

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS PEPTÍDEOS BLOQUEADORES DE
CANALIS PARA K^+ ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus* sp.**

HARRY MORALES DUQUE

BRASÍLIA DF, 2013

HARRY MORALES DUQUE

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS PEPTÍDEOS BLOQUEADORES DE
CANALIS PARA K⁺ ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus* sp.**

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação em
biologia molecular como requisito
parcial para obtenção do título de
mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth
Ferroni Schwartz

BRASÍLIA DF, 2013

Dissertação de Mestrado

Harry Morales Duque

Título:

**“CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS PEPTÍDEOS BLOQUEADORES
DE CANAIS PARA K⁺ ISOLADOS DA PEÇONHA DO
ESCORPIÃO *Tityus sp.*”**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz
CFS-IB-UnB
Presidente da banca

Profa. Dra. Simoni Campos Dias
Universidade Católica de Brasília,
UCB-DF - Membro titular

Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas
CEL-IB-UnB
Membro titular

Profa. Dra. Márcia Renata Mortari
CFS-IB-UnB
Suplente

Brasília, 28 de fevereiro de 2013.

*Dedico este, mi siguiente paso de formación
en la vida, con mucho cariño y alegría, a mi
hijo Daniel Alberto Morales Chicangana
quien es fuente de fuerza e inspiración.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido desenvolvido nem finalizado, se não houvesse a contribuição de todos. O que eu aprendi e adicionei ao conhecimento da minha vida durante estes dois anos é dada a boa vontade de todos. Por esta razão, sou grato a todas as pessoas que direta ou indiretamente favoreceram, não somente concluir este trabalho, mais que promoveram minha formação profissional como mestre e enriqueceram minha formação como pessoa.

Assim, primeiramente, eu agradeço ao governo do Brasil, que por meio das suas instituições, e órgãos de fomento e legislação, me permitiram concluir uma das etapas muito importantes para a formação da minha vida.

À Universidade de Brasília por me oferecer todas as ferramentas necessárias para a realização e desenvolvimento e conseqüentemente conclusão do meu trabalho. Agradeço ao biotério, e laboratórios onde realizei meus experimentos e professores que me deram suporte e instrução.

À CAPES REUNI por me fornecer suporte financeiro e por me promover na prática da docência, ao CNPq e à fapdf.

Agradeço muito à minha orientadora Elisabeth Ferroni Schwartz por me aceitar como seu estudante depositando toda sua confiança em mim e me ajudando em todos os sentidos, fazendo com que todo esforço feito fosse revertido em conhecimento.

Agradeço aos professores, colegas e laboratórios externos à Universidade de Brasília que fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho. Ao professor José Beltrán e à Carolina Bolaños do “Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Cauca, Colombia”. Ao doutor Carlos Bloch Jr. e o Eder Barbosa da CENARGEN, PIB da EMBRAPA. Ao doutor Jader Cruz e o Humberto Joca do laboratório de membranas excitáveis, ICB da UFMG, e, Ao doutor Lourival D. Possani e à doutora Rita Restano-Cassulini do “Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de México”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço enormemente às professoras, professores e colegas que se tornaram meus amigos, e a todos membros no laboratório LTxs que se tornaram família brasileira e verdadeiramente sem eles, não poderia ter desenvolvido meu trabalho.

À professora Márcia Renata Mortari, aos professores Carlos Schwartz, Osmino Rodrigues Jr. e Antonio Sebben. À professora Mariana de Castro e o Professor Wagner Fontes da bioquímica.

À minha colega Thalita Camargos que tornou-se uma irmã. Quando precisei de ajuda tanto pessoal quanto acadêmica, ela sempre estava por perto. Agradeço muito sua boa vontade.

À minha colega Caroline Barbosa por me aportar valiosa ajuda no meu trabalho, ao colega Fagner Neves pela transmissão de seu conhecimento, à Élide Cleyse Gomes por me ensinar e ajudar no convívio diário. Ao Jimmy Guerrero por facilitar a minha iniciação na pós-graduação e à Claudia Arenas pela companhia no desenvolvimento do projeto.

Agradeço muito à minha amiga Andrea Carvalho que também fez parte neste processo. Agradeço muito ela por ter compartilhado risos, alegrias e tristezas, mas a gente compartilhou mais alegrias e risos do que tristeza porque nos compreendemos que a melhor solução para evitar a mais profunda tristeza, era tirar um sorriso com uma piada ou brincadeirinha. Agradeço muito porque ela fez do trabalho difícil, uma atividade fácil, fez de uma situação ruim, um momento alegre e fez com que eu compreendesse que muitas coisas que acontecem na vida, são parte dela e têm que ser aceitas.

Agradeço aos meus colegas, a Rosa Amália Dueñas, a Solange Rego, o Cesar Prias, o Diego Falico, a Jéssica Kele, a Priscilla Galante, a Jaqueline Coimbra, a Karla Moreira, o Leandro Campos e o Christiano del Cantoni Gati pela sua valiosa companhia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito à dona Maria Magalhães que foi como um anjo para mim, ao meu amigo Washington J. De Oliveira que ficou me ajudando quando mais eu precisei, ao Pedro Ivo Molina e ao Cezar F. Silveira pelos bons momentos.

Agradeço muito a minha família porque eles favoreceram a minha vinda ao Brasil para continuar meu processo de formação e porque sempre ficarão por perto de mim oferecendo seu carinho. À mamãe do meu filho Maria Chicangana, às minhas irmãs Katherine Morales e Evelin Morales, ao meu irmão Steven Morales, a minha tia Nora Duque e minha família Duque Betancourt. Agradeço à Rebeca Hormiga, à Diana Chicangana e à Maria O. Chicangana. Adicionalmente, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa da minha vida, mas que não cito aqui.

RESUMO

As peçonhas escorpiônicas têm sido alvo de pesquisas por possuírem componentes com diversas atividades biológicas, as quais são responsáveis pelas alterações fisiológicas observadas no escorpionismo. Dentre esses componentes, estão as toxinas que agem em canais para potássio (KTxs), as quais têm sido caracterizadas e divididas em subfamílias segundo a sua estrutura primária. O objetivo desta pesquisa foi procurar novas KTxs na peçonha do escorpião colombiano *Tityus* sp. utilizando duas estratégias: a transcritômica e a proteômica. Uma biblioteca de cDNA foi construída, a partir da glândula de peçonha do escorpião e da sua peçonha foram isoladas e caracterizadas KTxs por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF e tipo ESI. Os peptídeos isolados foram testados por meio da técnica eletrofisiológica de *patch clamp* (*whole cell*). A partir da biblioteca de cDNA, foram caracterizadas cinco sequências precursoras que codificam prováveis KTxs: três delas são pertencentes à subfamília α -KTx15, uma à subfamília α -KTx12 e uma à subfamília α -KTx18. Da peçonha, foram sequenciadas outras quatro KTxs com massas moleculares de 2430, 3590, 3640 e 4171 Da. Estas KTxs foram capazes de diminuir a corrente de K^+ em células do gânglio dorsal de ratos. A caracterização destas novas KTxs reflete o amplo espectro de expressão deste tipo de toxinas e as variadas estratégias moleculares utilizadas pelos escorpiões para produção de componentes neuroativos.

Palavras chave: *Tityus* sp.; KTxs; escorpião; toxina; canal para K^+ ; *discrepina-like*.

ABSTRACT

The venom scorpions have been object of investigations by its different activities biological from components, which are responsible by the physiologic alterations observed in the scorpionism. Within these components, the toxins that target potassium channels (KTxs) are present, which have been characterized and divided according primary structure. The aim was search new KTxs in the Colombian scorpion *Tityus* sp. venom using two strategies: the transcriptomic and proteomic. The scorpion venom gland a cDNA library was constructed, and from venom, KTxs were characterized using high performance liquid chromatographic (HPLC), mass spectrometry MALDI-TOF/TOF and ESI type technical. The isolated peptides were tested with *patch clamp (whole cell)* electrophysiological technique. Four precursors likely KTxs were characterized: three α -KTx15, one α -KTx12 and one α -KTx18 like subfamilies. Additionally, four KTxs-like were sequenced from scorpion venom with molecular masses 2430, 3590, 3640 and 4171 Da. These slightly decreased levels potassium current on dorsal root ganglion. The characterization these new KTxs reveals a wide spectrum of KTxs-type toxins and one varied molecular strategy for neuroactive compounds production also.

Keywords: *Tityus* sp.; KTxs; scorpion; toxin; K⁺-channel; discrepin-like.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição geográfica de <i>Tityus</i> sp	2
FIGURA 2 - Escorpiões <i>Tityus</i> sp	3
FIGURA 3 - Estruturas tridimensionais de KTxs	8
FIGURA 4 - Esquema representativo das principais estruturas de canais iônicos para potássio	11
FIGURA 5 - Estrutura de um canal de potássio voltagem-dependente	13
FIGURA 6 - Modelos de interação toxina-canal iônico para potássio	16
FIGURA 7 - Interações da K (Azul) da Tc32 com resíduos de aminoácidos (G e Y) do filtro do canal	18
FIGURA 8 - Mapa do vetor	24
FIGURA 9 - Gel de agarose dos cDNAs obtidos da glândula de peçonha do escorpião <i>Tityus</i> sp	32
FIGURA 10 - Transcritos discrepina- <i>like</i> provenientes da glândula de peçonha do escorpião <i>Tityus</i> sp	33
FIGURA 11 - Transcritos provenientes da glândula de peçonha do escorpião <i>Tityus</i> sp	34
FIGURA 12 - Alinhamento de transcritos	34
FIGURA 13 - Alinhamento das toxinas das subfamílias α -KTxs15, α -KTxs12 e α -KTxs18	35
FIGURA 14 - Cromatograma da peçonha bruta do escorpião <i>Tityus</i> sp.	37
FIGURA 15 - Cromatografia da fração 17	39
FIGURA 16 - Cromatografia da fração 18	40
FIGURA 17 - Sequência, espectro de massa molecular e recromatografia da Tx2430	41
FIGURA 18 - Alinhamento das toxinas da subfamília α -KTxs13 e teste biológico da Tx2430	43
FIGURA 19 - Cromatografia da fração 19	45
FIGURA 20 - Cromatografia da fração 20	46
FIGURA 21 - Cromatografia da fração 23	47
FIGURA 22 - Espectro de massa molecular e recromatografia da Tx3640	48
FIGURA 23 - Alinhamento das toxinas da subfamília α -KTxs17 e teste biológico da Tx3640	49
FIGURA 24 - Cromatografia da fração 25	50

