500  $\mu\text{M}$  sobre células de mamífero é uma quantidade o suficientemente importante para mudar a distribuição química ou física na membrana celular, que faça com que aquilo que se observa como alteração na cinética da ativação do canal seja um reflexo de alguma alteração física na membrana, que nos oócitos de *Xenopus laevis* pelas características da sua membrana celular seja imperceptível. No entanto, embora a concentração absoluta do fármaco que é necessária para o bloqueio do canal nos oócitos é muito maior da concentração requerida nas células nativas, os efeitos do fármaco (mecanismo de ação) geralmente pode se comparar nos tecidos nativos (Goldin, 2006).

Levando em consideração o sugerido anteriormente, é possível que a alteração observada da cinética do canal se manteria após lavagem da toxina; porém, observa-se que há uma recuperação total da cinética normal do canal  $K_v1.3$  (Figuras 23 e 25).

Os peptídeos OcyC9 e OmTx2 são parte da família de toxinas de escorpião nomeadas  $\kappa$ -KTx, essa família de toxinas cuja atividade biológica tem sido avaliada sobre diversos canais de  $K^+$ , caracteriza-se por ter um efeito bloqueador fraco; assim, esses tipos de toxinas são conhecidas como inibidoras fracas de canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ ) (Camargos et al., 2011; Chagot et al., 2005; Nirthanan et al., 2005; Saucedo et al., 2012; Vandendriessche et al., 2012). Como por exemplo, a toxina  $\kappa$ -Hefutoxin 1 com  $K_d$  de 40  $\mu\text{M}$  inibe os canais  $K_v1.2$  e  $K_v1.3$  (Srinivasan Kellathur et al., 2002); mas não gerou atividade inibitória nos canais  $K_v1.1$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.5$ , Shaker IR,  $K_v2.1$ ,  $K_v3.1$ ,  $K_v4.2$  e  $K_v11.1$  (hERG) (Peigneur et al., 2013), e uma

vez que testada no canal Kv10.1 encontrou-se que a toxina gera um bloqueio total da corrente a IC<sub>50</sub> 26 µM (Moreels et al., 2016). Baseados nesses resultados, sugere-se que esses tipos de canais possivelmente não sejam o alvo molecular principal deste peptídeo (Peigneur et al., 2013; Srinivasan Kellathur et al., 2002).

Até o momento, os efeitos bloqueadores induzidos pelas κ-KTx foram avaliados ou observados nos canais do tipo Kv, e as concentrações usadas estão na ordem de µM, sugerindo que as κ-KTx, incluindo a OcyC9, possam atuar em outros subtipos de canais iônicos. Nessa ordem de ideias, Camargos e colaboradores (2011), além de avaliar a κ-KTx 2.5 (OcyC8) isolada do escorpião *O. cayaporum* sobre diferentes subtipos de canal de K<sup>+</sup> (rKv1.1, rKv1.2, hKv1.3, rKv1.4, rKv1.5, rKv1.6, Shaker IR, rKv2.1, rKv3.1, rKv4.2, rKv4.3, hERG) mostrando mais uma vez o fraco bloqueio das κ-KTx somente nos canais hKv1.1 e hKv1.4, também testaram a atividade da toxina sobre os subtipos de canal de Na<sup>+</sup> (Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.8 e DmNav1), não observando qualquer efeito na concentração de 2,5 mM (Camargos et al., 2011).

Portanto, avaliar a atividade biológica sobre outras famílias de canais e/ou subtipos de canal de K<sup>+</sup> é necessário, e assim tentar definir seu possível alvo molecular. Nesse aspecto, uma vez verificado o efeito fraco dos peptídeos no canal Kv1.3, definir os outros tipos de canais iônicos na caracterização eletrofisiológica dos peptídeos de estudo foi baseada em função da capacidade do peptídeo OmTx2 em modular a secreção de insulina, sugerida por Chagot e colaboradores (2005); assumindo que se a OcyC9 leva ao desenvolvimento dessa resposta biológica também, então ela poderia interagir com os canais responsáveis pela atividade elétrica na célula pancreática. Portanto, visando realizar a caracterização eletrofisiológica do peptídeo na procura do seu alvo molecular, a atividade biológica aqui assumida foi um dos parâmetros de análises e da escolha dos canais iônicos avaliados.

O processo de liberação de insulina e a atividade elétrica nas células pancreáticas são regulados principalmente pelo canal de potássio dependente de ATP (K<sub>ATP</sub>). Como consequência do metabolismo da glicose, a relação ATP/ADP aumenta, o que leva ao fechamento do canal K<sub>ATP</sub> promovendo uma lenta despolarização do

potencial de membrana, que também é dependente da atividade dos canais TRP (Velasco et al., 2016). Uma vez que a despolarização do potencial de membrana começa e atinge cerca de -40mV, os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são ativados, o que permite o aumento da entrada de Na<sup>+</sup> nas células e causa despolarização (Rorsman and Braun, 2013). A -20 mV, os canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) abrem, e o influxo de íons Ca<sup>+2</sup> aumenta a concentração de cálcio intracelular e, portanto, estimula a liberação de insulina por exocitose (Félix-Martínez and Godínez-Fernández, 2014; Velasco et al., 2016).

Finalmente, os canais de potássio dependentes de voltagem (K<sub>v</sub>) e os canais de potássio dependentes de cálcio (KCa) repolarizam o potencial de membrana e, em consequência, impedem a secreção de insulina (Braun et al., 2008; Houamed et al., 2010; Jacobson et al., 2010). Conhecendo previamente os canais iônicos envolvidos na atividade biológica e a natureza dos peptídeos de estudo (bloqueadores de canal de K<sup>+</sup>), OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 foram avaliados sobre os canais K<sub>v</sub>2.1, BKCa1.1, K<sub>ATP</sub> (K<sub>IR</sub> 6.2/SUR 1), Cav1.2 e Cav1.3<sub>s</sub>

Tem sido sugerido que os canais K<sub>v</sub>1 representam 25% das correntes retificadoras atrasadas das células β pancreáticas, enquanto que K<sub>v</sub>2 representa 60% (Herrington, 2007; Herrington et al., 2005; Herrington et al., 2006; MacDonald et al., 2001) sendo considerado o tipo de canal mais proeminente nas células β do pâncreas (Jacobson and Philipson, 2007). Vários estudos identificam o canal K<sub>v</sub>2.1 como o principal contribuinte das correntes de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem nas células β pancreáticas de roedores (Jacobson and Philipson, 2007; MacDonald et al., 2001; MacDonald et al., 2002) e linhas celulares de insulinoma, regulando a excitabilidade da célula, [Ca<sup>+2</sup>]<sub>int</sub> e a secreção de insulina (MacDonald et al., 2001; MacDonald et al., 2002).

Foi, então, avaliada a atividade dos peptídeos no canal K<sub>v</sub>2.1, supondo que estariam modulando a atividade biológica fazendo com que a interrupção da liberação de insulina fosse comprometida. OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 na concentração de 1 μM não geraram efeito sobre o canal K<sub>v</sub>2.1 (Figuras 27, 29 e 31). Peptídeos naturais descritos com a capacidade de interagir como os subtipos da família de canais de potássio do tipo *shab* (K<sub>v</sub>2.1 e K<sub>v</sub>2.2) foram isolados da peçonha de aranhas (Mouhat et al., 2008) (<http://kaliumdb.org/22-04-2019>) e, até a data, tem se descrito somente

um ligante peptídico de escorpião que interage com o canal  $K_v2.1$ , a toxina Anuroctoxin ( $\alpha$ -Ktx) isolada da peçonha do escorpião *Anuroctonus phaiodactylus* que bloqueia significativamente a corrente do íon na concentração de 10 nM; porém, sua especificidade é para o canal  $K_v1.3$  nos linfócitos, desconhecendo-se o mecanismo de ação da toxina no canal  $K_v2.1$  (Bagdáany et al., 2005).

A cinética das correntes no canal BKCa nas células  $\beta$  pancreáticas sugere a capacidade desses canais de modular a atividade elétrica, incluindo a forma e a amplitude do potencial de ação (Houamed et al., 2010; Jacobson et al., 2010). Os canais do tipo BK (KCa1.1) (grande condutância) estão presentes nas células  $\beta$  pancreáticas e são ativados rapidamente quando a membrana é despolarizada; além disso, esses canais são muito sensíveis ao aumento de  $[Ca^{+2}]$  (Jacobson et al., 2007). A importância dos BKCa na liberação de insulina dependente de glicose foi evidente quando o bloqueio desses canais aumentou a amplitude do potencial de ação e aumentou a liberação de insulina em 70% (Braun et al., 2008).

Toxinas de escorpião que interagem com os canais KCa em especial o subtipo BKCa têm sido descritas, mas são poucas em comparação com aquelas toxinas que interagem com os  $K_v$  (<http://kaliumdb.org/> 22-04-2019). Charybdotoxin (ChTx) do escorpião *Leiurus quinquestriatus* e Iberiotoxin (IbTx) do escorpião *Buthus tamulus*, foram as primeiras toxinas descritas e, frequentemente utilizadas como ferramentas de estudo na farmacologia dos canais BKCa (Xu et al., 2004).

Existem toxinas como IbTx e Limbatoxin que bloqueiam seletivamente os BKCa (Schroeder et al., 2002), enquanto que outros bloqueadores desse tipo de canal também interagem com os  $K_v1.3$  (Giangiacomo et al., 1993; Schroeder et al., 2002). O peptídeo BmBKTx1 do escorpião *Buthus martensi Karsch* é considerada a terceira toxina de escorpião que bloqueia seletivamente os canais BKCa e não bloqueia  $K_v1.3$  (Xu et al., 2004); além da toxina Martentoxin que bloqueia 60% da corrente nesse subtipo de canal (Ji et al., 2003).

No geral, é conhecido que os bloqueadores específicos que interagem com o canal BKCa obstruem o poro do canal (Garcia et al., 1999; Ji et al., 2003),

principalmente mediante a interação com a folha beta do extremo C-terminal da toxina (Xu et al., 2004); identificando-se a importância da presença de alguns resíduos de aminoácidos na interação como por exemplo S10, W14, R25, N30, M29, R34, K27 e Y36 da toxina ChTx (Stampe et al., 1994).

OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 na concentração de 1  $\mu$ M quando avaliados no canal de potássio BKCa1.1 ( $\alpha$ -subunidade) induziram uma pequena inibição da corrente do íon, porém não estatisticamente significativa (Figuras 33, 35 e 37). Esses resultados podem ser comparáveis com a k-KTx HeTx204 que apresentou efeito não significativo sobre os canais BKCa, SKCa e TRPV1 na mesma concentração aqui usada. No entanto, é importante ressaltar que HeTx204 gerou aproximadamente 35% de bloqueio no canal Kv1.3 na concentração de 1  $\mu$ M (Chen et al., 2012b). Maurotoxin isolada da peçonha do escorpião *Scorpio maurus* é um potente inibidor do canal de potássio do tipo SKCa (condutância intermediária), mas quando avaliado na concentração de 1  $\mu$ M nos canais BKCa e IKCa, a toxina não produziu efeito algum (Castle et al., 2003).

Portanto, poderia se pensar que os peptídeos de estudo, se avaliados nos outros tipos de canais de potássio dependentes de cálcio, poderiam ter um efeito diferente àquele aqui descrito. Tst26, isolada da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* (Papp et al., 2009), e LmKTx8, isolada da peçonha do escorpião *Lychas mucronatus* (Wu et al., 2007), não geram efeito no canal BKCa.

O canal BKCa pode ser formado unicamente pela subunidade  $\alpha$  que pode estar associada a quatro tipos diferentes de subunidade  $\beta$  (Knaus et al., 1994; Meera et al., 2000; Uebele et al., 2000; Wallner et al., 1999). A subunidade  $\alpha$  (S $\alpha$ ) está formada por segmentos transmembrânicos (S0-S6), uma região hidrofóbica (S7-S8) e da porção C-terminal formada pelos segmentos (S9-S10) (Wei et al., 1994). Também foi caracterizada uma região denominada “core” que contém o sensor da voltagem, o poro e o sítio de interação com a subunidade  $\beta$  (Diaz et al., 1998; Meera et al., 1997; Wallner et al., 1996).