FIGURA 25 - Cromatografia da fração 28.....	51
FIGURA 26 - Espectro de massa e recromatografia da Tx4171	53
FIGURA 27 - Teste biológico da Tx4171	54
FIGURA 28 - Cromatografia da fração 29.....	55
FIGURA 29 - Cromatografia da fração 30.....	56
FIGURA 30 - Cromatografia da fração 31	57
FIGURA 31 - Sequência, espectro de massa molecular e recromatografia da Tx3590.....	58
FIGURA 32 - Teste biológico da Tx3590.....	60
FIGURA 33 - Cromatografia da fração 34.....	61
FIGURA 34 - Cromatografia da fração 35.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estrutura/função das toxinas escorpionicas	10
TABELA 2 - Características gerais dos transcritos do escorpião <i>Tityus</i> sp. comparados às toxinas homólogas.....	36
TABELA 3 - Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs13.....	44
TABELA 4 - Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs17.....	50
TABELA 5 - Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs15.....	54
TABELA 6 - Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs18.....	60
TABELA 7 - Massas moleculares detectadas nas frações cromatográficas da peçonha do escorpião <i>Tityus</i> sp. (parte superior) e obtidas a partir da biblioteca de cDNA de sua glândula de peçonha (parte inferior).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Agtx2: Toxina purificada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* que bloqueia canais para K^+

BeKm-1: Toxina purificada da peçonha do escorpião *Mesobuthus eupeus* que bloqueia canais para K^+

CFTR: Regulador de Condutância Transmembrânica de Fibrose Cística

CLC: Canais para cloreto

CnErg: Toxina purificada da peçonha do escorpião *Centruroides noxius* que bloqueia canais para K^+

DAN: 1,5-diaminonaftaleno

DRG: Neurônios do gânglio da raiz dorsal

EGTA: Ácido Etileno Glicol Tetracético

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

HCCA: Ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

hERG: Gene humano relacionado com canais iônicos tipo *Ether-à-go-go*

KCNA: Canal para K^+ dependente de voltagem da subfamília A

k-BuTx-Tt26: Toxina purificada da peçonha do escorpião *Tityus trivitattus* que bloqueia canais para K^+

K_{Ca}: Canais para K^+ ativados por cálcio

K_{ir}: Canais para K^+ retificadores de influxo

K_{2P}: Canais para K^+ com dois poros *in tandem*

KTxs: Toxinas que agem sobre canais para potássio

K_v: Canais para K⁺ dependentes de voltagem

MALDI-TOF/TOF: Ionização por desorção a laser assistida por matriz-
Detecção por tempo-de-vôo

MeuTXKβ1: Toxina da subfamília β-KTx purificada do escorpião *Mesobuthus eupeus*

MS/MS: Espectrometria de massa/ espectrometria de massa

NaScTx: Toxinas que agem sobre canais para sódio

NMDG: N-Metil-D-glucamina

OmTx4: KTx purificada da peçonha do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDB: Banco de dados de proteínas

Pi4: α-KTx purificada do escorpião *Pandinus imperator*

RP-HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

Scytx: KTx purificada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*

Sf9: Células isoladas de *Spodoptera frugiperda*

TFA: Ácido Trifluoroacético

Tsk: KTx purificada da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosida

Índice

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 - <i>Tityus</i> sp. pertencente ao grupo <i>forcipula</i>	2
1.3 - PEÇONHA ESCORPIÔNICA.....	3
1.4 - TOXINAS QUE ATUAM EM CANAIS IÔNICOS	4
1.4.1. Polipeptídeos que modulam a atividade dos canais para sódio.....	5
1.4.2. Peptídeos que modulam a atividade dos canais para cloreto.....	6
1.4.3. Toxinas que modulam a atividade dos canais para cálcio.....	6
1.4.4. Toxinas que bloqueiam os canais para potássio.....	7
1.5 - CANAIS PARA POTÁSSIO E O MECANISMO DE AÇÃO DAS KTxS.....	10
2 - RELEVÂNCIA CIENTÍFICA	19
3 - OBJETIVOS	20
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 - MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 - COLETA E MANUTENÇÃO DOS ESCORPIÕES	21
4.2 - EXTRAÇÃO DA PEÇONHA E QUANTIFICAÇÃO.....	21
4.3- CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DO ESCORPIÃO <i>Tityus</i> sp.....	22
4.3.1 - Separação do RNA das glândulas com o “Kit ZR-Duet DNA/RNA Mini Prep (D7001)”.....	22
4.3.2 - Síntese da primeira fita de cDNA, ou ssDNA, com o “In Fusion SMARTer cDNA Library Construction Kit” Clontech Laboratories, Inc.....	22
4.3.3 - Síntese da segunda fita de cDNA ou ds cDNA.....	23
4.3.4 - Purificação do ds cDNA.....	23
4.3.5 - Inserção do ds cDNA no vetor.....	23
4.3.6 - Preparo de células competentes.....	24
4.3.7 - Transformação de células competentes.....	25
4.3.8 - Clonagem do material plasmidial.....	25
4.3.9 - Seleção do material plasmidial.....	25
4.3.10 - Sequenciamento dos plasmídeos e análises de bioinformática.....	26
4.4 - FRACIONAMENTO DA PEÇONHA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	27

4.5 - DETERMINAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	27
4.6 - DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS AMINOÁCIDOS.....	28
4.7 - CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA.....	28
5 - RESULTADOS.....	30
5.1 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DO ESCORPIÃO.....	30
5.2 - FRACIONAMENTO DA PEÇONHA POR HPLC.....	36
5.3 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS FRAÇÕES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS.....	37
5.3.1 - fração 17.....	38
5.3.2 - fração 18.....	39
5.3.3 - fração 19.....	44
5.3.4 - fração 20.....	45
5.3.5 - fração 23.....	46
5.3.6 - fração 25.....	50
5.3.7 - fração 28.....	51
5.3.8 - fração 29.....	54
5.3.9 - fração 30.....	55
5.3.10 - fração 31.....	57
5.3.11 - fração 34.....	60
5.3.12 - fração 35.....	61
5.4 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS FRAÇÕES OBTIDAS DA PEÇONHA E OS TRANSCRITOS OBTIDOS DA BIBLIOTECA DE cDNA.....	63
6 - DISCUSSAO.....	65
7 - CONCLUSÃO.....	76
8 - PERSPECTIVAS.....	77
9 - BIBLIOGRAFIA.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Escorpionismo é o nome dado ao conjunto de aspectos clínicos e epidemiológicos por acidentes causados por picada de escorpião, sendo, portanto, um problema de saúde pública (Chippaux & Goyffon, 2008). Devido às características farmacocinéticas das peçonhas de escorpiões, a sintomatologia varia desde dor local, passando por falha cardiogênica, neurológica e respiratória, podendo até comprometer a vida do paciente (Khattabi *et al.*, 2011). Conseqüentemente, há um aumento de busca por estudos para avaliar os efeitos nocivos das peçonhas. Com isso, a descrição dos componentes de peçonhas revelou a presença de peptídeos com atividade sobre canais iônicos. Estes peptídeos são os principais responsáveis pela sintomatologia apresentada em casos de envenenamento por picadas de escorpião (Chippaux & Goyffon, 2008). Esta alteração sistêmica é dada porque os canais iônicos das células são responsáveis por diversas funções fisiológicas, como por exemplo a condução de impulsos nervosos, e as alterações nas funções das correntes iônicas podendo provocar até mesmo a morte. Assim, as toxinas que são produzidas por organismos como um mecanismo de defesa ou caça (Loret & Hammock, 2001; Mouhat *et al.*, 2008), atuam nesses canais iônicos, bloqueando ou modulando sua corrente iônica. Visto isso, a pesquisa das propriedades farmacocinéticas e estruturais destas toxinas tornou possível transformar esses efeitos “deletérios” em benefícios como, utilizar toxinas como ferramentas farmacológicas para o tratamento de doenças (Cologna *et al.*, 2009; Gati *et al.*, 2012) ou estudo do mecanismo de ação de diferentes canais iônicos (Catterall *et al.*, 2007). Exemplos disso foi o desenvolvimento do Captopril, um medicamento anti-hipertensivo desenvolvido a partir do inibidor da enzima conversora da angiotensina I isolado do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, ou o Priat, um medicamento analgésico desenvolvido a partir do peptídeo ω -conotoxina, purificado do veneno do caracol *Conus magus*.

No presente trabalho, as toxinas que atuam sobre canais para potássio (KTxs), isoladas da peçonha e/ou que são expressas pela glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. (Morales & Flórez, em preparação), foram estudadas.

Inicialmente, as características gerais desta espécie de escorpião são apresentadas. Posteriormente, uma breve revisão sobre as peçonhas em geral, e sobre as características das toxinas, com ênfase nas KTxs e características gerais de seus canais alvo, é descrita. Por último, a interação das KTxs com os canais para K⁺ será abordada.

1.2 *Tityus* sp. pertencente ao grupo *forcipula*

O grupo *forcipula* está relacionado às espécies do gênero *Tityus* e se caracterizam por apresentar grossas granulações em todo seu corpo, sendo que as espécies deste grupo são semelhantes à *Tityus forcipula* (Gervais, 1843). *Tityus* sp. é uma espécie ainda não descrita, que ocorre na cidade de Popayán, Colômbia (Fig. 1). Caracteriza-se por ter até 65 mm de comprimento, coloração preta, com alguns indivíduos avermelhados (Fig. 2), e um notável dimorfismo sexual com as fêmeas com o corpo mais robusto e os machos com palpos robustos.

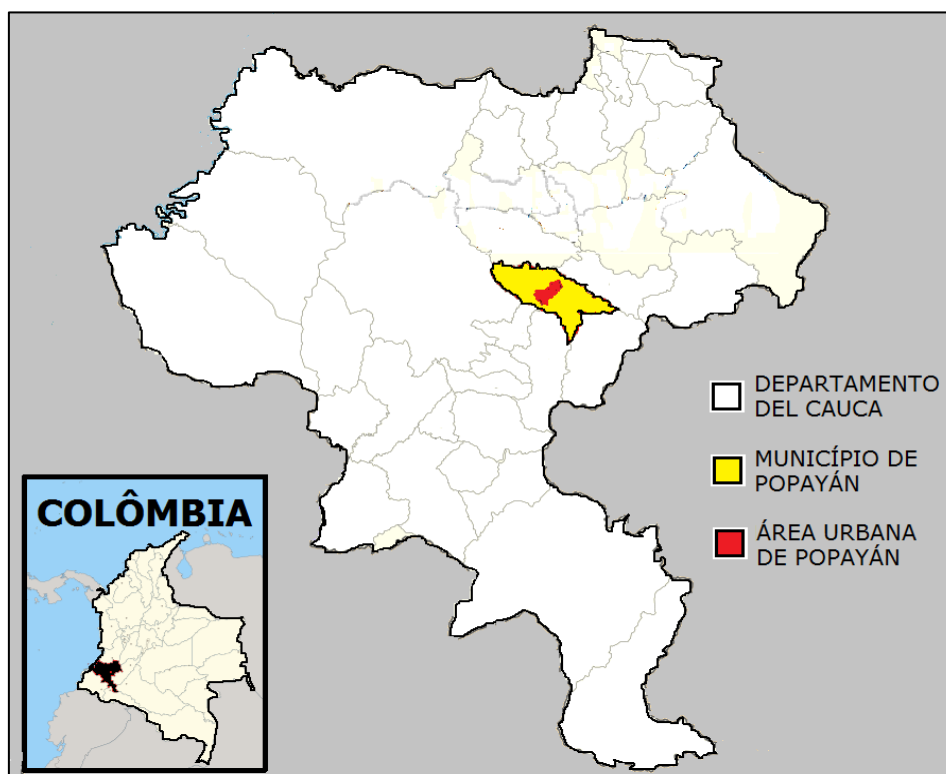


Figura 1. Distribuição geográfica de *Tityus* sp. Esta espécie ocorre na cidade de Popayán, Cauca (2°26'39''N, 76°36'18''W). Adaptado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f7/Colombia_-_Cauca_-_Popayan.svg.

Estudos prévios mostraram que a peçonha bruta de *Tityus* sp. possui toxicidade com uma dose letal 50% (DL₅₀) de 3,5 µg/g de camundongo, gerando um efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração muscular mais eficiente com 0,288 µg/g) quando aplicado em uma preparação de músculo gastrocnêmico de anfíbio. Adicionalmente, esta peçonha mostrou atividade microbiostática (diminuição do crescimento microbiano) em fungos (*Candida albicans*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans* em concentrações de 16 µg/mL (50%), 31 µg/mL (50%) e 31 µg/mL (33%), respectivamente) e bactérias (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923, em concentrações de 16 µg/mL (14%), 8 µg/mL (37%) e 8 µg/mL (23%), respectivamente) (Morales *et al.*, em preparação).



Figura 2. Escorpiões *Tityus* sp. Dois machos apresentando duas colorações como único caractere, não diagnóstico, diferencial da espécie.

1.3 PEÇONHA ESCORPIÔNICA

A peçonha dos escorpiões é composta de substâncias protéicas e não protéicas (Gómez *et al.*, 2010): enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas, peptídeos e polipeptídeos, que tem sido descritos como os principais causadores da atividade neurotóxica (Pringos *et al.*, 2011) e são,

portanto, de grande interesse para a comunidade científica devido à atividade biológica atribuída (Loret & Hammock, 2001).

Esses peptídeos ou polipeptídeos têm sido amplamente estudados e podem ser agrupados segundo o número de resíduos de aminoácidos (Chippaux & Goyffon, 2008), canal iônico alvo, homologia da estrutura primária (Miller, 1995; Tytgat *et al.*, 1999), estruturas secundária e terciária (Possani *et al.*, 2000; Mouhat *et al.*, 2004), atividade biológica (Tytgat *et al.*, 1999; Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Rodríguez de la Vega & Possani, 2005) e/ou mesmo a interação toxina-canal iônico (Rodríguez de la Vega & Possani, 2007). Destes, se identificam aqueles que se ligam aos canais para Ca^{+2} , Cl^- , K^+ ou Na^+ (Karalliedde, 1995; Mouhat *et al.*, 2004) de células excitáveis e não excitáveis (Zhijian *et al.*, 2006). As características estruturais dessas toxinas incluem a presença de ligações dissulfeto, que mantêm a estrutura rígida, permitindo a exposição dos resíduos de aminoácidos chaves para reconhecimento de regiões específicas dos canais alvos (Mouhat *et al.*, 2004). Muitos desses peptídeos/polipeptídeos são específicos para canais iônicos de células animais de diferentes grupos taxonômicos (Loret & Hammock, 2001). No entanto, muitas toxinas descritas não tiveram ainda seus alvos moleculares descritos. As características próprias de cada grupo de toxinas são apresentadas na Tabela 1. As toxinas descritas de peçonhas de escorpiões podem ser verificadas na plataforma UniProtKB a qual conta com uma base de dados pública constantemente atualizada (Jungo *et al.*, 2012).

1.4 TOXINAS QUE ATUAM EM CANAIS IÔNICOS

Como já mencionado, estas toxinas se ligam aos canais específicos de condutância de diferentes tipos de íons. Assim, outra vantagem de estudar estes peptídeos é devido a possibilidade destes apresentarem-se uma importante ferramenta para investigação e aplicação farmacológica no tratamento de canalopatias. Denomina-se canalopatia toda doença produzida por uma anomalia do funcionamento dos canais iônicos. A doença é dada segundo o canal iônico afetado, por exemplo, a mutação de subtipos canais

para K^+ , Na^+ e Ca^+ podem ser responsáveis por doenças de canalopatia cardíaca gerando síndrome congênita do QT longo, síndrome do QT curto, Síndrome de Brugada, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e tipos variáveis de defeitos de condução (Abriel & Zaklyazminskaya, 2013). Adicionalmente, entre outras doenças, outros subtipos de canais para K^+ , Na^+ e Ca^{2+} afetados podem produzir síndromes de epilepsia humana no SNC (Poolos & Johnston, 2012). Por último, os canais para Cl^- afetados podem gerar a fibrose cística que é devido à uma mutação no gene chamado Regulador de Condutância Transmembrânica de Fibrose Cística – CFTR. Esta alteração se expressa em diferentes órgãos, mas produz morte por formação de cistos pela acumulação de sais no pulmão (Denny *et al.*, 2013)

1.4.1. Polipeptídeos que modulam a atividade dos canais para sódio

As toxinas de escorpiões que modulam a atividade dos canais para sódio (NaScTxS) são polipeptídeos de 58 a 76 resíduos de aminoácidos (Rodríguez de la Vega & Possani, 2005) que se ligam aos canais iônicos alterando as correntes de sódio através da membrana da célula (Rodríguez de la Vega & Possani, 2007), o que, nas células excitáveis, resulta em uma modificação no potencial de ação. As NaScTxS podem ser divididas em dois grupos: as α -toxinas e as β -toxinas (Rodríguez de la Vega & Possani, 2005; 2007). As primeiras se ligam no sítio três do domínio IV na subunidade α do canal causando um prolongamento do potencial de ação devido ao retardamento na inativação do canal. As β -toxinas se ligam ao sítio quatro do domínio II na mesma subunidade afetando a ativação do canal iônico (Zhijian *et al.*, 2006). A OD1, por exemplo, isolada da peçonha do escorpião *Odontobuthus doriae*, é uma α -toxina que modula potentemente ($EC_{50} = 4,5$ nM) o fluxo iônico em canais $Na_v1.7/SCN9A$ (Maertens *et al.*, 2006). De outro lado, a Ts1, uma β -toxina da peçonha de *T. serrulatus*, se liga aos segmentos sensores de voltagem do canal de Na^+ , modificando a transição dos quatro sensores voltagem-dependentes e incrementando o influxo do íon Na^+ , e resultando uma LD_{50} de 0,6 ng/camundongo, via *i.v.* (Campos *et al.*, 2007).

1.4.2. Peptídeos que modulam a atividade dos canais para cloreto

Os peptídeos que se ligam a canais que regulam o fluxo do íon cloreto são toxinas que se encontram em menor quantidade na peçonha dos escorpiões e, por isso, são menos estudados. Estas moléculas, com aproximadamente 31 resíduos de aminoácidos, atuam como bloqueadores destes canais iônicos (Mouhat *et al.*, 2004). A toxina GaTx2 isolada de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, foi inicialmente classificada como bloqueadora de canais para K⁺ e apresenta, de fato, atividade sobre canais para cloreto (Thompson *et al.*, 2009). Um estudo feito com peçonha bruta do escorpião *L. q. hebraeus* mostrou atividade sobre o Regulador de Condutância Transmembrânica de Fibrose Cística CFTR (Fuller *et al.*, 2004). Essa peçonha foi testada em canais para cloreto CIC-0, -1 e -2, mostrando maior atividade sobre o tipo CIC-2 (Thompson *et al.*, 2005). Posteriormente, duas toxinas foram isoladas da peçonha de *L. q. hebraeus*: a GaTx1 que tem forte atividade em alguns transportadores do tipo ABC (Fuller *et al.*, 2007) e a GaTx2 que tem alta afinidade aos canais CIC-2 (Thompson *et al.*, 2009). Provavelmente, esses peptídeos, ao se ligarem ao canal de cloreto em seu estado fechado, previnem a sua abertura.

1.4.3. Toxinas que modulam a atividade dos canais para cálcio

As toxinas que interagem com os canais para cálcio podem ser divididos em, pelo menos, dois grupos. O primeiro grupo é representado por peptídeos que possuem 33 ou 35 resíduos de aminoácidos (Schwartz *et al.*, 2009), como as calcinas Imperatoxina (Zamudio *et al.*, 1997) e a Maurocalcina (Faljoun *et al.*, 2000) isoladas da peçonha dos escorpiões *Pandinus imperator* e *Scorpio maurus palmatus* respectivamente. O segundo grupo é representado por aqueles que possuem cadeia longa (polipeptídeos), como a Kurttoxina isolada da peçonha do escorpião *Parabuthus transvaalicus*, com 63 resíduos de aminoácidos (Chuang *et al.*, 1998). Assim como as clorotoxinas, estes também são pouco estudados.