A coexpressão das subunidades  $\beta$  com a subunidade  $\alpha$  do canal BKCa modifica a cinética do canal, a sensibilidade ao íon cálcio, o grau de sensibilidade e as

propriedades farmacológicas das toxinas de escorpião (Brenner et al., 2000a; Dworetzky et al., 1996; McManus et al., 1995; Meera et al., 1996; Meera et al., 2000, 2001). A toxina Slotoxin ( $\alpha$ -KTx1.11), isolada da peçonha do escorpião *Centruroides noxius*, bloqueia especificamente os canais BKCa, produzindo 60% de bloqueio no canal  $\alpha$ - $\beta$ 1 (presente no músculo esquelético), enquanto que, no canal  $\alpha$ - $\beta$ 4 (presente nos neurônios) o bloqueio foi menor (Garcia-Valdes et al., 2001). Resultados similares têm sido observados para a toxina ChTX nos canais BKCa (Hanner et al., 1997; Hanner et al., 1998) inferindo-se que a diversidade entre os canais BKCa sensíveis à ChTX e os insensíveis a ChTX resulta da presença das diferentes subunidades  $\beta$  (Ji et al., 2003). Portanto, é possível que o leve efeito (7%), mesmo que não estatisticamente significativo, na presença dos peptídeos OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 poderia ser diferente se testados no canal BKCa co-expressado com a subunidade  $\beta$ .

É amplamente conhecida e muito bem descrita a importância do canal de potássio dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ) nas células pancreáticas, acoplado o metabolismo celular com a atividade elétrica da célula na secreção da insulina (Braun et al., 2008; Fridlyand et al., 2013; Velasco et al., 2016). Os canais  $K_{ATP}$  existem em diferentes conformações estruturais dependendo do tecido onde ele é expresso, a conformação  $K_{IR}6.2/SUR1$  presente nas células  $\beta$  do pâncreas foi aqui avaliada. Os peptídeos OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 na concentração de 1  $\mu$ M não geraram efeito no canal  $K_{IR}6.2/SUR1$  (Figuras 38,41,42,45,46 e 54). Esses resultados são comparáveis com o *screening* realizado por Ramu e colaboradores (2018), onde foram testados 24 inibidores conhecidos para o canal de potássio isolados de várias espécies de animais na concentração de 1  $\mu$ M, incluindo toxinas de escorpião como por exemplo IbTx, Lq-2, MgTx, MTx etc. Somente o peptídeo SpTx-1 isolado da peçonha *Scolopendra polymorpha* (Spider Pharm) inibiu o canal  $K_{ATP}$  com constante de dissociação de 15 nM e interagindo principalmente com a subunidade  $K_{IR}6.2$  do que a subunidade SUR1 (Ramu et al., 2018).

Baseados na literatura até o momento, somente a toxina Lq2 ( $\alpha$ -KTx) isolada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* tem a capacidade de inibir o canal ROMK1 ( $K_{ATP}$ - $K_{IR}1.1$ ) expresso em oócito na concentração de 3,5  $\mu$ M (Lu and

Mackinnon, 1997), além de inibir os canais K<sub>Ca</sub> e K<sub>v</sub> (Escobar et al., 1993; Lucchesi et al., 1989). Toxinas como Charybdotoxin, Iberiotoxin, Noxiustoxin, Margatoxin, Magitoxin 1 e Agitoxin 2, na concentração de 2,5 µM foram também avaliadas, mas geraram um leve efeito no canal ROMK1 (Lu and MacKinnon, 1997).

δ-Dendrotoxin, isolada da peçonha da serpente *Dendroaspis angusticeps*, e o peptídeo Tertiapin, isolado da peçonha da abelha *Apis mellífera*, inibem o canal ROMK1, sugerindo como mecanismo de ação que a toxina se liga no poro do canal (Imredy et al., 1998; Jin and Lu, 1998), embora não bloqueie completamente a condução pelo poro no caso da δ-Dendrotoxin (Imredy et al., 1998). Além disso, peptídeos como BDS-I, isolado da peçonha da anêmona *Anemonia sulcata* avaliada no canal IRK1, ViTx, isolado da peçonha do *Conus virgo* (Kaufenstein et al., 2003) e as toxinas DaE1 e DaE2 da serpente *D. angusticeps* (Tytgat et al., 2001) avaliadas no canal K<sub>IR</sub> 2.1, não tiveram efeito.

O íon cálcio foi originalmente proposto como principal mediador da secreção de insulina por Clausen e colaboradores em 1974 (Clausen et al., 1974). Diferentes estudos têm mostrado que os níveis de cálcio intracelular nas células pancreáticas são mantidos pelo influxo do íon principalmente pelos Cav (Blaustein et al., 1991; Blaustein and Lederer, 1999; Carafoli, 1988) e, o incremento da concentração do cálcio intracelular atua como o mensageiro intracelular mais importante na secreção da insulina (Ashcroft and Rorsman, 1989; Yang and Berggren, 2005, 2006). Canais de cálcio do tipo L têm sido os que foram melhor caracterizados nas células β pancreáticas e que contribuem maioritariamente na totalidade da corrente do íon (Hiriart et al., 2014; Kitaguchi et al., 2013) sendo que 60-80% da insulina liberada podem ser atribuídos ao influxo de cálcio via canal de cálcio tipo L (Davalli et al., 1996).

Os canais Cav1.2 e Cav1.3 estão presentes nas células β pancreáticas de rato, camundongos e humanas; no entanto, o Cav1.3 é o mais expresso em ratos e humano (Iwashima et al., 1993; Kitaguchi et al., 2013), além de ser um subtipo de canal de cálcio importante na liberação de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008; Rorsman et al., 2012a; Scholze et al., 2001).

OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2, quando avaliados nos subtipos Cav1.2 e Cav1.3 na concentração de 1  $\mu$ M, não geraram efeito (Figuras 53,55,59,611e 63).

OmTx2 (previamente descrito) e OcyC9 aqui avaliado geraram um bloqueio significativo da corrente do íon K<sup>+</sup> no canal Kv1.3, assumindo a possibilidade que a modulação da secreção da insulina fosse no sentido de favorecer a liberação do hormônio, é importante saber, se o canal de potássio Kv1.3 tem alguma relevância na atividade biológica sugerida. Tem sido sugerido que a inibição dos Kv na presença dos bloqueadores TEA e 4AP incrementam a frequência do potencial de ação e a secreção de insulina, sugerindo a importância desse tipo de canais na regulação do hormônio nas células secretoras (Atwater et al., 1979; Roe et al., 1996).

Diferentes revisões na área que avaliam os canais envolvidos na atividade elétrica nas células pancreáticas não destacam o canal de potássio do tipo Kv1.3 ser importante para a secreção de insulina (Hiriart et al., 2014; Velasco et al., 2016); Além disso, Su e colaboradores no 2001 usando ferramentas farmacológicas, eletrofisiológicas e moleculares não identificaram a presença do canal Kv1.3 na linha celular INS-1 (Su et al., 2001), nem na linha celular BTC3 (Roe et al., 1996). Por tanto, pode se dizer que não existe evidencia científica relevante que permita inferir que os efeitos induzidos pelos peptídeos aqui avaliados no canal Kv1.3 possam estar relacionados com modular a secreção de insulina. Mesmo assim, para esclarecer se os peptídeos de estudo favorecem ou não a secreção da insulina, sugere-se avaliar in vitro o efeito dos peptídeos na atividade biológica.

## VII. CONCLUSÕES

Determinou-se que o peptídeo OcyC9 está presente na peçonha do escorpião *O. cayaporum* com uma massa molecular monoisotópica experimental de  $[M + H]^+ = 2545,03$  Da, 24 resíduos de aminoácidos na totalidade da sua sequência, incluindo 2 pontes dissulfeto e não é amidado.

Os peptídeos OcyC9 e seu análogo (OcyC9MOD) geraram um bloqueio na corrente do íon  $K^+$  no canal  $K_v1.3$ , mostrando mais uma vez o efeito bloqueador fraco previamente descrito para as k-KTx.

Os peptídeos OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 não apresentam efeito nenhum nos canais de potássio  $K_v2.1$ , BKCA 1.1 e  $K_{ATP}$  ( $K_{IR6.2/SUR1}$ ) canais iônicos importantes na atividade elétrica nas células pancreáticas.

Os peptídeos OcyC9, OcyC9MOD e OmTx2 não apresentam efeito nos canais de cálcio.

## VIII. PERSPECTIVAS

Avaliar as cinéticas de ativação e inativação do canal Kv1.3 para determinar de fato se as toxinas aqui avaliadas podem modular o *gating* do canal.

Sugere-se incrementar o tamanho amostral (n) experimental nos ensaios dos peptídeos em diferentes concentrações às aqui avaliadas.

Avaliar o efeito dos peptídeos *in vitro* nas células pancreáticas para conhecer de fato sua capacidade em modular a secreção de insulina.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Mottaleb, Y., Corzo, G., Martin-Eauclaire, M.-F., Satake, H., Céard, B., Peigneur, S., Nambaru, P., Bougis, P.-E., Possani, L.D., Tytgat, J., 2008. A common “hot spot” confers hERG blockade activity to  $\alpha$ -scorpion toxins affecting K<sup>+</sup> channels. *Biochemical pharmacology* 76, 805-815.
- Adams, M.E., Myers, R.A., Imperial, J.S., Olivera, B.M., 1993. Toxotyping rat brain calcium channels with omega.-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 32, 12566-12570.
- Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., 1999. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels 1. *Endocrine reviews* 20, 101-135.
- Albillos, A., Neher, E., Moser, T., 2000. R-Type Ca<sup>2+</sup> channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *Journal of Neuroscience* 20, 8323-8330.
- Albright, R.A., Ibar, J.-L.V., Kim, C.U., Gruner, S.M., Morais-Cabral, J.H., 2006. The RCK domain of the KtrAB K<sup>+</sup> transporter: multiple conformations of an octameric ring. *Cell* 126, 1147-1159.
- Alexander Sph, M.A., Peters JA 2009. *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*. 4th Edition. *Br J Pharmacol* S1–S254.
- Ali, S.A., Alam, M., Abbasi, A., Undheim, E.A., Fry, B.G., Kalbacher, H., Voelter, W., 2016. Structure-activity relationship of chlorotoxin-like peptides. *Toxins* 8, 36.
- Almeida, D.D., Torres, T.M., Barbosa, E.G., Lima, J.P.M.S., de Freitas Fernandes-Pedrosa, M., 2013. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. *Biochemical and biophysical research communications* 430, 113-118.
- Altier, C., Dale, C.S., Kisilevsky, A.E., Chapman, K., Castiglioni, A.J., Matthews, E.A., Evans, R.M., Dickenson, A.H., Lipscombe, D., Vergnolle, N., 2007. Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *Journal of Neuroscience* 27, 6363-6373.
- Álvarez, Y.D., Belingheri, A.V., Bay, A.E.P., Javis, S.E., Tedford, H.W., Zamponi, G., Marengo, F.D., 2013. The immediately releasable pool of mouse chromaffin cell vesicles is coupled to P/Q-type calcium channels via the synaptic protein interaction site. *PLoS one* 8, e54846.
- Amoroso, S., Schmid-Antomarchi, H., Fosset, M., Lazdunski, M., 1990. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Science* 247, 852-854.
- Anderson, D., Engbers, J.D., Heath, N.C., Bartoletti, T.M., Mehaffey, W.H., Zamponi, G.W., Turner, R.W., 2013. The Cav3–Kv4 complex acts as a calcium sensor to maintain inhibitory charge transfer during extracellular calcium fluctuations. *Journal of Neuroscience* 33, 7811-7824.
- Anderson, D., Mehaffey, W.H., Iftinca, M., Rehak, R., Engbers, J.D., Hameed, S., Zamponi, G.W., Turner, R.W., 2010. Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes. *Nature neuroscience* 13, 333.
- Ashcroft, F.M., 2005. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *The Journal of clinical investigation* 115, 2047-2058.

- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 1989. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Progress in biophysics and molecular biology* 54, 87-143.
- Ashcroft, S.J., Ashcroft, F.M., 1990. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cellular signalling* 2, 197-214.
- Ashford, M., Sturgess, N., Trout, N., Gardner, N., Hales, C., 1988. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflügers Archiv* 412, 297-304.
- Atwater, I., Ribalet, B., Rojas, E., 1979. Mouse pancreatic beta-cells: tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. *The Journal of physiology* 288, 561-574.
- Babenko, A.P., Bryan, J., 2003. Sur domains that associate with and gate KATP pores define a novel gatekeeper. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41577-41580.
- Bagdáany, M., Batista, C.V., Valdez-Cruz, N.A., Somodi, S., De La Vega, R.C.R., Licea, A.F., Varga, Z., Gáspár, R., Possani, L.D., Panyi, G., 2005. Anurotoxin, a new scorpion toxin of the  $\alpha$ -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Molecular pharmacology* 67, 1034-1044.
- Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., MacKinnon, R., 2013. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Elife* 2, e00594.
- Bannister, R.A., Beam, K.G., 2013. CaV1.1: the atypical prototypical voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828, 1587-1597.
- Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Göpel, S.O., Obermüller, S., Platzer, J., Renström, E., Trus, M., Atlas, D., 2001. Fast exocytosis with few Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophysical journal* 81, 3308-3323.
- Barnes, R.D., 2005. *Zoologia dos Invertebrados.*, p. 1168 págs.
- Barros, F., Domínguez, P., de la Peña, P., 2012. Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Frontiers in pharmacology* 3.
- Batista, C.V., Gómez-Lagunas, F., de la Vega, R.C.R.g., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., Possani, L.D., 2002. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker BK<sup>+</sup>-channels with distinctly different affinities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1601, 123-131.
- Bean, B.P., Sturek, M., Puga, A., Hermsmeyer, K., 1986. Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Circulation Research* 59, 229-235.
- Benkhadir, K., Kharrat, R., Cestèle, S., Mosbah, A., Rochat, H., El Ayeb, M., Karoui, H., 2004. Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides* 25, 151-161.
- Berecki, G., McArthur, J.R., Cuny, H., Clark, R.J., Adams, D.J., 2014. Differential Cav2.1 and Cav2.3 channel inhibition by baclofen and  $\alpha$ -conotoxin Vc1.1 via GABAB receptor activation. *The Journal of general physiology* 143, 465-479.

- Bergeron, Z.L., Bingham, J.-P., 2012. Scorpion toxins specific for potassium (K<sup>+</sup>) channels: a historical overview of peptide bioengineering. *Toxins* 4, 1082-1119.
- Berjukow, S., Hering, S., 2001. Voltage-dependent acceleration of Cav1.2 channel current decay by (+)- and (-)-isradipine. *British journal of pharmacology* 133, 959-966.
- Berkefeld, H., Fakler, B., 2008. Repolarizing responses of BKCa-Cav complexes are distinctly shaped by their Cav subunits. *Journal of Neuroscience* 28, 8238-8245.
- Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.-O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., 2006. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> signaling. *science* 314, 615-620.
- Bernardi, H., De Weille, J.R., Epelbaum, J., Mourre, C., Amoroso, S., Slama, A., Fosset, M., Lazdunski, M., 1993. ATP-modulated K<sup>+</sup> channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohypophysis and are involved in growth hormone release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 1340-1344.
- Berneche, S., Roux, B., 2000. Molecular dynamics of the KcsA K<sup>+</sup> channel in a bilayer membrane. *Biophysical Journal* 78, 2900-2917.
- Bioclon, I., 1997. *Biología del Alacran. Toxicología del veneno de Alacrán Tratamiento del paciente picado por Alacrán*, 5-9.
- Bladen, C., Hamid, J., Souza, I.A., Zamponi, G.W., 2014. Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Molecular brain* 7, 36.
- Blaustein, M.P., Goldman, W.F., Fontana, G., Krueger, B.K., Santiago, E.M., Steele, T.D., Weiss, D.N., Yarowsky, P.J., 1991. Physiological Roles of the Sodium-Calcium Exchanger in Nerve and Muscles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 639, 254-274.
- Blaustein, M.P., Lederer, W.J., 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews* 79, 763-854.
- Bosmans, F., Tytgat, J., 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon* 49, 142-158.
- Bougis, P., Martin-Eauclaire, M., 2015. Shal-type (Kv4.x) potassium channel pore blockers from scorpion venoms. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]* 67, 248-254.
- Bougis, P.E., Rochat, H., Smith, L.A., 1989. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *Journal of Biological Chemistry* 264, 19259-19265.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J., Snutch, T.P., 1999. Splicing of  $\alpha$ 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nature neuroscience* 2, 407.
- Bourinet, E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J., Zamponi, G.W., 2001. Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of  $\alpha$ 1E (CaV2.3) calcium channels. *Biophysical journal* 81, 79-88.

- Boyd, A., 1992. The role of ion channels in insulin secretion. *Journal of cellular biochemistry* 48, 234-241.
- Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., Johnson, P.R., Rorsman, P., 2008. Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57, 1618-1628.
- Brenner, R., Jegla, T.J., Wickenden, A., Liu, Y., Aldrich, R.W., 2000a. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel  $\beta$  subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6453-6461.
- Brenner, R., Perez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T., Aldrich, R.W., 2000b. Vasoregulation by the  $\beta$ 1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-876.
- Brownell, P., Polis, G.A., 2001. *Scorpion biology and research*. Oxford University Press.
- Cahalan, M., 1975. Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *The Journal of physiology* 244, 511-534.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F.I., Corzo, G., Possani, L.D., 2013. Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na<sup>+</sup>-channel  $\alpha$ -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochimie* 95, 1216-1222.
- Camargos, T.S., Restano-Cassulini, R., Possani, L.D., Peigneur, S., Tytgat, J., Schwartz, C.A., Alves, E.M.C., De Freitas, S.M., Schwartz, E.F., 2011. The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 32, 1509-1517.
- Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., De Luca, A., Diaz, J., Borges, R., Carbone, E., 2007. Chronic hypoxia up-regulates  $\alpha$ 1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *The Journal of physiology* 584, 149-165.
- Carafoli, E., 1988. [1] Membrane transport of calcium: An overview, *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 3-11.
- Carbone, E., Lux, H., 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501.
- Carlier, E., Geib, S., De Waard, M., Avdonin, V., Hoshi, T., Fajloun, Z., Rochat, H., Sabatier, J.M., Kharrat, R., 2000. Effect of maurotoxin, a four disulfide-bridged toxin from the chactoid scorpion *Scorpio maurus*, on Shaker K<sup>+</sup> channels. *Chemical Biology & Drug Design* 55, 419-427.
- Castle, N., London, D., Creech, C., Fajloun, Z., Stocker, J., Sabatier, J.-M., 2003. Maurotoxin: a potent inhibitor of intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *Molecular pharmacology* 63, 409-418.
- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology* 16, 521-555.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a003947.

- Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Frank, H.Y., Konoki, K., Scheuer, T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124-141.
- Catterall, W.A., Leal, K., Nanou, E., 2013. Calcium channels and short-term synaptic plasticity. *Journal of Biological Chemistry* 288, 10742-10749.
- Clausen, T., Elbrink, J., Martin, B., 1974. Insulin controlling calcium distribution in muscle and fat cells. *Acta endocrinologica. Supplementum* 191, 137-143.
- Clayton, G.M., Altieri, S., Heginbotham, L., Unger, V.M., Morais-Cabral, J.H., 2008. Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 1511-1515.
- Cleland, W.W., 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480-482.
- Clement, J.P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., 1997. Association and stoichiometry of K ATP channel subunits. *Neuron* 18, 827-838.
- Coelho, V., Cremonez, C., Anjolette, F., Aguiar, J., Varanda, W., Arantes, E., 2014. Functional and structural study comparing the C-terminal amidated  $\beta$ -neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 83, 15-21.
- Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Morena, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., 1999. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 233-255.
- Cologna, C., Peigneur, S., Rosa, J., Selistre-de-Araujo, H., Varanda, W., Tytgat, J., Arantes, E., 2011. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new  $\alpha$ -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 58, 54-61.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D., 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters* 471, 165-168.
- Corzo, G., Escobas, P., Villegas, E., Barnham, K.J., Weilan, H., Norton, R.S., Nakajima, T., 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical journal* 359, 35-45.
- Couraud, F., Jover, E., Dubois, J., Rochat, H., 1982. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20, 9-16.
- Cremonez, C.M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J.S., Dutra, A.A., Waelkens, E., Lescrinier, E., Herdewijn, P., De Lima, M.E., Pimenta, A., 2016. Structural and Functional Elucidation of Peptide Ts11 Shows Evidence of a Novel Subfamily of Scorpion Venom Toxins. *Toxins* 8, 288.
- Cribbs, L.L., Lee, J.-H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., 1998. Cloning and characterization of  $\alpha$ 1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circulation research* 83, 103-109.
- Cha, A., Snyder, G.E., Selvin, P.R., Bezanilla, F., 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402, 809-813.

- Chagot, B., Pimentel, C., Li, D., Joost, P., Tytgat, J., Nakajima, T., Corzo, G., Darbon, H., Ferrat, G., 2005. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical journal* 388, 263-271.
- Chakrabarty, A., Green, J.A., Roberts, R., 2006. Origin and evolution of the TKDP gene family. *Gene* 373, 35-43.
- Chan, K.W., Zhang, H., Logothetis, D.E., 2003. N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *The EMBO Journal* 22, 3833-3843.
- Chandy, K., 1991. Simplified gene nomenclature. *Nature* 352, 26.
- Chen, Z.-Y., Hu, Y.-T., Yang, W.-S., He, Y.-W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.-M., Ding, J.-P., Cao, Z.-J., Li, W.-X., 2012a. Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *Journal of Biological Chemistry* 287, 13813-13821.
- Chen, Z.-Y., Zeng, D.-Y., Hu, Y.-T., He, Y.-W., Pan, N., Ding, J.-P., Cao, Z.-J., Liu, M.-L., Li, W.-X., Yi, H., 2012b. Structural and functional diversity of acidic scorpion potassium channel toxins. *PloS one* 7, e35154.
- Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R., Cao, Z., Liu, M., Li, W., Jiang, L., 2013. Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins. *PloS one* 8, e60201.
- Cheng, W.W., McCoy, J.G., Thompson, A.N., Nichols, C.G., Nimigean, C.M., 2011. Mechanism for selectivity-inactivation coupling in KcsA potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5272-5277.
- Chippaux, J.-P., 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des Devel Ther* 6, 165-173.
- Chippaux, J.-P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica* 107, 71-79.
- Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 115-121.
- Chuang, R.S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., Swartz, K.J., 1998. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature neuroscience* 1, 668-674.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2002. Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and biophysical research communications* 293, 1514-1522.
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2001. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and biophysical research communications* 286, 820-825.
- Dardevet, L., Rani, D., Aziz, T.A.E., Bazin, I., Sabatier, J.-M., Fadl, M., Brambilla, E., De Waard, M., 2015. Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion. *Toxins* 7, 1079-1101.

Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L., Rowan, E.G., 1997. On the convergent evolution of animal toxins conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4302-4309.

Davalli, A., Biancardi, E., Pollo, A., Socci, C., Pontiroli, A., Pozza, G., Clementi, F., Sher, E., Carbone, E., 1996. Dihydropyridine-sensitive and-insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of Endocrinology* 150, 195-203.

De Jongh, K.S., Warner, C., Catterall, W.A., 1990. Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *Journal of Biological Chemistry* 265, 14738-14741.

de Weille, J.R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., Lazdunski, M., 1991. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2437.

DeBin, J., Strichartz, G., 1991. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 29, 1403-1408.

Del Prato, S., Marchetti, P., Bonadonna, R.C., 2002. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, S109-S116.

Deshane, J., Garner, C.C., Sontheimer, H., 2003. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 4135-4144.

Deutsch, C., Price, M., Lee, S., King, V., Garcia, M., 1991. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in human T lymphocytes. Evidence for association with the voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry* 266, 3668-3674.

Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L., Latorre, R., 1998. Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *Journal of Biological Chemistry* 273, 32430-32436.

Dibué, M., Kamp, M.A., Alpdogan, S., Tevoufouet, E.E., Neiss, W.F., Hescheler, J., Schneider, T., 2013. Retracted: Cav2. 3 (R-type) calcium channels are critical for mediating anticonvulsive and neuroprotective properties of lamotrigine in vivo. *Epilepsia* 54, 1542-1550.

Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E., de la Vega, R.R., Tytgat, J., Possani, L., 2008. Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 187.

Diego-García, E., Batista, C.V., García-Gómez, B.I., Lucas, S., Candido, D.M., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* 45, 273-283.

Diego-García, E., Caliskan, F., Tytgat, J., 2014. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC genomics* 15, 295.