As calcinas são peptídeos que interagem com os receptores de rianodina presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, produzindo

liberação intracelular do íon Ca^{+2} (Valdivia & Possani, 1998). A Maurocalcina, por exemplo, tem atividade potente (12 nM) e reversível nesses receptores (Fajloun *et al.*, 2000).

Paralelamente, há toxinas que interagem com canais para cálcio dependentes de voltagem (Pringos *et al.*, 2011). A Kurtoxina, por exemplo, age sobre canais para Ca^{2+} do tipo T modificando a dependência de voltagem do canal (Chuang *et al.*, 1998). Duas toxinas similares à Kurtoxina (KLI e KLII) provenientes de *Parabuthus granulatus* também mostraram atividade sobre canais de Ca^{2+} (Olamendi-Portugal *et al.*, 2002).

1.4.4. Toxinas que bloqueiam os canais para potássio

As toxinas bloqueadoras de canais para potássio (KTxs) são peptídeos ou polipeptídeos de 22 (Mouhat *et al.*, 2004) a 75 (Zhu *et al.*, 2010) resíduos de aminoácidos, respectivamente que, ao se ligarem aos canais, impedem o fluxo do íon potássio através das membranas celulares, gerando, assim, uma alteração na excitabilidade celular. Essa alteração pode levar a uma modificação na liberação de neurotransmissores e na secreção de hormônios, entre outras (Tytgat *et al.*, 1999). Estas toxinas podem ser divididas em quatro famílias, segundo a estrutura e/ou função das mesmas (Tabela 1): α , β , γ -KTx (Possani *et al.*, 2000; Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tytgat *et al.*, 1999) e κ -KTx (Srinivasan *et al.*, 2002) (Fig. 3). Estas toxinas ativas sobre canais para K_v e K_{Ca} (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004) são de natureza básica, mas, recentemente, com uma caracterização de novas KTxs foram identificadas outras toxinas que diferem das KTxs convencionais, estas novas KTxs são de característica ácida (Chen *et al.*, 2012).

A estrutura das α -KTxs se constitui de duas fitas- β unidas a uma α -hélice por 3 ou 4 ligações dissulfeto (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tytgat *et al.*, 1999), com exceção da ImKTx104, caracterizada de peçonha do escorpião *Lychas mucronatus*, que pertence à subfamília α -KTxs28.1. A estrutura secundária é enovelada em forma desordenada sem o padrão fita- β ou alfa-hélice (Chen *et al.*, 2012). As KTxs se distribuem em, pelo menos, 30 subfamílias segundo a sua estrutura primária

(<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>; Chen *et al.*, 2012) e apresenta atividade sobre canais iônicos para potássio dependentes de voltagem e/ou também aqueles ativados por cálcio (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004).

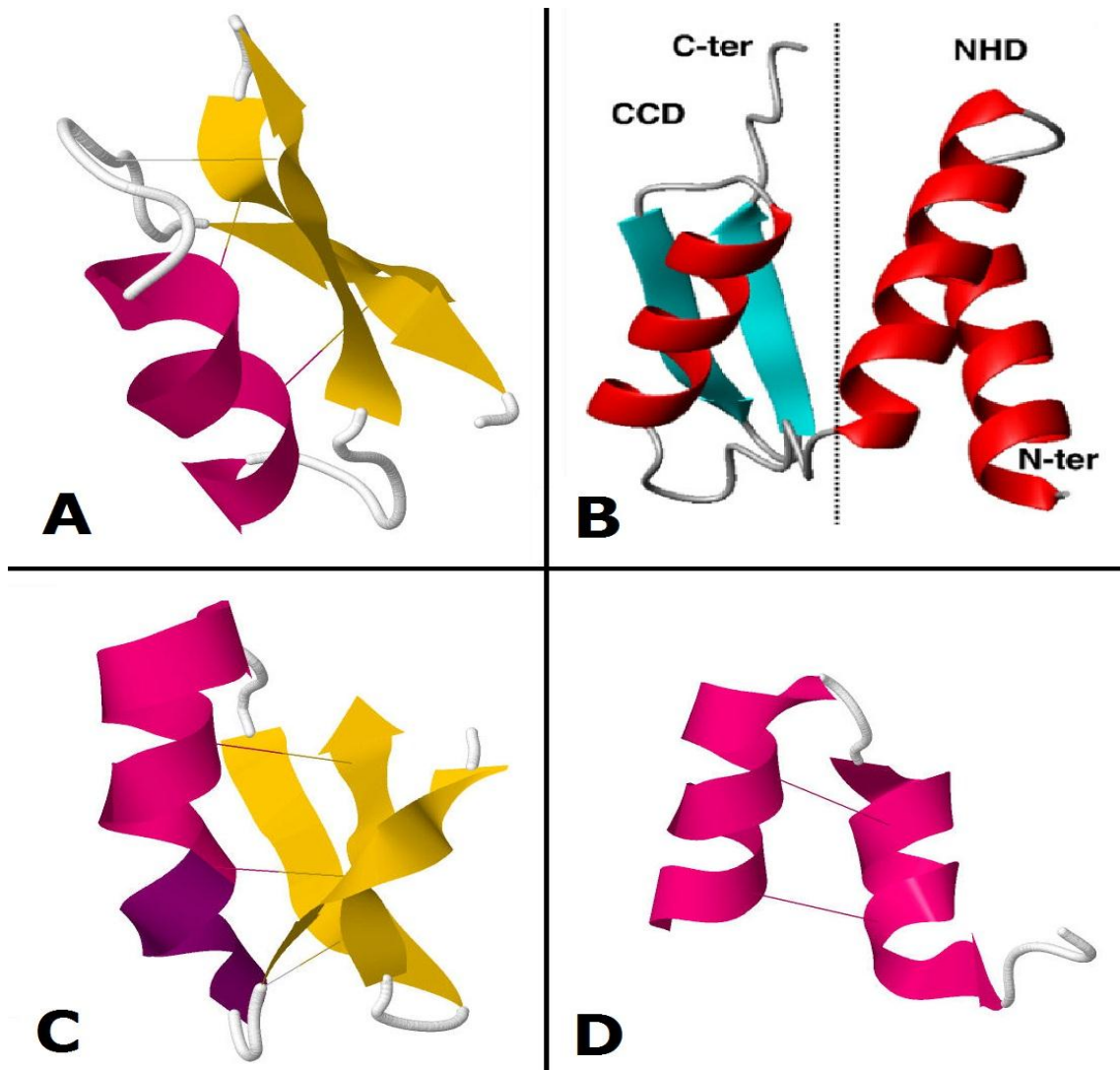


Figura 3. Estruturas tridimensionais de KTx. **A.** Caribdoxina, pertencente às α -KTx se constitui de 1 α -hélice (rosa) e 2 fitas- β ligadas (amarelo) por três ligações dissulfeto (Acesso PDB, 2CRD); **B.** Modelagem molecular por identidade da MeuTXK β 1 (Zhu *et al.*, 2010), pertencente às β -KTx se compõe de duas estruturas; **C.** BeKm-1 pertencente às γ -KTx que compartilha similaridade estrutural com as α -KTx, mas com atividade biológica específica sobre canais tipo *ether-à-go-go* (Acesso PDB, 1J5J) e; **D.** A OmTx4 da subfamília k-KTx é constituída de duas α -hélices ligadas entre si por duas ligações dissulfeto (Acesso PDB, 1WQC).

As β -KTx são peptídeos/polipeptídeos com, 47-68 resíduos de aminoácidos (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>), compostas de uma

estrutura α -hélice e duas fitas- β , unidas por três ligações dissulfeto (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tan *et al.*, 2006; Tytgat *et al.*, 1999; Diego-García *et al.*, 2008). Estas toxinas apresentam duas extremidades bem caracterizadas com diferentes relações estrutura/função. A região N-terminal, que apresenta similaridade com defensinas de insetos, é responsável pela atividade citolítica e/ou antimicrobiana da toxina, enquanto que a porção C-terminal é responsável pela atividade bloqueadora de canais para potássio (Diego-García *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi proposta uma divisão desta família em três classes, quando caracterizada a MeuTXK β 1 isolada do escorpião *Mesobuthus eupeus*, que apresentou destacada atividade citolítica no seu domínio 2 ou região N-terminal (Zhu *et al.*, 2010).

As γ -KTxs são constituídas de uma estrutura em α -hélice e duas fitas- β (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004), unidas por quatro ligações dissulfeto (Corona *et al.*, 2002) e distribuídas em cinco subfamílias (<http://www.uniprot.org/docs/scorpctx>). Estas toxinas foram originalmente incluídas nesta família porque atuam sobre canais de potássio tipo HERG (Tytgat *et al.*, 1999) e, diferentemente das outras KTxs, estas impedem o fluxo dos íons sem obstruir fisicamente o poro do canal.

Para finalizar, as κ -KTxs são as mais recentemente caracterizadas (Srinivasan *et al.*, 2002). Compõem-se de duas estruturas em α -hélice paralelas estabilizadas por duas ligações dissulfeto (Nirathanan *et al.*, 2005) e são de natureza básica, com dois novos membros da subfamília kappa-KTx 2 meramente ácidos (Chen *et al.*, 2012), formando assim, cinco subfamílias (<http://www.uniprot.org/docs/scorpctx>). Devido a baixa afinidade de toxinas desta subfamília sobre canais para K⁺, provavelmente, seu alvo seja outro (Nirathanan *et al.*, 2005). A kappa-KTx 2.5, por exemplo, é uma toxina isolada do escorpião *Opisthacanthus cayaporum*, que mostrou maior afinidade sobre canais K_v1.4 com um IC₅₀ de 71 μ M (Camargos *et al.*, 2011).

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 KTxs foi fundamental na caracterização da função e na identificação dos diversos subtipos de canais iônicos (Abdel-mottaleb *et al.*, 2008; Martin-Eauclaire & Bougis, 2012; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003).

Tabela 1. Estrutura/função das toxinas escorpiônicas.

Toxina	Estrutura		Resíduo(s) chave(s)	Função
	Secundária	Terciária		
KTxs	$\alpha\beta\beta$, $\beta\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha$	2, 3 ou 4 ligações dissulfeto	Lys	Bloqueiam os canais para potássio
NaScTx	$\beta\alpha\beta\beta$, $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$	3 ou 4 ligações dissulfeto	Glu	Modulam a atividade dos canais para sódio
“Clorotoxinas”	$\beta\alpha\beta\beta$	4 ligações dissulfeto	Indefinido	Modulam a atividade dos canais para cloreto
Calcinas	$\alpha\beta\beta$, $\beta\beta\beta\alpha\beta\beta$	3 ou 4 ligações dissulfeto	His, Lys, Arg	Modulam a atividade dos canais para cálcio

1.5 CANAIS PARA POTÁSSIO E O MECANISMO DE AÇÃO DAS KTxs

Existem aproximadamente 100 subtipos de canais que regulam o fluxo de potássio (Miller, 2000). Estes canais pertencem à família dos canais tetraméricos (Pringos *et al.*, 2011), constituídos de estruturas protéicas arranjadas em subunidades que, geralmente, estão organizadas em seis segmentos transmembrânicos helicoidais (Fig. 4).

Os canais para potássio apresentam, como função, a manutenção da excitabilidade celular. Estes canais apresentam a maior diversidade entre os canais iônicos e podem ser agrupados em quatro famílias: os canais dependentes de voltagem (K_v , com 12 subfamílias) (Gutman *et al.*, 2005), os ativados por cálcio (K_{Ca} , com 5 subfamílias) (Wei *et al.*, 2005), os retificadores de influxo (K_{ir} , com 7 subfamílias) (Kubo *et al.*, 2005) e aqueles com dois poros *in tandem* (K_{2P} , com 16 subfamílias) (Goldstein *et al.*, 2005). Os canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) estão compostos de subunidades α e β e são ativados pelas altas concentrações de Ca^{2+} intracelular, controlando com isso as concentrações desses íons e evitando a excitação prolongada na célula. Estes canais são encontrados, por exemplo, em músculo liso. Os canais retificadores de influxo (K_{ir}) são canais de influxo de K^+ que diferem estruturalmente dos demais por possuírem apenas dois segmentos helicoidais em cada subunidade. Estes canais favorecem a entrada de K^+ na célula que pode ser controlada pelo íon Mg^{2+} e pelo ATP que obstruem o poro, permitindo assim, a manutenção do potencial de repouso. Os canais K_{ir} são muito importantes no coração (Lacerda, 2009) pois dada à falta do sistema nervoso autônomo, estes

permitem a rápida repolarização autônoma para continuar o processo fisiológico.

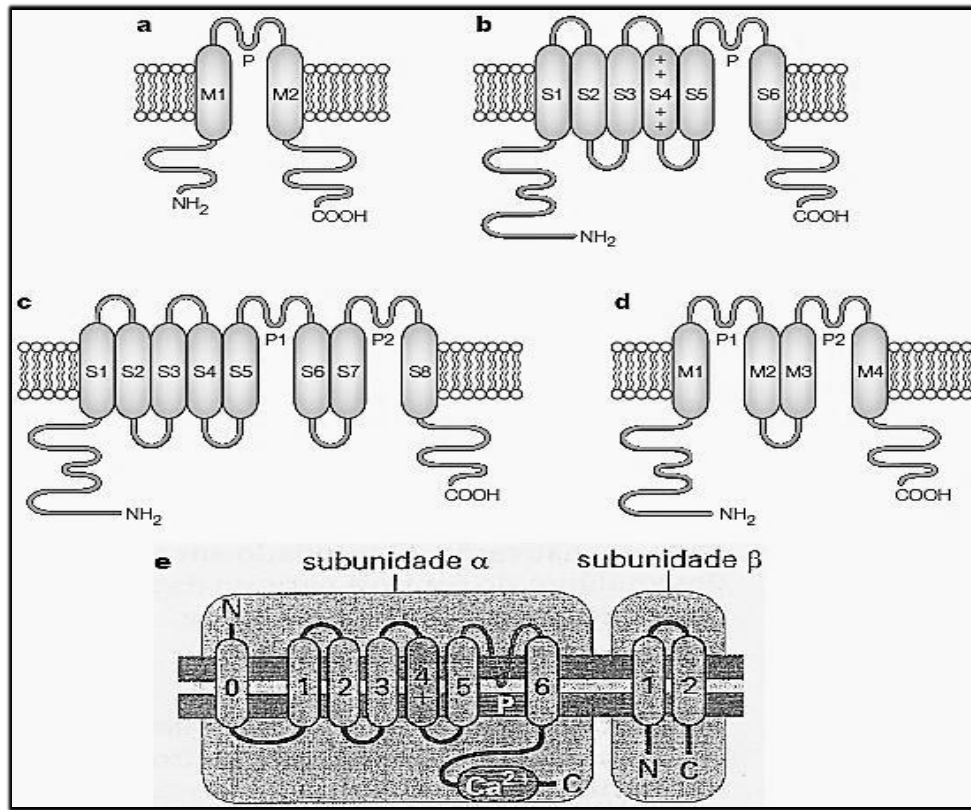


Figura 4. Esquema representativo das principais estruturas de canais iônicos para potássio. **a**: canal K_{ir} ; **b**: canal K_v ; **c** e **d**: canais K_{2P} ; **e**: canal K_{Ca} . Adaptado de Choe, 2002.

Os canais para potássio alvo de interação das toxinas escorpionicas são aqueles da família K_{Ca} e K_v , mas a maioria das toxinas agem sobre aqueles regulados por voltagem (K_v) (Panyi *et al.*, 2006), especialmente os da subfamília K_v1 (Gati *et al.*, 2012). A família de canais para K^+ (K_v) se expressa heterológamente dependendo do tecido e varia segundo o grupo taxonômico ao qual pertence o organismo. A Subfamília K_v1 expressa tanto em células de mamífero quanto de inseto e apresentam variações estruturais. Os genes envolvidos na expressão desta subfamília de canais são *KCNA* para mamífero (humano) e tipo *Shaker* para inseto. Neste grupo de canais iônicos inclui-se, segundo sua função, canais do tipo retificadores retardados $K_v1.1$ (*KCNA1*), $K_v1.2$ (*KCNA2*), $K_v1.3$ (*KCNA3*), $K_v1.5$ (*KCNA5*), $K_v1.6$ (*KCNA6*), $K_v1.7$

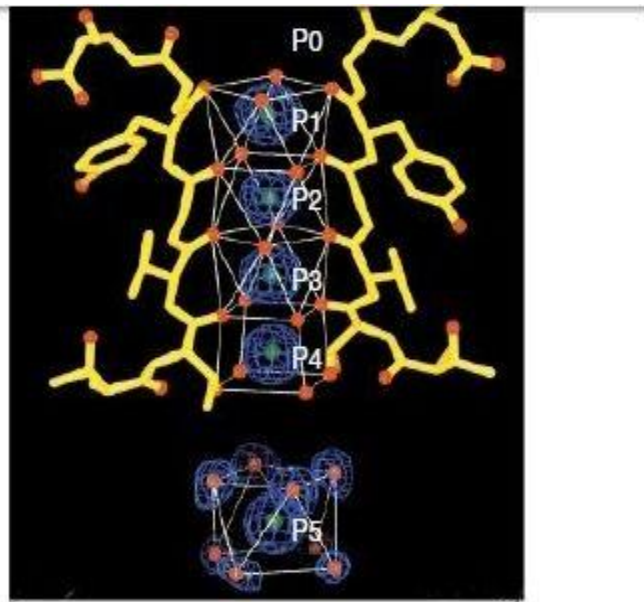
(*KCNA7*) e $K_v1.8$ (*KCNA10*), com o $K_v1.4$ (*KCNA4*) como único representante dos canais iônicos de rápida inativação (Gutman *et al.*, 2005).

Dentre os seis segmentos transmembrânicos da subunidade α dos canais K_v , o quarto está carregado positivamente (com resíduos de aminoácidos básicos) (Choe, 2002), permitindo a ativação do canal em resposta a uma despolarização da membrana (Miller, 2000; Panyi *et al.*, 2006). A inativação destes canais, também regulada pela voltagem, ocorre com a obstrução do poro do canal por uma proteína globular intracelular ligada ao tetrâmero intracelular T1 do canal por uma cadeia peptídica. Estes canais são muito importantes nos mecanismos de repolarização das células nervosas e musculares esqueléticas.

Como sugerido por Choe (2002), o íon potássio, inicialmente interagindo com moléculas de água no interstício, é retido por oito átomos de oxigênio providos pelos grupos carbonilos da cadeia principal dos segmentos transmembrânicos S5 e S6 do canal. Desde a região externa do poro em direção ao interior do mesmo, está localizada a região de seletividade do poro, constituída por 5 seções (Fig. 5): as quatro primeiras provêm oito oxigênios cada, e a última provê oito moléculas de água fixas pela estrutura protéica no interior do filtro de seletividade. Isso faz com que os íons potássio sejam transportados de seção em seção pelo interior do poro, e permite que a seletividade para esse íon dependa quase exclusivamente dos processos termodinâmicos (Noskov & Roux, 2006). Após essas cinco seções, no interior do canal, e anterior ao domínio do tetrâmero amino-terminal T1 (Fig. 5), se localiza uma seção que contém íons Zn^{2+} fixos na proteína. Estes auxiliam na liberação do K^+ para o citoplasma. Ao final do poro, depois da estrutura T1, está ligada uma proteína globular, que fecha o poro impedindo assim, o fluxo iônico.