- Diego-García, E., Peigneur, S., Debaveye, S., Gheldof, E., Tytgat, J., Caliskan, F., 2013. Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae). *Toxicon* 61, 72-82.
- Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L., Lazdunski, M., 1998. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3. 4. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6744-6749.
- Dörschner, H., Uhde, I., Schwanstecher, C., Schwanstecher, M., 1999. Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Molecular pharmacology* 55, 1060-1066.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *science* 280, 69-77.
- Doyle, M.E., Egan, J.M., 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacological reviews* 55, 105-131.
- Dubel, S.J., Starr, T., Hell, J., Ahlijanian, M.K., Enyeart, J.J., Catterall, W.A., Snutch, T.P., 1992. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5058-5062.
- Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Lum-Ragan, J.T., McKay, M.C., Post-Munson, D.J., Trojnacki, J.T., Chang, C.-P., Gribkoff, V.K., 1996. Phenotypic Alteration of a Human BK (hSlo) Channel by hSlo $\beta$  Subunit Coexpression: Changes in Blocker Sensitivity, Activation/Relaxation and Inactivation Kinetics, and Protein Kinase A Modulation. *Journal of Neuroscience* 16, 4543-4550.
- Edgerton, G.B., Blumenthal, K.M., Hanck, D.A., 2010. Inhibition of the activation pathway of the T-type calcium channel CaV3. 1 by ProTxII. *Toxicon* 56, 624-636.
- Ellinor, P.T., Zhang, J.-F., Horne, W.A., Tsien, R.W., 1994. Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 372, 272.
- Ellis, K., Tenenholz, T., Jerng, H., Hayhurst, M., Dudlak, C., Gilly, W., Blaustein, M., Weber, D., 2001. Interaction of a toxin from the scorpion *Tityus serrulatus* with a cloned K<sup>+</sup> channel from squid (sqKv1A). *Biochemistry* 40, 5942-5953.
- Ellis, S.B., Williams, M.E., Ways, N.R., Brenner, R., Sharp, A.H., Leung, A.T., Campbell, K.P., McKenna, E., Koch, W.J., Hui, A., 1988. Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241, 1661-1664.
- Engbers, J.D., Anderson, D., Asmara, H., Rehak, R., Mehaffey, W.H., Hameed, S., McKay, B.E., Kruskic, M., Zamponi, G.W., Turner, R.W., 2012. Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2601-2606.
- Engbers, J.D., Zamponi, G.W., Turner, R.W., 2013. Modeling interactions between voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and KCa1. 1 channels. *Channels* 7, 524-529.
- Engelard, B., Neu, A., Ludwig, J., Roeper, J., Pongs, O., 1998. Cloning and functional expression of rat ether-à-go-go-like K<sup>+</sup> channel genes. *The Journal of Physiology* 513, 647-654.

- Escobar, L., Root, M.J., MacKinnon, R., 1993. Influence of protein surface charge on the bimolecular kinetics of a potassium channel peptide inhibitor. *Biochemistry* 32, 6982-6987.
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L.D., Corzo, G., 2011. Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of Cssl, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides* 32, 75-79.
- Fajloun, Z., Carlier, E., Lecomte, C., Geib, S., di Luccio, E., Bichet, D., Mabrouk, K., Rochat, H., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2000. Chemical synthesis and characterization of Pi1, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* active on K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Biochemistry* 267, 5149-5155.
- Félix-Martínez, G.J., Godínez-Fernández, J.R., 2014. Mathematical models of electrical activity of the pancreatic  $\beta$ -cell: A physiological review. *Islets* 6, e949195.
- Feng, J., Yu, C., Wang, M., Li, Z., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., He, X., Han, S., 2013. Expression and characterization of a novel scorpine-like peptide Ev37, from the scorpion *Euscorpions validus*. *Protein expression and purification* 88, 127-133.
- Feng, Z.-P., Hamid, J., Doering, C., Bosey, G.M., Snutch, T.P., Zamponi, G.W., 2001. Residue Gly1326 of the N-type calcium channel  $\alpha$ 1B subunit controls reversibility of  $\omega$ -conotoxin GVIA and MVIIB block. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15728-15735.
- Francke, O.F., 1985. *Conspectus genericus scorpionum*. *Occas. Pap. Mus.* 1-32.
- Frank, H.Y., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological reviews* 57, 387-395.
- Frau, A., Pisciotta, M., Gurrola, G., Possani, L., Prestipino, G., 2001. Synthetic undecapeptide (NTX10-20) of noxiustoxin blocks completely the IA potassium currents of cerebellum granular cells. *European Biophysics Journal* 29, 569-573.
- Fréchal, K., Xu, C.Q., Wolff, N., Wecker, K., Gurrola, G.B., Zhu, S.Y., Chi, C.W., Possani, L.D., Tytgat, J., Delepierre, M., 2004. Exploring structural features of the interaction between the scorpion toxin CnErg1 and ERG K<sup>+</sup> channels. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 56, 367-375.
- French, R.J., Zamponi, G.W., 2005. Voltage-gated sodium and calcium channels in nerve, muscle, and heart. *IEEE transactions on nanobioscience* 4, 58-69.
- Fridlyand, L.E., Jacobson, D.A., Philipson, L., 2013. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: a computational systems analysis. *Islets* 5, 1-15.
- Fuller, M.D., Thompson, C.H., Zhang, Z.-R., Freeman, C.S., Schay, E., Szakács, G., Bakos, É., Sarkadi, B., McMaster, D., French, R.J., 2007. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *Journal of Biological Chemistry* 282, 37545-37555.
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1990. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 11083-11090.

- Gao, B., Harvey, P.J., Craik, D.J., Ronjat, M., De Waard, M., Zhu, S., 2013. Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Bioscience reports* 33, e00047.
- Garcia-Valdes, J., Zamudio, F.Z., Toro, L., Possan, L.D., 2001. Slotoxin,  $\alpha$ KTx1. 11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between  $\alpha$  and  $\alpha + \beta$  ( $\beta 1$  or  $\beta 4$ ) complexes. *FEBS letters* 505, 369-373.
- Garcia, M.L., Garcia-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A., MacKinnon, R., 1994. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33, 6834-6839.
- Garcia, M.L., Hanner, M., Knaus, H.-G., Slaughter, R., Kaczorowski, G.J., 1999. [32] Scorpion toxins as tools for studying potassium channels, *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 624-639.
- Gasparini, S., Danse, J.-M., Lecoq, A., Pinkasfeld, S., Zinn-Justin, S., Young, L.C., de Medeiros, C.C., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Ménez, A., 1998. Delineation of the Functional Site of  $\alpha$ -Dendrotoxin The functional topographies of Dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel blocking toxins. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25393-25403.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., O'rourke, S.T., 2006. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacology & therapeutics* 110, 103-116.
- Giangiaco, K.M., Sugg, E.E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R.J., McManus, O.B., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1993. Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels. *Biochemistry* 32, 2363-2370.
- Giblin, J.P., Leaney, J.L., Tinker, A., 1999. The Molecular Assembly of ATP-sensitive Potassium Channels DETERMINANTS ON THE PORE FORMING SUBUNIT. *Journal of Biological Chemistry* 274, 22652-22659.
- Gilquin, B., Racapé, J., Wrisch, A., Visan, V., Lecoq, A., Grissmer, S., Ménez, A., Gasparini, S., 2002. Structure of the BgK-Kv1. 1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37406-37413.
- Glauner, K.S., Mannuzzu, L.M., Gandhi, C.S., Isacoff, E.Y., 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402, 813-817.
- Goldin, A., 2006. Expression and analysis of recombinant ion channels. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Goldstein, S.A., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., Rajan, S., 2005. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacological reviews* 57, 527-540.
- Goldstein, S.A., Price, L.A., Rosenthal, D.N., Pausch, M.H., 1996. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 13256-13261.
- Gollasch, M., Ried, C., Bychkov, R., Luft, F.C., Haller, H., 1996. K<sup>+</sup> currents in human coronary artery vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 78, 676-688.

Gómez-Lagunas, F., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F., Possani, L., 1996. Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards Shaker BK<sup>+</sup> channels. *Journal of Membrane Biology* 152, 49-56.

Grissmer, S., Nguyen, A.N., Aiyar, J., Hanson, D.C., Mather, R.J., Gutman, G.A., Karmilowicz, M.J., Auperin, D.D., Chandy, K.G., 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1. 1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Molecular pharmacology* 45, 1227-1234.

Grodsky, G.M., Bolaffi, J.L., 1992. Desensitization of the insulin-secreting beta cell. *Journal of cellular biochemistry* 48, 3-11.

Gurnett, C.A., De Waard, M., Campbell, K.P., 1996. Dual function of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 2\delta$  subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16, 431-440.

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57, 473-508.

Hamilton, S.L., Yatani, A., Brush, K., Schwartz, A., Brown, A.M., 1987. A comparison between the binding and electrophysiological effects of dihydropyridines on cardiac membranes. *Molecular pharmacology* 31, 221-231.

Hanner, M., Schmalhofer, W.A., Munujos, P., Knaus, H.-G., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1997. The  $\beta$  subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 2853-2858.

Hanner, M., Vianna-Jorge, R., Kamassah, A., Schmalhofer, W.A., Knaus, H.-G., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1998. The  $\beta$  Subunit of the High Conductance Calcium-activated Potassium Channel IDENTIFICATION OF RESIDUES INVOLVED IN CHARYBDOTOXIN BINDING. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16289-16296.

Hansen, D., Macedo-Ribeiro, S., Veríssimo, P., Im, S.Y., Sampaio, M.U., Oliva, M.L.V., 2007. Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 360, 735-740.

Hansen, P.B., 2014. Functional importance of T-type voltage-gated calcium channels in the cardiovascular and renal system: news from the world of knockout mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308, R227-R237.

Hansson, K., Ma, X., Eliasson, L., Czerwiec, E., Furie, B., Furie, B.C., Rorsman, P., Stenflo, J., 2004. The First  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid-containing Contryphan A SELECTIVE L-TYPE CALCIUM ION CHANNEL BLOCKER ISOLATED FROM THE VENOM OF CONUS MARMOREUS. *Journal of Biological Chemistry* 279, 32453-32463.

He, Y., Zhao, R., Di, Z., Li, Z., Xu, X., Hong, W., Wu, Y., Zhao, H., Li, W., Cao, Z., 2013. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. *Journal of proteomics* 89, 1-14.

- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R., 1994. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal* 66, 1061-1067.
- Heinemann, S.H., Rettig, J., Graack, H.-R., Pongs, O., 1996. Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *The Journal of Physiology* 493, 625.
- Henquin, J.-C., 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760.
- Henquin, J.-C., Ravier, M., Nenquin, M., Jonas, J.-C., Gilon, P., 2003. Hierarchy of the  $\beta$ -cell signals controlling insulin secretion. *European journal of clinical investigation* 33, 742-750.
- Herrington, J., 2007. Gating modifier peptides as probes of pancreatic  $\beta$ -cell physiology. *Toxicon* 49, 231-238.
- Herrington, J., Sanchez, M., Wunderler, D., Yan, L., Bugianesi, R.M., Dick, I.E., Clark, S.A., Brochu, R.M., Priest, B.T., Kohler, M.G., 2005. Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic  $\beta$ -cells. *The Journal of physiology* 567, 159-175.
- Herrington, J., Zhou, Y.-P., Bugianesi, R.M., Dulski, P.M., Feng, Y., Warren, V.A., Smith, M.M., Kohler, M.G., Garsky, V.M., Sanchez, M., 2006. Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic  $\beta$ -cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes* 55, 1034-1042.
- Hess, P., Tsien, R.W., 1984. Mechanism of ion permeation through calcium channels.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y., 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* 90, 291-366.
- Hille, B., 1973. Potassium channels in myelinated nerve. *The Journal of general physiology* 61, 669-686.
- Hille, B., 2001. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates. Sunderland, MA 1375.
- Hiriart, M., Aguilar-Bryan, L., 2008. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295, E1298-E1306.
- Hiriart, M., Velasco, M., Larqué, C., Diaz-Garcia, C.M., 2014. Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells, *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 87-114.
- Hjelle, J., 1990. Anatomy and morphology. *The biology of scorpions*, 9-63.
- Hofmann, F., Biel, M., Flockerzi, V., 1994. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annual review of neuroscience* 17, 399-418.
- Houamed, K.M., Sweet, I.R., Satin, L.S., 2010. BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *The Journal of physiology* 588, 3511-3523.
- Howard, R.J., Clark, K.A., Holton, J.M., Minor, D.L., 2007. Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron* 53, 663-675.