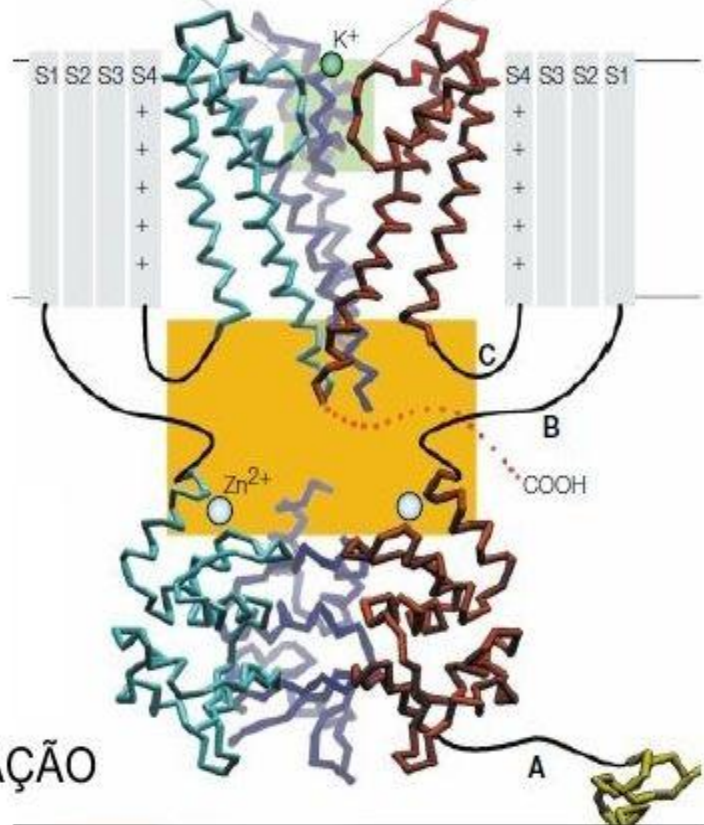
Apesar do avanço sobre o conhecimento do mecanismo de ação de canais para potássio, proporcionado pela descrição da primeira estrutura cristalina do poro de um canal para potássio $K_{cs}A$ (Doyle *et al.*, 1998), e ou, pelo uso de ferramentas farmacológicas, o completo funcionamento dos canais para potássio ainda não está totalmente elucidado.

SELETIVIDADE AO ÍON



PERMEABILIDADE

TETRAMERIZAÇÃO DO DOMÍNIO



ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO

Figura 5. Estrutura de um canal de potássio voltagem-dependente. Da parte superior em direção à inferior da figura: 5 seções (P1-P5) onde o íon K^+ é acolhido (quadro preto). O tetrâmero T1 está unido aos segmentos transmembrânicos por resíduos de aminoácidos (B e C). Entre estes, se localizam os íons de Zn^{2+} (quadro laranja). A proteína de inativação, de cor amarela, está unida ao T1 por uma cadeia de resíduos de aminoácidos (A) na região final do canal. Adaptado de Choe, 2002.

Vários modelos têm sido propostos e procuram esclarecer os mecanismos estruturais relacionados com a interação entre os segmentos do canal e a membrana, a mudança estrutural produzida pelo quarto segmento e sua relação com as cargas, e a interação do poro com os íons. Dos três modelos que tentam explicar o mecanismo de funcionamento dos canais para potássio, o modelo “sliding helix” é o mais bem estabelecido. Os canais para potássio regulados por voltagem (K_v) são ativados por uma resposta inicial facilitada pelos segmentos transmembrânicos S1, S3 e S4. O S4 contém resíduos de aminoácidos básicos (R) que estão em contato, por pontes salinas, com as cabeças de fosfolipídios da membrana e os resíduos de aminoácido ácidos presentes nos segmentos S1 e S3. O S4 detecta a variação da voltagem transmembranal ao contato com as cabeças dos fosfolipídios, fazendo com que suas cadeias laterais iniciem um deslocamento sobre os resíduos fixos presentes nos S1 e S3, promovendo mudanças conformacionais nos dois primeiros estados (α e β) (Treptow *et al.*, 2009). Uma modelagem *in silico* aumentou para cinco estes estados, sugerindo a existência de mais três estados (γ , δ e ϵ) intermediários do domínio que constitui o sensor de voltagem S4, envolvidos no deslocamento das suas cargas. Cada estado promove um deslocamento e tempo específicos do S4, através do eixo do canal, permitindo no estado α , abrir o poro do canal, e no ϵ , fechar o poro por meio de interações envolvendo o resíduo F233 (Delemotte *et al.*, 2011). Assim, o deslocamento (8-15 Å) do S4 permite, por ligação com o S5 (segmento que rodeia o filtro de seletividade), um fechamento intracelular (Amaral *et al.*, 2012).

As KTx de escorpiões interagem com o canal para K^+ obstruindo a região extracelular do poro (Panyi *et al.*, 2006), bloqueando o fluxo iônico nesses canais (Possani *et al.*, 2000). A maioria apresenta mecanismo específico de interação que depende da presença de alguns resíduos de aminoácidos presentes nas toxinas (Lys, Arg e Asn) (Abdel-Mottaleb *et al.*, 2008). Esses resíduos reconhecem locais determinados da superfície do poro no canal iônico (Asp e Tyr), permitindo a inserção da fita- β ou α -hélice destas toxinas no poro (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003). Outro fator importante na interação KTx-canal, além dos resíduos de aminoácidos, é a capacidade de rearranjo das duas moléculas permitindo a atividade da toxina sobre o canal

(Lange *et al.*, 2006). Por exemplo, o mecanismo de ação das γ -KTxs se baseia em flutuar dois resíduos de aminoácidos básicos presentes na α -hélice sobre o poro, que, por interações eletrostáticas com os íons K^+ , impede que estes entrem no canal (Tseng *et al.*, 2007).

As toxinas interagem com o seu canal alvo por propriedades estruturais específicas (Fig. 6). Inicialmente foi proposto um modelo de ligação denominado “modelo da díade”, que está associado a dois resíduos de aminoácidos (Lys e um resíduo aromático) presentes nas KTxs como regiões de interação com os resíduos de aminoácidos da superfície do poro do canal alvo (Dauplais *et al.*, 1997). Essa díade passou a ser o modelo compartilhado com mais três modelos de interação toxina-canal iônico (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004). A presença de (Lys, Tyr/Phe) na fita- β das toxinas favorecem o contato desta superfície da toxina com o poro do canal, assim como com as novas KTxs de característica ácida (Chen *et al.*, 2012). O modelo de anel básico está associado à presença de quatro ou cinco resíduos básicos não idênticos, distribuídos na toxina, que permitem a interação destas com o canal iônico. O modelo apamina-*like* está associado à presença de resíduos básicos na α -hélice da toxina, sendo essa a região de contato com o poro do canal iônico. Por último, o modelo de duas cabeças está associado à distribuição de aminoácidos na toxina de tal modo que permite atribuir nela uma região hidrofílica e outra hidrofóbica. Este modelo específico para γ -KTxs apresenta contato de vários pares de aminoácidos toxina-canal, favorecendo uma interação diferenciada dos outros modelos (Tseng *et al.*, 2007).

Adicionalmente a estes modelos, uma última descoberta sobre a atividade biológica de algumas α -KTxs foi caracterizada. E em 2008 Abdel-Mottaleb e colaboradores propuseram um modelo denominado “hot spot” que explica a atividade de toxinas da subfamília α -KTxs sobre canais tipo hERG. Esta característica das α -KTxs envolvidas é dado pela presença de dois resíduos de aminoácidos básicos localizados entre a terceira e quarta cisteína da estrutura primária da molécula (Abdel-Mottaleb *et al.*, 2008).

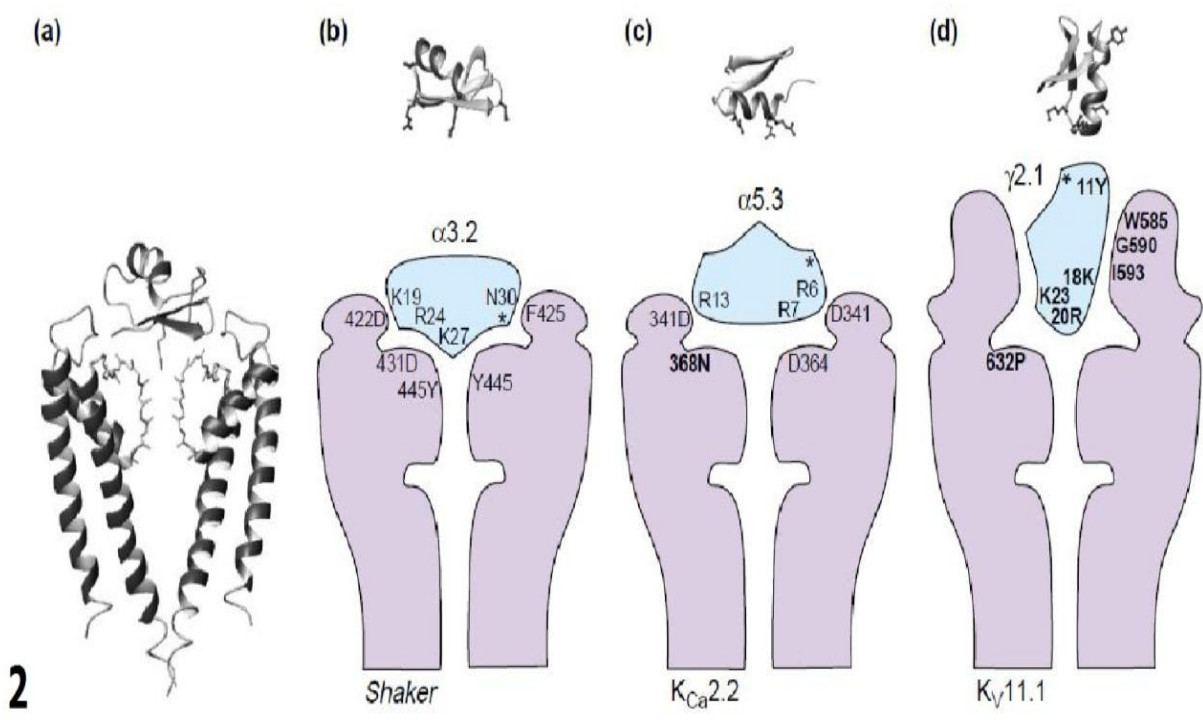
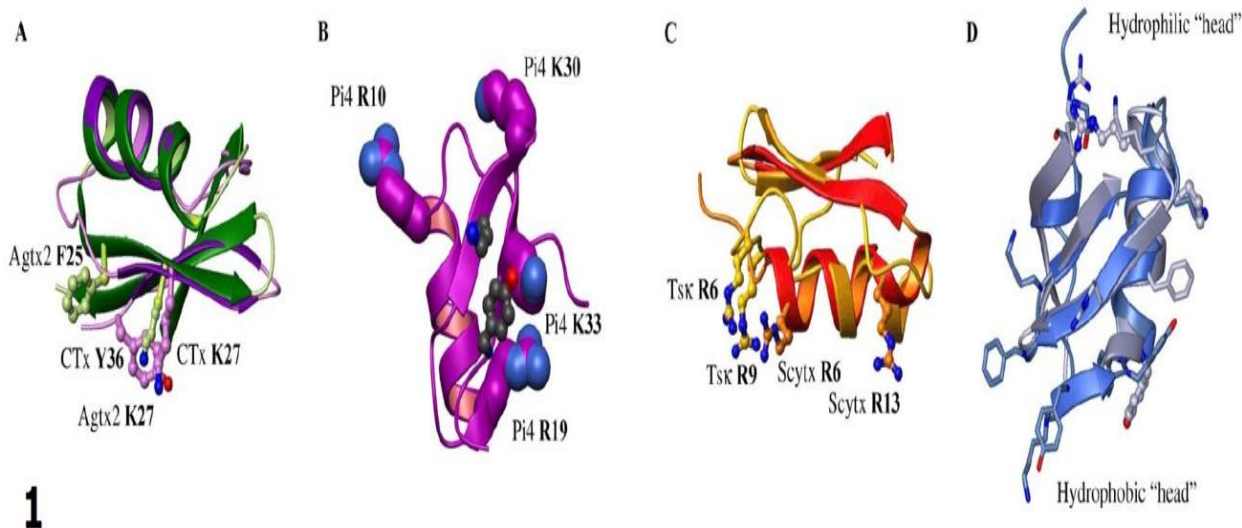