- Hu, H., Shao, L.-R., Chavoshy, S., Gu, N., Trieb, M., Behrens, R., Laake, P., Pongs, O., Knaus, H.G., Ottersen, O.P., 2001. Presynaptic Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *Journal of Neuroscience* 21, 9585-9597.
- Huang, X., Jan, L.Y., 2014. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol* 206, 151-162.
- Hui, A., Ellinor, P.T., Krizanova, O., Wang, J.-D., Diebold, R.J., Schwartz, A., 1991. Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the  $\alpha$ 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron* 7, 35-44.
- Huys, I., Olamendi-Portugal, T., Garcia-Gómez, B.I., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Dyason, K., Clynen, E., Zhu, S., van der Walt, J., Possani, L.D., 2004. A subfamily of acidic  $\alpha$ -K<sup>+</sup> toxins. *Journal of Biological Chemistry* 279, 2781-2789.
- Huys, I., Tytgat, J., 2003. Evidence for a function-specific mutation in the neurotoxin, parabutoxin 3. *European Journal of Neuroscience* 17, 1786-1792.
- Imredy, J.P., Chen, C., MacKinnon, R., 1998. A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1. *Biochemistry* 37, 14867-14874.
- Inagaki, N., Gonoj, T., Seino, S., 1997. Subunit stoichiometry of the pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *FEBS letters* 409, 232-236.
- Isabelle, H., Chen-Qi, X., Cheng-Zhong, W., Vacher, H., Martin-Eauclaire, M.-F., Cheng-Wu, C., Tytgat, J., 2004. BmTx3, a scorpion toxin with two putative functional faces separately active on A-type K<sup>+</sup> and HERG currents. *Biochemical journal* 378, 745-752.
- Isbrandt, D., Leicher, T., Waldschütz, R., Zhu, X., Luhmann, U., Michel, U., Sauter, K., Pongs, O., 2000. Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I<sub>TO</sub> and I<sub>SA</sub>. *Genomics* 64, 144-154.
- Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y., Kurachi, Y., 1996. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6. 2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry* 271, 24321-24324.
- Iwashima, Y., Pugh, W., Depaoli, A.M., Takeda, J., Seino, S., Bell, G.I., Polonsky, K.S., 1993. Expression of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets and downregulation after glucose infusion. *Diabetes* 42, 948-955.
- Jackson, W.F., 2000. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35, 173-178.
- Jackson, W.F., 2005. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12, 113-127.
- Jacobson, D., Philipson, L., 2007. Action potentials and insulin secretion: new insights into the role of Kv channels. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9, 89-98.
- Jacobson, D.A., Kuznetsov, A., Lopez, J.P., Kash, S., Ämmälä, C.E., Philipson, L.H., 2007. Kv2. 1 ablation alters glucose-induced islet electrical activity, enhancing insulin secretion. *Cell metabolism* 6, 229-235.

- Jacobson, D.A., Mendez, F., Thompson, M., Torres, J., Cochet, O., Philipson, L.H., 2010. Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *The Journal of physiology* 588, 3525-3537.
- Jay, S., Sharp, A., Kahl, S., Vedvick, T., Harpold, M., Campbell, K., 1991. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *Journal of Biological Chemistry* 266, 3287-3293.
- Jay, S.D., Ellis, S.B., McCue, A.F., Williams, M.E., Vedvick, T.S., Harpold, M.M., Campbell, K.P., 1990. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248, 490-492.
- Ji, Y.H., Wang, W.X., Ye, J.G., He, L.L., Li, Y.J., Yan, Y.P., Zhou, Z., 2003. Martenotoxin, a novel K<sup>+</sup>-channel-blocking peptide: purification, cDNA and genomic cloning, and electrophysiological and pharmacological characterization. *Journal of neurochemistry* 84, 325-335.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R., 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515-522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R., 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423, 33-41.
- Jiménez-Vargas, J., Restano-Cassulini, R., Possani, L., 2012. Toxin modulators and blockers of hERG K<sup>+</sup> channels. *Toxicon* 60, 492-501.
- Jin, W., Lu, Z., 1998. A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 37, 13291-13299.
- Jing, X., Li, D.-Q., Olofsson, C.S., Salehi, A., Surve, V.V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., 2005. Ca<sup>v</sup>2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *The Journal of clinical investigation* 115, 146-154.
- Jouirou, B., Mosbah, A., Visan, V., Grissmer, S., M'BAREK, S., Fajloun, Z., Van Rietschoten, J., Devaux, C., Rochat, H., Lippens, G., 2004. Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K<sup>+</sup> channels. *Biochemical journal* 377, 37-49.
- Jungo, F., Bougueleret, L., Xenarios, I., Poux, S., 2012. The UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot program: a central hub of integrated venom protein data. *Toxicon* 60, 551-557.
- Kamb, A., Iverson, L.E., Tanouye, M.A., 1987. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50, 405-413.
- Kanemasa, T., Gan, L., Perney, T., Wang, L., Kaczmarek, L., 1995. Electrophysiological and pharmacological characterization of a mammalian Shaw channel expressed in NIH 3T3 fibroblasts. *Journal of Neurophysiology* 74, 207-217.
- Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., Mebs, D., 2003. A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42, 43-52.

- Kimm, T., Bean, B.P., 2014. Inhibition of A-type potassium current by the peptide toxin SNX-482. *Journal of Neuroscience* 34, 9182-9189.
- King, G.F., 2007. Modulation of insect Ca V channels by peptidic spider toxins. *Toxicon* 49, 513-530.
- Kinoshita, H., Azma, T., Nakahata, K., Iranami, H., Kimoto, Y., Dojo, M., Yuge, O., Hatano, Y., 2004. Inhibitory effect of high concentration of glucose on relaxations to activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in human omental artery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 2290-2295.
- Kitaguchi, T., Oya, M., Wada, Y., Tsuboi, T., Miyawaki, A., 2013. Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochemical Journal* 450, 365-373.
- Knaus, H.-G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Smith, M., Swanson, R., 1994. Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* 269, 17274-17278.
- Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C., Kinzie, J.M., 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *science* 273, 1709.
- Koppenhöfer, E., Schmidt, H., 1968a. Effect of scorpion venom on ionic currents of the node of Ranvier. I. The permeabilities P<sub>Na</sub> and P<sub>K</sub>. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 303, 133-149.
- Koppenhöfer, E., Schmidt, H., 1968b. Effect of scorpion venom on ionic currents of the node of Ranvier. II. Incomplete sodium inactivation. *Pflügers Archiv* 303, 150-161.
- Korolkova, Y.V., Bocharov, E.V., Angelo, K., Maslennikov, I.V., Grinenko, O.V., Lipkin, A.V., Nosyreva, E.D., Pluzhnikov, K.A., Olesen, S.-P., Arseniev, A.S., 2002. New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1. *Journal of Biological Chemistry* 277, 43104-43109.
- Korolkova, Y.V., Tseng, G.N., Grishin, E.V., 2004. Unique interaction of scorpion toxins with the hERG channel. *Journal of Molecular Recognition* 17, 209-217.
- Koschak, A., Pinggera, A., Schicker, K., Striessnig, J., 2014. Role of L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Sensory Cells, Pathologies of Calcium Channels. Springer, pp. 47-75.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., Striessnig, J., 2001.  $\alpha$ 1D (Cav1.3) subunits can form L-type Ca<sup>2+</sup> channels activating at negative voltages. *Journal of Biological Chemistry* 276, 22100-22106.
- Koster, J.C., Permutt, M.A., Nichols, C.G., 2005. Diabetes and Insulin Secretion. *Diabetes* 54, 3065-3072.
- Kramer, J., Post, M., Brown, A., Kirsch, G., 1998. Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1  $\alpha$ -subunits. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 274, C1501-C1510.
- Kubista, H., Mafra, R.A., Chong, Y., Nicholson, G.M., Beirão, P.S., Cruz, J.S., Boehm, S., Nentwig, W., Kuhn-Nentwig, L., 2007. CSTX-1, a toxin from the venom of the hunting spider *Cupiennius salei*, is a selective blocker of L-type calcium channels in mammalian neurons. *Neuropharmacology* 52, 1650-1662.

- Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., Vandenberg, C.A., 2005. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacological reviews* 57, 509-526.
- Kuo, M.M.-C., Haynes, W.J., Loukin, S.H., Kung, C., Saimi, Y., 2005. Prokaryotic K<sup>+</sup> channels: from crystal structures to diversity. *FEMS microbiology reviews* 29, 961-985.
- Kuzmenkov, A., Grishin, E., Vassilevski, A., 2015. Diversity of potassium channel ligands: focus on scorpion toxins. *Biochemistry (Moscow)* 80, 1764-1799.
- Kuzmenkov, A.I., Krylov, N.A., Chugunov, A.O., Grishin, E.V., Vassilevski, A.A., 2016. Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database* 2016, baw056.
- Landoulsi, Z., Miceli, F., Palmese, A., Amoresano, A., Marino, G., El Ayeub, M., Tagliatela, M., Benkhalifa, R., 2013. Subtype-Selective Activation of Kv7 Channels by AaTXKβ (2–64), a Novel Toxin Variant from the *Androctonus australis* Scorpion Venom. *Molecular pharmacology* 84, 763-773.
- Lebrun, B., Régine, R.-L., Martin-Eauclaire, M.-F., YASUDA, A., ISHIGURO, M., OYAMA, Y., PONGS, O., NAKAJIMA, T., 1997. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochemical journal* 328, 321-327.
- Lee, J.-H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klöckner, U., Schneider, T., Perez-Reyes, E., 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *Journal of Neuroscience* 19, 1912-1921.
- Lee, K.P.K., Chen, J., MacKinnon, R., 2017. Molecular structure of human KATP in complex with ATP and ADP. *Elife* 6, e32481.
- Legros, C., Céard, B., Vacher, H., Marchot, P., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.-F., 2005. Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1723, 91-99.
- Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, A., Langel, Ü., 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends in pharmacological sciences* 21, 99-103.
- Liu, S., Bian, X., Lockless, S.W., 2012. Preferential binding of K<sup>+</sup> ions in the selectivity filter at equilibrium explains high selectivity of K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* 140, 671-679.
- Loane, D.J., Lima, P.A., Marrion, N.V., 2007. Co-assembly of N-type Ca<sup>2+</sup> and BK channels underlies functional coupling in rat brain. *Journal of Cell Science* 120, 985-995.
- Lockless, S.W., Zhou, M., MacKinnon, R., 2007. Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *PLoS Biol* 5, e121.
- Long, S.B., Campbell, E.B., MacKinnon, R., 2005. Voltage sensor of Kv1. 2: structural basis of electromechanical coupling. *science* 309, 903-908.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., MacKinnon, R., 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376-382.

Lourenço, W., 1981. Sur la distribution géographique et l'écologie de *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones, Scorpionidae). *Revista brasileira de biologia*.

Lourenço, W., 1991. Scorpion species biodiversity in tropical South-America and its application in conservation programs, *American Zoologist*. Amer Soc Zoologists 1041 New Hampshire ST, Lawrence, KS 66044, pp. A85-A85.

Lourenço, W., Von Eickstedt, V., Cardoso, J., Siqueira-França, F., Wen, F., Santana Málaque, C., and Haddad Jr, V. , 2003a. Escorpiões de importância médica. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, 182-197.

Lourenço, W.R., 2002. *Scorpions of Brazil*. Ed. de l'If, Paris, 308.

Lourenço, W.R., Eickstedt, V.R.D, 2003b. Escorpiões de Importância Médica. *Sarvier*, 182–208.

Lourenço, W.R., Fe, N.F., 2003. Description of a new species of *Opisthacanthus* PETERS (Scorpiones, Liochelidae) to Brazilian Amazonia. *Revista ibérica de aracnología*, 81-88.

Lu, Z., MacKinnon, R., 1997. Purification, characterization, and synthesis of an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel inhibitor from scorpion venom. *Biochemistry* 36, 6936-6940.

Lucas, S., Meier, J., 1995. Biology and distribution of scorpions of medical importance. *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* 1, 205-219.

Lucas, S., Silva Júnior, P., Schuartsman, S., 1992. Escorpiões de interesse médico no Brasil. *Schuartsman S. Plantas venenosas e animais peçonhentos* 2, 288.

Lucchesi, K., Ravindran, A., Young, H., Moczydlowski, E., 1989. Analysis of the blocking activity of charybdotoxin homologs and iodinated derivatives against Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *The Journal of membrane biology* 109, 269-281.

Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Brüggemann, A., Pardo, L., Marquardt, A., Stühmer, W., Pongs, O., 1994. Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether-a-go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *The EMBO Journal* 13, 4451.

Ludwig, J., Weseloh, R., Karschin, C., Liu, Q., Netzer, R., Engeland, B., Stansfeld, C., Pongs, O., 2000. Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16, 59-70.

Lukesh III, J.C., Palte, M.J., Raines, R.T., 2012. A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid. *Journal of the American Chemical Society* 134, 4057-4059.

Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernández, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C.V., Winkel, K.D., Possani, L.D., 2013. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon* 63, 44-54.

- Luo, F., Zeng, X.-C., Hahin, R., Cao, Z.-J., Liu, H., Li, W.-X., 2005. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism. *Peptides* 26, 2427-2433.
- M'barek, S., Mosbah, A., Sandoz, G., Fajloun, Z., Olamendi-Portugal, T., Rochat, H., Sampieri, F., Guijarro, J.I., Mansuelle, P., Delepierre, M., 2003. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Biochemistry* 270, 3583-3592.
- Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., Cao, Z., 2012. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *Journal of proteomics* 75, 1563-1576.
- Ma, Y., Zhao, R., He, Y., Li, S., Liu, J., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2009. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. *BMC genomics* 10, 290.
- Ma, Y., Zhao, Y., Zhao, R., Zhang, W., He, Y., Wu, Y., Cao, Z., Guo, L., Li, W., 2010. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. *Proteomics* 10, 2471-2485.
- MacDonald, P.E., Ha, X.F., Wang, J., Smukler, S.R., Sun, A.M., Gaisano, H.Y., Salapatek, A.M.F., Backx, P.H., Wheeler, M.B., 2001. Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K<sup>+</sup> channel families regulate insulin secretion. *Molecular endocrinology* 15, 1423-1435.
- MacDonald, P.E., Sewing, S., Wang, J., Joseph, J.W., Smukler, S.R., Sakellaropoulos, G., Wang, J., Saleh, M.C., Chan, C.B., Tsushima, R.G., 2002. Inhibition of Kv2. 1 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44938-44945.
- MacKinnon, R., 2003. Potassium channels. *FEBS letters* 555, 62-65.
- Maffie, J.K., Dvoretzkova, E., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., Rudy, B., 2013. Dipeptidyl-peptidase-like-proteins confer high sensitivity to the scorpion toxin AmmTX3 to Kv4-mediated A-type K<sup>+</sup> channels. *The Journal of Physiology* 591, 2419-2427.
- Martin-Eauclaire, M.-F., Bougis, P.E., 2012. Potassium Channels Blockers from the Venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Journal of toxicology* 2012.
- Martin, S., De Oliveira, C.L., De Queiroz, F.M., Pardo, L.A., Stühmer, W., Del Bel, E., 2008. Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain. *Neuroscience* 155, 833-844.
- Martínez, F., Muñoz-Garay, C., Gurrola, G., Darszon, A., Possani, L., Becerril, B., 1998. Site directed mutants of Noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. *FEBS letters* 429, 381-384.
- Matthews, E.A., Bee, L.A., Stephens, G.J., Dickenson, A.H., 2007. The Cav2. 3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience* 25, 3561-3569.

- McIntosh, J.M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A.B., Vincler, M., 2009. Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochemical pharmacology* 78, 693-702.
- McManus, O.B., Helms, L.M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., Leonard, R.J., 1995. Functional role of the  $\beta$  subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 14, 645-650.
- Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z., Toro, L., 1996. A calcium switch for the functional coupling between  $\alpha$  (hslo) and  $\beta$  subunits (KV, Ca  $\beta$ ) of maxi K channels. *FEBS letters* 382, 84-88.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., Toro, L., 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 14066-14071.
- Meera, P., Wallner, M., Toro, L., 2000. A neuronal  $\beta$  subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5562-5567.
- Meera, P., Wallner, M., Toro, L., 2001. Molecular biology of high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels, *Potassium channels in cardiovascular biology*. Springer, pp. 49-70.
- Ménez, A., 1998. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* 36, 1557-1572.
- Merkler, D.J., 1994. C-terminal amidated peptides: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. *Enzyme and microbial technology* 16, 450-456.
- Meves, H., SIMARD, J., Watt, D.D., 1986. Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. *Annals of the New York Academy of Sciences* 479, 113-132.
- Milescu, M., Lee, H.C., Bae, C.H., Kim, J.I., Swartz, K.J., 2013. Opening the shaker K<sup>+</sup> channel with hanatoxin. *The Journal of general physiology* 141, 203-216.
- Miller, C., 1995. The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides. *Neuron* 15, 5-10.
- Miller, C., 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome biology* 1, reviews0004. 0001.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., Phillips, M., 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313, 316-318.
- Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P., Adams, M.E., 1992. P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature* 355, 827.
- Miura, H., Wachtel, R.E., Loberiza, F.R., Saito, T., Miura, M., Nicolosi, A.C., Gutterman, D.D., 2003. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles. *Circulation research* 92, 151-158.
- Möller, C., Rahmankhah, S., Lauer-Fields, J., Bubis, J., Fields, G.B., Marí, F., 2005. A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs  $\alpha/\alpha$ ) fold. *Biochemistry* 44, 15986-15996.

- Moreels, L., Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Vriens, K., Waelkens, E., Zhu, S., Thevissen, K., Cammue, B.P., Sato, K., Tytgat, J., 2016. Expanding the pharmacological profile of  $\kappa$ -hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel K v 10.1. *Peptides*.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.-S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., 1991. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350, 398.
- Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., Sabatier, J.-M., 2008. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Current pharmaceutical design* 14, 2503-2518.
- Mouhat, S., Mosbah, A., Visan, V., Wulff, H., Delepierre, M., Darbon, H., Grissmer, S., De Waard, M., Sabatier, J.-M., 2004. The functional dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1. 2 potassium channels. *Biochemical journal* 377, 25-36.
- Namkung, Y., Skrypnik, N., Jeong, M.-J., Lee, T., Lee, M.-S., Kim, H.-L., Chin, H., Suh, P.-G., Kim, S.-S., Shin, H.-S., 2001. Requirement for the L-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$  1D subunit in postnatal pancreatic  $\beta$  cell generation. *The Journal of clinical investigation* 108, 1015-1022.
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X.-h., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., 1998. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37, 15353-15362.
- Nichols, C.G., 2006. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470-476.
- Nirathanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J.S., Sato, K., Tytgat, J., 2005. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to  $\kappa$ -KTx1. 3, a non-toxic homologue of  $\kappa$ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochemical pharmacology* 69, 669-678.
- Noma, A., 1983. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147-148.
- Norton, R.S., McDonough, S.I., 2008. Peptides targeting voltage-gated calcium channels. *Current pharmaceutical design* 14, 2480-2491.
- Norton, R.S., Olivera, B.M., 2006. Conotoxins down under. *Toxicon* 48, 780-798.
- Noskov, S.Y., Roux, B., 2006. Ion selectivity in potassium channels. *Biophysical chemistry* 124, 279-291.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W., 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440.
- Ohkubo, T., Yamazaki, J., Kitamura, K., 2010. Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> Channels Cav3. 1 and Cav3. 2. *Journal of pharmacological sciences* 112, 452-458.
- Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Shindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M., Kurachi, Y., 1998. The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6. 2 complex K<sup>+</sup> channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflügers Archiv* 435, 595-603.

Olamendi-Portugal, T., García, B.I., López-González, I., Van Der Walt, J., Dyason, K., Ulens, C., Tytgat, J., Felix, R., Darszon, A., Possani, L.D., 2002. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. *Biochemical and biophysical research communications* 299, 562-568.

Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Curz, L.J., Luque, F., Gray, W.R., 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23, 5087-5090.

Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.E., 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the  $\omega$ -conotoxins and  $\omega$ -agatoxins. *Annual review of biochemistry* 63, 823-867.

Ortner, N.J., Bock, G., Dougalis, A., Kharitonova, M., Duda, J., Hess, S., Tuluc, P., Pomberger, T., Stefanova, N., Pitterl, F., 2017. Lower affinity of isradipine for L-Type Ca<sup>2+</sup> channels during substantia nigra dopamine neuron-like activity: Implications for neuroprotection in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* 37, 6761-6777.

Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A., Pardo, L.A., 2016. Kv10. 1 K<sup>+</sup> channel: from physiology to cancer. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 468, 751-762.

Pal, A., Debreczeni, J.E., Sevana, M., Gruene, T., Kahle, B., Zeeck, A., Sheldrick, G.M., 2008. Structures of viscotoxins A1 and B2 from European mistletoe solved using native data alone. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 64, 985-992.

Panyi, G., Possani, L., de la Vega, R.R., Gaspar, R., Varga, Z., 2006. K<sup>+</sup> channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Current pharmaceutical design* 12, 2199-2220.

Papp, F., Batista, C.V., Varga, Z., Herceg, M., Román-González, S.A., Gaspar, R., Possani, L.D., Panyi, G., 2009. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1. 2 and Kv1. 3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 54, 379-389.

Pardo-Lopez, L., Zhang, M., Liu, J., Jiang, M., Possani, L.D., Tseng, G.-N., 2002. Mapping the Binding Site of a Human ether-a-go-go-related Gene-specific Peptide Toxin (ErgTx) to the Channel's Outer Vestibule. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16403-16411.

Pardo, L.A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., Stühmer, W., 1999. Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *The EMBO Journal* 18, 5540-5547.

Pardo, L.A., Gomez-Varela, D., Major, F., Sansuk, K., Leurs, R., Downie, B.R., Tietze, L., Stuhmer, W., 2012. Approaches targeting Kv10. 1 open a novel window for cancer diagnosis and therapy. *Current medicinal chemistry* 19, 675-682.

Pardo, L.A., Stühmer, W., 2008. Eag1 as a cancer target. *Expert opinion on therapeutic targets* 12, 837-843.

Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Goto, H., Srinivasan, K.N., Gopalakrishnakone, P., Tytgat, J., Sato, K., 2013. Synthesis and characterization of amino acid deletion analogs of  $\kappa$ -hefutoxin 1, a scorpion toxin on potassium channels. *Toxicon* 71, 25-30.

Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Lee, J.-H., 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391, 896.

Pexton, T., Moeller-Bertram, T., Schilling, J.M., Wallace, M.S., 2011. Targeting voltage-gated calcium channels for the treatment of neuropathic pain: a review of drug development. *Expert opinion on investigational drugs* 20, 1277-1284.

Plant, L.D., Rajan, S., Goldstein, S.A., 2005. K2P channels and their protein partners. *Current opinion in neurobiology* 15, 326-333.

Polis, G.A., 1990. *The biology of scorpions*. Stanford University Press.

Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., BÄHRING, R., Wray, D., Giese, K.P., Silva, A.J., Storm, J.F., 1999. Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel  $\beta$  Subunits. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 344-355.

Pongs, O., Schwarz, J.R., 2010. Ancillary subunits associated with voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Physiological reviews* 90, 755-796.

Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *European Journal of Biochemistry* 264, 287-300.

Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., 1982. The primary structure of noxiustoxin: AK<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *centruroides noxius hoffmanni*. *Carlsberg Research Communications* 47, 285-289.

Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82, 861-868.

Powell, J., Fischer, W., Park, M., Craig, A., Rivier, J., White, S., Francis, R., Fernald, R., Licht, P., Warby, C., 1995. Primary structure of solitary form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cichlid pituitary; three forms of GnRH in brain of cichlid and pumpkinseed fish. *Regulatory peptides* 57, 43-53.

Prendini, L., Wheeler, W.C., 2005. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics* 21, 446-494.

Qian, A., Song, D., Li, Y., Liu, X., Tang, D., Yao, W., Yuan, Y., 2013. Role of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels in rat visceral hypersensitivity change induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Molecular pain* 9, 15.

Quayle, J.M., Nelson, M., Standen, N., 1997. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiological reviews* 77, 1165-1232.

Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J., Gurrola, G., Valdivia, H., Possani, L., 2013. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 76, 328-342.

Ramu, Y., Xu, Y., Lu, Z., 2018. A novel high-affinity inhibitor against the human ATP-sensitive Kir6. 2 channel. *The Journal of general physiology* 150, 969-976.

Randall, A., Tsien, R.W., 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience* 15, 2995-3012.

- Rehak, R., Bartoletti, T.M., Engbers, J.D., Berecki, G., Turner, R.W., Zamponi, G.W., 2013. Low voltage activation of KCa1.1 current by Cav3-KCa1.1 complexes. *PLoS one* 8, e61844.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O., Pongs, O., 1994. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of  $\beta$ -subunit. *Nature* 369, 289-294.
- Reuter, H., 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 301, 569.
- Reynolds, I.J., Wagner, J.A., Snyder, S.H., Thayer, S.A., Olivera, B.M., Miller, R.J., 1986. Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by omega-conotoxin fraction GVIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 8804-8807.
- Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C., Laffitte, D., Bertin, D., Ouafik, L.H., Luis, J., 2011. Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides* 32, 656-663.
- Rodríguez-Rasgado, J.A., Acuña-Macías, I., Camacho, J., 2012. Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors* 12, 5986-5995.
- Rodríguez De La Vega, R.C., Merino, E., Becerril, B., Possani, L.D., 2003. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 222-227.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. *Toxicon* 46, 831-844.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Vidal, N., Lourival, D., Possani, L.D., Vidal, N., Lourival, D., Possani, L.D., 2013. Scorpion peptides. In: Sabatier, J.M., section ed. *Scorpion Venom Peptides. Handbook of Biologically Active Peptides*, second ed. Academic Press, 423–429
- Rodríguez de la Vega, R.C.R., Possani, L.D., 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 49, 171-180.
- Rodríguez de la Vega, R.C.R.g., Possani, L.D., 2004. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup> channels. *Toxicon* 43, 865-875.
- Roe, M.W., Worley, J.F., Mittal, A.A., Kuznetsov, A., DasGupta, S., Mertz, R.J., Witherspoon, S.M., Blair, N., Lancaster, M.E., McIntyre, M.S., 1996. Expression and Function of Pancreatic  $\beta$ -Cell Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Channels ROLE IN STIMULUS-SECRETION COUPLING. *Journal of Biological Chemistry* 271, 32241-32246.
- Rogowski, R.S., Collins, J.H., O'Neill, T.J., Gustafson, T.A., Werkman, T.R., Rogawski, M.A., Tenenholz, T.C., Weber, D.J., Blaustein, M.P., 1996. Three new toxins from the scorpion *Pandinus imperator* selectively block certain voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Molecular pharmacology* 50, 1167-1177.
- Rogowski, R.S., Krueger, B.K., Collins, J.H., Blaustein, M.P., 1994. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K<sup>+</sup> channels and unblocks inactivating K<sup>+</sup> channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 1475-1479.

Romi, R., Crest, M., Gola, M., Sampieri, F., Jacquet, G., Zerrouk, H., Mansuelle, P., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Rochat, H., 1993. Synthesis and characterization of kaliotoxin. Is the 26-32 sequence essential for potassium channel recognition? *Journal of Biological Chemistry* 268, 26302-26309.

Roosild, T.P., Miller, S., Booth, I.R., Choe, S., 2002. A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. *Cell* 109, 781-791.

Rorsman, P., Braun, M., 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual review of physiology* 75, 155-179.

Rorsman, P., Braun, M., Zhang, Q., 2012a. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell calcium* 51, 300-308.

Rorsman, P., Braun, M., Zhang, Q., 2012b. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell calcium* 51, 300-308.

Rudy, B., Chow, A., Lau, D., Amarillo, Y., Ozaita, A., Saganich, M., Moreno, H., Nadal, M.S., HERNANDEZ-PINEDA, R., HERNANDEZ-CRUZ, A., 1999. Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 304-343.

Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi, V., Hofmann, F., 1989. Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245, 1115-1118.

Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Minowa, O., Kazuno, A.-a., Han, W., Matsuda, Y., Yamanaka, H., Osanai, M., Noda, T., 2000. Altered pain responses in mice lacking  $\alpha 1E$  subunit of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6132-6137.

Saganich, M., de Miera, E.V.-S., Nadal, M., Baker, H., Coetzee, W., Rudy, B., 1999. Cloning of components of a novel subthreshold-activating  $K^{+}$  channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 19, 10789-10802.

Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., Wei, A., 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 921-931.

Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., Keating, M.T., 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the  $IKr$  potassium channel. *Cell* 81, 299-307.

Sansom, M.S., Shrivastava, I.H., Bright, J.N., Tate, J., Capener, C.E., Biggin, P.C., 2002. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1565, 294-307.

Santana, F., Michelena, P., Jaén, R., García, A.G., Borges, R., 1999. Calcium channel subtypes and exocytosis in chromaffin cells: a different view from the intact rat adrenal. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 360, 33-37.

Sather, W., Tanabe, T., Zhang, J.-F., Mori, Y., Adams, M.a., Tsien, R., 1993. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel  $\alpha 1$  subunits. *Neuron* 11, 291-303.

Saucedo, A.L., Flores-Solis, D., de la Vega, R.C.R., Ramírez-Cordero, B., Hernández-López, R., Cano-Sánchez, P., Navarro, R.N., García-Valdés, J., Coronas-Valderrama, F., de Roodt, A., 2012. New tricks of

an old pattern structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *Journal of Biological Chemistry* 287, 12321-12330.

Savarin, P., Guennegues, M., Gilquin, B., Lamthanh, H., Gasparini, S., Zinn-Justin, S., Ménez, A., 1998. Three-Dimensional Structure of  $\kappa$ -Conotoxin PVIIA, a Novel Potassium Channel-Blocking Toxin from Cone Snails†. *Biochemistry* 37, 5407-5416.

Scott, V., Rettig, J., Parcej, D., Keen, J., Findlay, J., Pongs, O., Dolly, J., 1994. Primary structure of a beta subunit of alpha-dendrotoxin-sensitive K<sup>+</sup> channels from bovine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 1637-1641.

Schmalhofer, W.A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M.G., Weinglass, A.B., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., Koltzenburg, M., Priest, B.T., 2008. ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Molecular pharmacology* 74, 1476-1484.

Schneider, T., Dibué, M., Hescheler, J., 2013. How “Pharmacoresistant” is Cav2.3, the major component of voltage-gated R-type Ca<sup>2+</sup> channels? *Pharmaceuticals* 6, 759-776.

Scholze, A., Plant, T., Dolphin, A., Nurnberg, B., 2001. Functional expression and characterization of a voltage-gated Ca<sup>v</sup>1.3 (alpha (1D)) L-type Ca<sup>2+</sup> channel subunit from an insulin-secreting cell line. *NS ARCH PHARMACOL* 363, R58-R58.

Schroeder, N., Mullmann, T.J., Schmalhofer, W., Gao, Y.-D., Garcia, M.L., Giangiacomo, K.M., 2002. Glycine 30 in iberitoxin is a critical determinant of its specificity for maxi-K versus KV channels. *FEBS letters* 527, 298-302.

Schulla, V., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., 2003. Impaired insulin secretion and glucose tolerance in  $\beta$  cell-selective Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice. *The EMBO journal* 22, 3844-3854.

Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dörschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C., Bryan, J., 1998. Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *The EMBO Journal* 17, 5529-5535.

Schwappach, B., Zerangue, N., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2000. Molecular basis for K<sup>+</sup> ATP assembly: transmembrane interactions mediate association of a K<sup>+</sup> channel with an ABC transporter. *Neuron* 26, 155-167.

Schwartz, E.F., Bartok, A., Schwartz, C.A., Papp, F., Gómez-Lagunas, F., Panyi, G., Possani, L.D., 2013. OcyKTx2, a new K<sup>+</sup>-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 46, 40-46.

Schwartz, E.F., Camargos, T.S., Zamudio, F.Z., Silva, L.P., Bloch, C., Caixeta, F., Schwartz, C.A., Possani, L.D., 2008. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 51, 1499-1508.

Schwartz, E.F., Capes, E.M., Diego-García, E., Zamudio, F.Z., Fuentes, O., Possani, L.D., Valdivia, H.H., 2009. Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *British journal of pharmacology* 157, 392-403.

Schwartz, E.F., Diego-Garcia, E., de la Vega, R.C.R., Possani, L.D., 2007. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC genomics* 8, 119.

Schweitz, H., Heurteaux, C., Bols, P., Moinier, D., Romey, G., Lazdunski, M., 1994. Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca<sup>2+</sup> channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 878-882.

Shabbir, W., Beyl, S., Timin, E., Schellmann, D., Erker, T., Hohaus, A., Hockerman, G., Hering, S., 2011. Interaction of diltiazem with an intracellularly accessible binding site on Ca<sub>v</sub>1. 2. *British journal of pharmacology* 162, 1074-1082.

Shahbazzadeh, D., Srairi-Abid, N., Feng, W., Ram, N., Borchani, L., Ronjat, M., Akbari, A., Pessah, I.N., De Waard, M., El Ayeb, M., 2007. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochemical journal* 404, 89-96.

Shakkottai, V.G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M.D., Gargus, J.J., Sabatier, J.-M., Chandy, K.G., 2001. Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel, SkCa<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43145-43151.

Shi, W., Wang, H.S., Pan, Z., Wymore, R.S., Cohen, I.S., McKinnon, D., Dixon, J.E., 1998. Cloning of a mammalian elk potassium channel gene and EAG mRNA distribution in rat sympathetic ganglia. *The Journal of Physiology* 511, 675-682.

Shi, W., Wymore, R.S., Wang, H.-S., Pan, Z., Cohen, I.S., McKinnon, D., Dixon, J.E., 1997. Identification of Two Nervous System-Specific Members of the eerg Potassium Channel Gene Family. *Journal of Neuroscience* 17, 9423-9432.

Shyng, S.-L., Nichols, C., 1997. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *The Journal of general physiology* 110, 655-664.

Sidach, S.S., Mintz, I.M., 2002. Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high-and low-threshold Ca channels. *Journal of Neuroscience* 22, 2023-2034.

Silva, É.C., Camargos, T.S., Maranhão, A.Q., Silva-Pereira, I., Silva, L.P., Possani, L.D., Schwartz, E.F., 2009. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 54, 252-261.

Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renström, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschütz, R., 2004. Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic  $\beta$  cell and cardiovascular function by L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *The Journal of clinical investigation* 113, 1430-1439.

Sissom, W., 1990. Systematics, biogeography and paleontology. *The biology of scorpions*, 64-160.

Smith, J.J., Hill, J.M., Little, M.J., Nicholson, G.M., King, G.F., Alewood, P.F., 2011. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 10478-10483.

- Snutch, T.P., Tomlinson, W.J., Leonard, J.P., Gilbert, M.M., 1991. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 7, 45-57.
- Soldovieri, M.V., Miceli, F., Tagliatalata, M., 2011. Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology* 26, 365-376.
- Soleglad, M.E., Fet, V., Kovařík, F., 2015. The systematic position of the scorpion genera *Heteroscorpion* Birula, 1903 and *Urodacus* Peters, 1861 (Scorpiones: Scorpionoidea). *Euscorpium* 2005, 1-37.
- Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Snutch, T., 1993. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133-1136.
- Spruce, A., Standen, N., Stanfield, P., 1987. Studies of the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 382, 213-236.
- Srinivasan Kellathur, N., Vaithiyalingam, S., Isabelle, H., Toru, S., Betty, C., 2002. Kumar Thallampuranam Krishnaswamy S, Sato Kazuki, Tytgat Jan, Yu Chin, San B Chia Cheng, et al. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J Biol Chem* 277, 30040-30047.
- Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., Miller, C., 1994. Intimations of potassium channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 33, 443-450.
- Stea, A., Tomlinson, W.J., Soong, T.W., Bourinet, E., Dubel, S.J., Vincent, S.R., Snutch, T.P., 1994. Localization and functional properties of a rat brain alpha 1A calcium channel reflect similarities to neuronal Q-and P-type channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 10576-10580.
- Stevens, L., Ju, M., Wray, D., 2009. Roles of surface residues of intracellular domains of heag potassium channels. *European Biophysics Journal* 38, 523-532.
- Strom, T.M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B.H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Rüther, K., Drescher, B., 1998. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature genetics* 19, 260.
- Su, J., Yu, H., Lenka, N., Hescheler, J., Ullrich, S., 2001. The expression and regulation of depolarization-activated K<sup>+</sup> channels in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflügers Archiv* 442, 49-56.
- Suzuki, M., Li, R.A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marbán, E., 2001. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6. 2-knockout mice. *Circulation research* 88, 570-577.
- Swartz, K.J., 2004. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 905-916.
- Swartz, K.J., 2007. Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon* 49, 213-230.
- Swartz, K.J., MacKinnon, R., 1995. An inhibitor of the Kv2. 1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 15, 941-949.