Figura 6. Modelos de interação toxina-canal iônico para potássio. 1. Distribuição na toxina de aminoácidos chaves na interação, **A**. Modelo da “díade” de duas toxinas Agtx2 e Caribdotoxina (CTx) com suas K e Y situadas na fita- β , **B**. Modelo do anel básico da Pi4 apresentando quatro resíduos básicos posicionados aleatoriamente na toxina **C**. Modelo apamin-*like* de duas toxinas, a Tsk e a Scytx com resíduos básicos situados na α -hélice **D**. Modelo duas cabeças apresentando dois polos nas toxinas CnErg (azul) e BeKm-1 (cinza). 2, interação Toxina-canal iônico. Segundo a distribuição dos aminoácidos chaves, é o contato da estrutura secundária da toxina com o poro do canal. Retirado de Rodríguez de la Vega & Possani, 2003; 2004.

Os primeiros cinco modelos de interação já descritos podem simplesmente explicar como a toxina interage com o canal iônico alvo. Para todos eles, a superfície de contato da toxina com o canal iônico é dependente da distribuição dos aminoácidos chaves de interação na estrutura primária do peptídeo. Entretanto, estes modelos não são caracterizados como regra geral devido a possíveis inconsistências. O modelo “hot spot” proposto apresenta essas inconsistências. Toxinas da subfamília α -KTx que teoricamente só agem sobre canais para K_v ou K_{Ca} , foram ativas sobre canais tipo hERG, que teoricamente, eram exclusivos alvos das γ -KTxs (Abdel-Mottaleb *et al.*, 2008). Recentemente com uma caracterização da k-BuTx-Tt26 purificada da peçonha do escorpião *Tityus trivitattus*, foi descrita uma estrutura tridimensional que se diferencia da estrutura convencional CS α / β das α -KTx. A nova estrutura CS α / α , descreve a ligação por ligações dissulfeto de duas estruturas α -hélice, ao invés de se ligar uma fita- β com uma α -hélice (Saucedo *et al.*, 2012). Segundo os autores, este novo arranjo da molécula, como estrutura alternativa, poderia ser uma variante ao modelo da díade, dado a disposição dos resíduos de aminoácidos K e Y dispostos na estrutura primária. Ainda mais específica, foi a descrição da interação toxina-canal iônico descrita para a Tc38 (Fig. 7). Neste modelo se explica que a interação e especificidade de uma KTxs dependem do resíduo de aminoácido K, independentemente de se cumpre ou não o modelo da díade, também não diferencia a localização deste resíduo na estrutura primária da molécula, mas sim as características físico-químicas que oferece os resíduos de aminoácidos próximos à K, ou superfície de contato da toxina com o canal iônico (Stehling *et al.*, 2012).

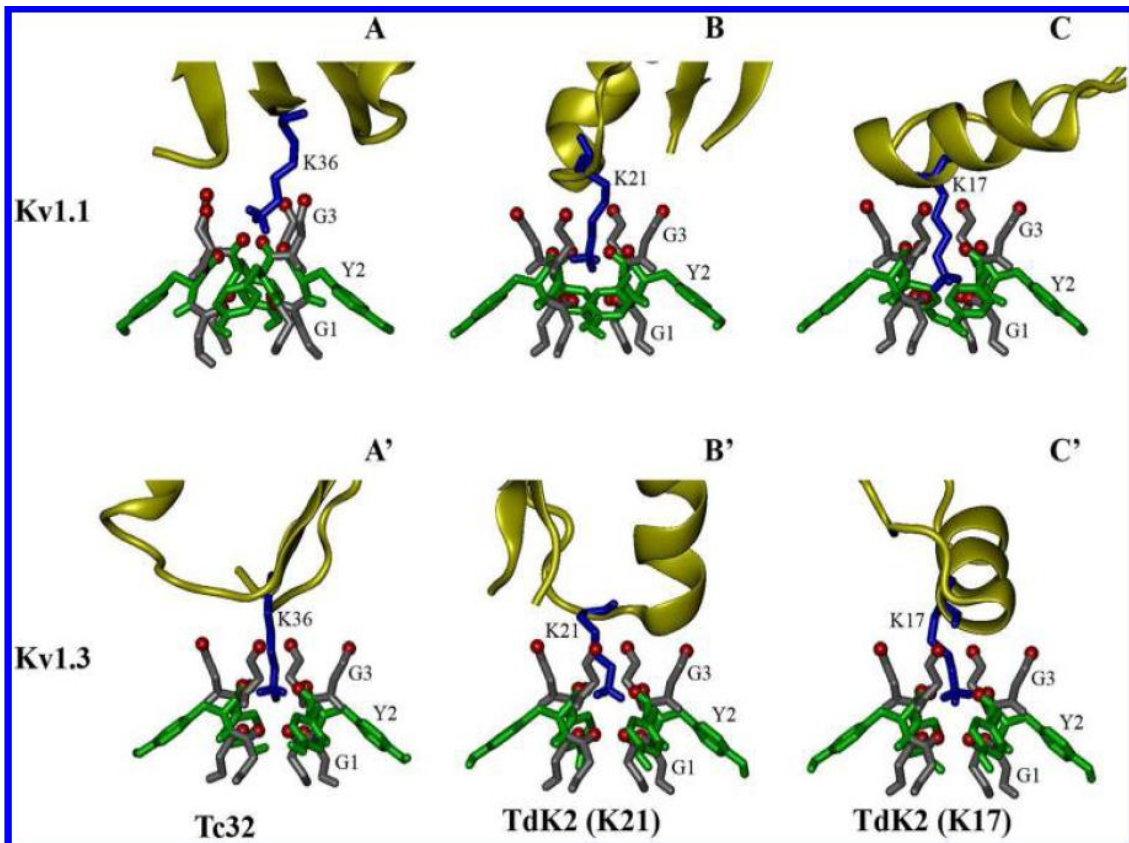


Figura 7. Interações da K (Azul) da Tc32 com resíduos de aminoácidos (G e Y) do filtro do canal. Toxinas da subfamília α -KTx18 (Amarelo) são apresentadas interagindo com dois subtipos de canal para K^+ , $K_v1.1$ e $K_v1.3$. Nesta figura consegue-se destacar a importância do resíduo de Lys presente nas toxinas, na obstrução do filtro de seletividade do canal iônico. Retirado de Stehling *et al.*, 2012.

2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Paralelamente aos estudos que visam compreender o escorpionismo e buscar soluções para este problema de saúde pública, a peçonha destes animais tem sido objeto de estudo, pois, entre seus componentes, existe uma grande variedade de moléculas com diversas atividades biológicas (Loret & Hammock, 2001). Estes estudos podem representar avanços biotecnológicos ou farmacológicos com possíveis aplicações terapêuticas (Cologna *et al.*, 2009; Mouhat *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega & Possani, 2005) como, por exemplo, desenvolvimento de fármacos (Vetter *et al.*, 2011) ou tratar doenças do SNC (Gati *et al.*, 2012). A TM-601, uma clorotoxina purificada do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* está em processo de aprovação para seu uso como fármaco contra um tipo de câncer de cérebro. Esta toxina consegue se ligar na superfície das células do glioma impedindo a proliferação anormal destas células neuronais (Vetter *et al.*, 2011).

Em princípio, para este trabalho, novas KTxs podem ser descritas da peçonha do escorpião *Tityus* sp., com variações estruturais e possíveis propriedades farmacocinéticas diferentes às das toxinas já reportadas na literatura, podendo ser visualizadas como possíveis ferramentas terapêuticas. Adicionalmente, a identificação de precursores KTxs extraídos do DNA complementar da glândula de peçonha deste escorpião, adicionará informação importante sobre o processo metabólico que estas toxinas sofrem após transcrição permitindo no futuro, por exemplo, reproduzir via genética estas KTxs diminuindo custos por processos bioquímicos convencionais. Essas novas descobertas podem servir de base também para identificar outros parâmetros dos escorpiões como o seu metabolismo molecular e bioquímico, sua biologia e evolução das toxinas nestes animais, ajudando a elucidar, inclusive, a evolução deles mesmos.