- Swayne, L.A., Bourinet, E., 2008. Voltage-gated calcium channels in chronic pain: emerging role of alternative splicing. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 456, 459-466.
- Szopa, J., 1973. Interaction with DNA of the acetylated and non-acetylated polyvalent basic trypsin inhibitor of the Kunitz type. *Acta biochimica Polonica* 21, 151-157.
- Tan, P.T., Veeramani, A., Srinivasan, K.N., Ranganathan, S., Brusic, V., 2006. SCORPION2: a database for structure–function analysis of scorpion toxins. *Toxicon* 47, 356-363.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S., 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313.
- Taylor, J.T., Huang, L., Keyser, B.M., Zhuang, H., Clarkson, C.W., Li, M., 2005. Role of high-voltage-activated calcium channels in glucose-regulated  $\beta$ -cell calcium homeostasis and insulin release. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 289, E900-E908.
- Teramoto, N., 2006. Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. *The Journal of Physiology* 572, 617-624.
- Thompson, A.N., Kim, I., Panosian, T.D., Iverson, T.M., Allen, T.W., Nimigean, C.M., 2009. Mechanism of potassium-channel selectivity revealed by Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> binding sites within the KcsA pore. *Nature structural & molecular biology* 16, 1317-1324.
- Treptow, W., Tarek, M., 2006. K<sup>+</sup> conduction in the selectivity filter of potassium channels is monitored by the charge distribution along their sequence. *Biophysical Journal* 91, L81-L83.
- Treptow, W., Tarek, M., Klein, M.L., 2009. Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *Journal of the American Chemical Society* 131, 2107-2109.
- Turner, R.W., Zamponi, G.W., 2014. T-type channels buddy up. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 466, 661-675.
- Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.-F., van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms:  $\alpha$ -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences* 20, 444-447.
- Tytgat, J., Vandenberghe, I., Ulens, C., Van Beeumen, J., 2001. New polypeptide components purified from mamba venom. *FEBS letters* 491, 217-221.
- Uawonggul, N., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Arkaravichien, T., Bunyatratthata, W., Ruangjirachuporn, W., Jeerranaiprepame, P., Nakamura, T., Matsuda, M., Kobayashi, M., 2007. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon* 49, 19-29.
- Uebele, V.N., Lagrutta, A., Wade, T., Figueroa, D.J., Liu, Y., McKenna, E., Austin, C.P., Bennett, P.B., Swanson, R., 2000. Cloning and functional expression of two families of  $\beta$ -subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23211-23218.

- Uhde, I., Toman, A., Gross, I., Schwanstecher, C., Schwanstecher, M., 1999. Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *Journal of Biological Chemistry* 274, 28079-28082.
- Valdivia, H.H., Possani, L.D., 1998. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *Trends in cardiovascular medicine* 8, 111-118.
- Vandendriessche, T., Kopljar, I., Jenkins, D.P., Diego-Garcia, E., Abdel-Mottaleb, Y., Vermassen, E., Clynen, E., Schoofs, L., Wulff, H., Snyder, D., 2012. Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (*Heterometrus laoticus*): The first member of a new  $\kappa$ -KTX subfamily. *Biochemical pharmacology* 83, 1307-1317.
- Velasco, M., Díaz-García, C.M., Larqué, C., Hiriart, M., 2016. Modulation of ionic channels and insulin secretion by drugs and hormones in pancreatic beta cells. *Molecular pharmacology* 90, 341-357.
- Wallner, M., Meera, P., Toro, L., 1996. Determinant for  $\beta$ -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^{+}$  channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14922-14927.
- Wallner, M., Meera, P., Toro, L., 1999. Molecular basis of fast inactivation in voltage and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels: a transmembrane  $\beta$ -subunit homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4137-4142.
- Wang, G., Dayanithi, G., Newcomb, R., Lemos, J.R., 1999. An R-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in neurohypophysial terminals preferentially regulates oxytocin secretion. *Journal of Neuroscience* 19, 9235-9241.
- Wang, G., Strichartz, G., 1983. Purification and physiological characterization of neurotoxins from venoms of the scorpions *centruroides sculpturatus* and *leiurus quinquestriatus*. *Molecular Pharmacology* 23, 519-533.
- Wang, J.M., Roh, S.H., Kim, S., Lee, C.W., Kim, J.I., Swartz, K.J., 2004. Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in  $\text{Kv}$  channels. *The Journal of general physiology* 123, 455-467.
- Wang, L., Sigworth, F.J., 2009. Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature* 461, 292-295.
- Watanabe, T.X., Itahara, Y., Kuroda, H., Chen, Y.-N., Kimura, T., Sakakibara, S., 1995. Smooth muscle relaxing and hypotensive activities of synthetic calciseptine and the homologous snake venom peptide FS2. *The Japanese Journal of Pharmacology* 68, 305-313.
- Wei, A., Solaro, C., Lingle, C., Salkoff, L., 1994. Calcium sensitivity of BK-type  $\text{KCa}$  channels determined by a separable domain. *Neuron* 13, 671-681.
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., Wulff, H., 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57, 463-472.
- Weinberger, H., Moran, Y., Gordon, D., Turkov, M., Kahn, R., Gurevitz, M., 2010. Positions under positive selection—key for selectivity and potency of scorpion  $\alpha$ -toxins. *Molecular biology and evolution* 27, 1025-1034.

- Weiser, M., De Miera, E.V.-S., Kentros, C., Moreno, H., Franzen, L., Hillman, D., Baker, H., Rudy, B., 1994. Differential expression of Shaw-related K<sup>+</sup> channels in the rat central nervous system. *Journal of Neuroscience* 14, 949-972.
- Wheeler, D.G., Groth, R.D., Ma, H., Barrett, C.F., Owen, S.F., Safa, P., Tsien, R.W., 2012. CaV1 and CaV2 channels engage distinct modes of Ca<sup>2+</sup> signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell* 149, 1112-1124.
- Wickenden, A.D., 2002. K<sup>+</sup> channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & therapeutics* 94, 157-182.
- Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B., Harpold, M.M., 1992a. Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257, 389-395.
- Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B., Harpold, M.M., 1992b. Structure and functional expression of  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8, 71-84.
- Wu, J.-J., He, L.-L., Zhou, Z., Chi, C.-W., 2002. Gene expression, mutation, and structure– function relationship of scorpion toxin BmP05 active on SKCa channels. *Biochemistry* 41, 2844-2849.
- Wu, W., Yin, S., Ma, Y., Wu, Y.L., Zhao, R., Gan, G., Ding, J., Cao, Z., Li, W., 2007. Molecular cloning and electrophysiological studies on the first K<sup>+</sup> channel toxin (LmKTx8) derived from scorpion *Lychas mucronatus*. *Peptides* 28, 2306-2312.
- Wulff, H., Zhorov, B.S., 2008. K<sup>+</sup> channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chemical reviews* 108, 1744-1773.
- Wykes, R.C., Bauer, C.S., Khan, S.U., Weiss, J.L., Seward, E.P., 2007. Differential regulation of endogenous N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel inactivation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin impacts on their ability to support exocytosis in chromaffin cells. *Journal of Neuroscience* 27, 5236-5248.
- Xu, C.-Q., Brône, B., Wicher, D., Bozkurt, Ö., Lu, W.-Y., Huys, I., Han, Y.-H., Tytgat, J., Van Kerkhove, E., Chi, C.-W., 2004. BmBKTx1, a novel Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34562-34569.
- Xu, C.-Q., Zhu, S.-Y., Chi, C.-W., Tytgat, J., 2003. Turret and pore block of K<sup>+</sup> channels: what is the difference? *Trends in pharmacological sciences* 24, 446-448.
- Yamajil, N., Dai, L., Sugase, K., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., Iwashita, T., 2004. IsTX の溶液構造 *Opisthacanthus madagascariensis* (Ischnuridae) 由来の雄サソリ毒素. *Eur J Biochem* 271, 3855-3864.
- Yang, S.-N., Berggren, P.-O., 2005. Ca V 2.3 channel and PKC $\lambda$ : new players in insulin secretion. *The Journal of clinical investigation* 115, 16-20.
- Yang, S.-N., Berggren, P.-O., 2006. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic  $\beta$ -cell physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews* 27, 621-676.

- Yang, S.-N., Shi, Y., Yang, G., Li, Y., Yu, J., Berggren, P.-O., 2014. Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling. *Cellular and molecular life sciences* 71, 4149-4177.
- Yokoyama, K., Kurihara, T., Saegusa, H., Zong, S., Makita, K., Tanabe, T., 2004. Blocking the R-type (Cav2. 3)  $\text{Ca}^{2+}$  channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. *European Journal of Neuroscience* 20, 3516-3519.
- Yuan, C.-H., He, Q.-Y., Peng, K., Diao, J.-B., Jiang, L.-P., Tang, X., Liang, S.-P., 2008. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS one* 3, e3414.
- Yuan, P., Leonetti, M.D., Pico, A.R., Hsiung, Y., MacKinnon, R., 2010. Structure of the human BK channel  $\text{Ca}^{2+}$ -activation apparatus at 3.0 Å resolution. *science* 329, 182-186.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., Aldrich, R.W., 1994. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *The Journal of general physiology* 103, 321-362.
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A.C., 2015. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological reviews* 67, 821-870.
- Zamudio, F.Z., Conde, R., Arévalo, C., Becerril, B., Martin, B.M., Valdivia, H.H., Possani, L.D., 1997. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 11886-11894.
- Zeng, X.-C., Wang, S.-X., Zhu, Y., Zhu, S.-Y., Li, W.-X., 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 25, 143-150.
- Zeng, X.-C., Zhang, L., Nie, Y., Luo, X., 2012. Identification and molecular characterization of three new  $\text{K}^{+}$ -channel specific toxins from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch revealing intronic number polymorphism and alternative splicing in duplicated genes. *Peptides* 34, 311-323.
- Zeng, X.C., Li, W.X., Wang, S.X., Zhu, S.Y., Luo, F., 2001. Precursor of a novel scorpion venom peptide (BmKn1) with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB life* 51, 117-120.
- Zhang, J.-F., Randall, A., Ellinor, P., Horne, W., Sather, W., Tanabe, T., Schwarz, T.a., Tsien, R., 1993. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32, 1075-1088.
- Zhang, M., Korolkova, Y.V., Liu, J., Jiang, M., Grishin, E.V., Tseng, G.-N., 2003. BeKm-1 is a HERG-specific toxin that shares the structure with ChTx but the mechanism of action with ErgTx1. *Biophysical Journal* 84, 3022-3036.
- Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., Cao, Z., 2011. SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PLoS one* 6, e27548.
- Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., Wenxin, L., 2006. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* 47, 348-355.

Zhou, Y., MacKinnon, R., 2003. The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *Journal of molecular biology* 333, 965-975.

Zhu, H.-L., Wassall, R.D., Cunnane, T.C., Teramoto, N., 2009. Actions of kurtotoxin on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na<sup>+</sup> currents, Na<sup>+</sup> V 1.6, in murine vas deferens myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 379, 453-460.

Zhu, S., Darbon, H., Dyason, K., Verdonck, F., Tytgat, J., 2003. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *The FASEB Journal* 17, 1765-1767.

Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., del Carmen Rodríguez, M., Lanz-Mendoza, H., Peigneur, S., Diego-Garcia, E., Martin-Eauclaire, M.-F., Tytgat, J., Possani, L.D., 2010. MeuTXKβ1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804, 872-883.

Zhu, S., Li, W., Zeng, X., Jiang, D., Mao, X., Liu, H., 1999. Molecular cloning and sequencing of two 'short chain' and two 'long chain' K<sup>+</sup> channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *FEBS letters* 457, 509-514.

Zhu, S., Tytgat, J., 2004. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61, 1751-1763.