Por último, *Tityus* sp. é um escorpião que apresenta contato com a população humana, porém, ainda não existem registros epidemiológicos formais e sua pesquisa está apenas começando. Por ser uma espécie em processo de descrição, pouco se conhece sobre este escorpião.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar química e biologicamente, pelo menos, um peptídeo bloqueador de canal para potássio da peçonha do escorpião *Tityus* sp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir uma biblioteca de cDNA da glândula da peçonha do escorpião *Tityus* sp. procurando precursores de KTx;
- Extrair a peçonha por eletroestimulação e fracionar esta por HPLC procurando KTx;
- Determinar a massa molecular das KTx encontradas na peçonha;
- Purificar e caracterizar bioquimicamente pelo menos uma KTx dessa peçonha;
- Caracterizar a atividade biológica dessa KTx em canais para K⁺.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ESCORPIÕES

Escorpiões adultos da espécie *Tityus* sp. foram coletados no Departamento del Cauca, Município de Popayán na Colômbia (2°26'39''N, 76°36'18''W) com ajuda de uma lâmpada de luz ultravioleta e pinças. Estes animais estão adaptados a viver em edificações e possuem hábito noturno. Os exemplares foram armazenados em caixas individuais e levados até o biotério do *Centro de Investigaciones Biomédicas de La Universidad del Cauca* - CIBUC. No CIBUC, os animais foram mantidos em condições favoráveis, alimentados uma vez por semana com baratas, com água *ad libitum* e em temperatura de 22±2 °C.

4.2 EXTRAÇÃO DA PEÇONHA E QUANTIFICAÇÃO

A peçonha foi obtida de 50 exemplares de escorpiões, fêmeas e machos, por meio de estimulação elétrica mensal. O estímulo elétrico foi dado diretamente no télson do animal com parâmetros da corrente que minimizam o estresse provocado ao mesmo. Para isso, utilizou-se um gerador de impulsos elétricos “Lafayette Instruments Company 824151S” calibrado para corrente direta evitando ao máximo o dano nos tecidos. Cada escorpião foi imobilizado pelo tórax em uma base de madeira e, com o auxílio de pinças na região do télson, a eletroestimulação foi realizada utilizando dois eletrodos dispostos entre o 5º segmento da cauda e o télson. Foram aplicados cinco pulsos por escorpião com um tempo de, no máximo, dois segundos cada, coletando a peçonha extraída em um tubo tipo *ependorf*. Uma vez coletado o *pool* de peçonha desse lote de animais, este foi ressuspendido em 500 µL de água Milli-Q e centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. A dosagem de proteína do sobrenadante foi feita pelo método de Biuret (Allan, 1948). Após a quantificação, as alíquotas da peçonha foram liofilizadas e armazenadas a -80°C até seu uso.

4.3 CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DO ESCORPIÃO *Tityus* sp.

Para a construção da biblioteca de cDNA da glândula do escorpião *Tityus* sp. foram utilizados dois espécimes, um macho e uma fêmea, e dois *Kits*, o primeiro para a extração do RNA total da glândula, e o segundo para síntese do cDNA e sua replicação. Os animais foram estimulados eletricamente no télson para extração da peçonha e cinco dias depois os télsons destes animais foram removidos para a extração do RNA total.

4.3.1 Separação do RNA das glândulas com o “*Kit ZR-Duet DNA/RNA Mini Prep (D7001)*”

Seguindo as especificações do fabricante, as glândulas dos escorpiões foram homogeneizadas em 400 µL do tampão de lise. A solução resultante foi transferida para uma coluna *Zymo-Spin IIIC* e centrifugada a 12.000 g por 1 minuto. Ao filtrado, adicionaram-se 320 µL de etanol absoluto, transferindo-o à coluna *Zymo-Spin IIC*. Após centrifugação a 12.000 g por 1 minuto, o filtrado foi descartado. Adicionaram-se 400 µL do tampão de extração de RNA à coluna e esta foi centrifugada a 12.000 g por 1 minuto, descartando-se o filtrado. A coluna foi lavada duas vezes com o tampão de lavagem de RNA. Por último, adicionaram-se 30 µL de água livre de DNase/RNase diretamente na matriz, incubando por 1 minuto, e centrifugando a 10.000 g por 30 segundos. O filtrado contendo RNA total, foi, então, quantificado com espectrometria *nanovue* e armazenado a – 80°C até a síntese de cDNA.

4.3.2 Síntese da primeira fita de cDNA, ou ssDNA, com o “*In Fusion SMARTer cDNA Library Construction Kit*” Clontech Laboratories, Inc.

O cDNA foi sintetizado seguindo o protocolo do fabricante utilizando os oligonucleotídeos 3’SMART CDS Primer II A (5’AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30N-1N-3’) 1,2 µM e SMARTer II A (5’AAGCAGTGGTATCAACGCA GAGTACXXXX-3’) 1,2 µM. Foram utilizados 51,94 ng/µL do RNA obtido do passo anterior, adicionado tampão (em concentração mM 50 Tris, 6 MgCl₂ e 75 KCl), dNTPs (1 mM) para a extensão, inibidor de RNase (1 U/µL) e a transcriptase reversa 10 U/µL (M-MvLV Reverse

Transcriptase Fermentas) para síntese do cDNA. Essa mistura foi incubada a 42 °C por 90 min.

4.3.3 Síntese da segunda fita de cDNA ou ds cDNA

Após síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNA, procedeu-se com a reação para a síntese da fita complementar. Foram utilizados reagentes do Kit, solução tampão (em concentração mM 25 Tris, 3 MgCl₂ e 37,5 KCl), dNTPs (0,2 mM), oligonucleotídeos (0,24 mM), polimerase 0,1 U/μL (USB® Taq DNA polymerase) e 5,5 μL da primeira fita sintetizada no processo anterior. As condições para otimização da PCR foram 24 ciclos de 95 °C por 1 min, mais 95 °C por 1 seg, 65 °C por 30 seg, 68 °C por 6 min, finalizando a 68 °C por 6 min e armazenando a 4 °C para continuar o seguinte passo. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose (1%) com marcador de 100pb (Fermentas).

4.3.4 Purificação do ds cDNA

O cDNA fita dupla (ds) foi purificado, por centrifugação, usando uma coluna cromatográfica CHROMA SPIN DEPC-1000. Neste processo foram utilizados glicogênio (0,12 μg/μL), acetato de sódio (0,12 M), etanol e 95 μL da amostra obtida no passo anterior. Após centrifugação da amostra na coluna, foi adicionado, junto com esses reagentes, 250 μL de etanol (100%) e armazenado por quatro horas a – 20 °C para precipitar o cDNA. Esta mescla foi centrifugada novamente por 20 min a 14.000 rpm, o pellet foi lavado de novo com 100 μL de etanol (70%), centrifugado y secado a temperatura ambiente. Por último foram adicionados 15 μL de água Milli-Q.

4.3.5 Inserção do ds cDNA no vetor

Os fragmentos de cDNA foram inseridos por recombinação no vetor linearizado pSMART2IF (Fig. 8). Neste processo foram utilizados tampão (em concentração mM 50 Tris, 6 MgCl₂ e 75 KCl), vetor (30 ng/μL), enzima (5 U/μL) e ds cDNA (37 ng/μL). A reação foi incubada no termociclador a 37°C por 15 min seguido de 50°C por 15 min. Então, o plasmídeo foi armazenado a -20°C até o processo de transformação bacteriana.

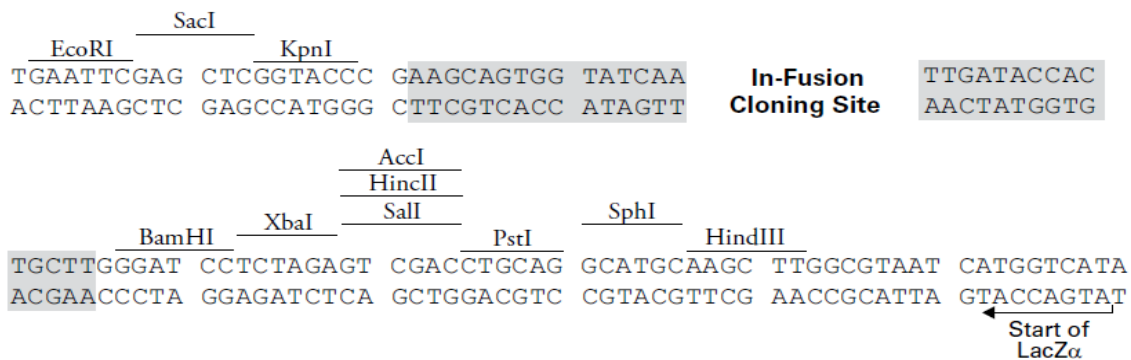
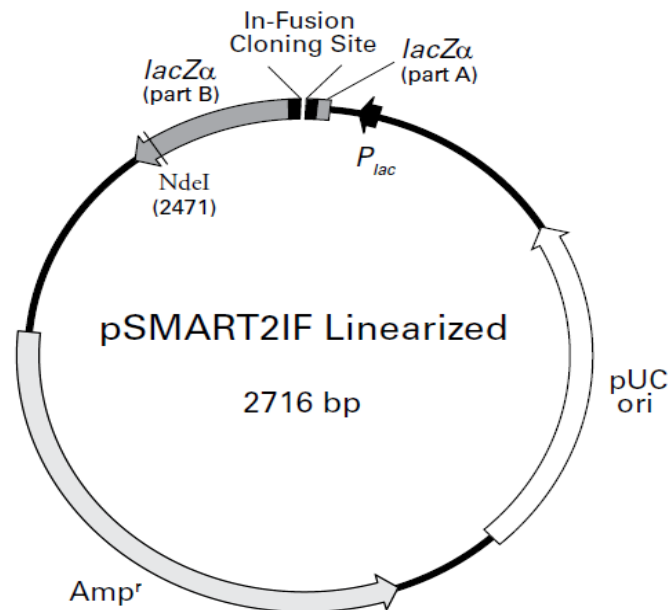


Figura 8. Mapa do vetor. A região cinza do vetor (nucleotídeos sinalados) que é complementar ao extremo 5' do oligonucleotídeo SMARTer II A permite a inserção do cDNA. Esta região faz parte do gene *LacZα* que codifica β-galactosidase, uma enzima que permite distinguir plasmídeos com ou sem inserto, no fato de se sintetizar. O P_{lac} representa o promotor de replicação deste gene, o pUC é a origem de replicação do vetor e o gene (Amp^r) de resistência à ampicilina são parte do vetor.

4.3.6 Preparo de células competentes

Neste processo, células de *Escherichia coli* DH5α foram preparadas para receberem os plasmídeos contendo os insertos de cDNA. De um pré-inóculo desta linhagem uma alíquota de 500 µL foi adicionada a 500 mL de meio LB (constituído de peptona de caseína 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 1% (p/v) a pH 7,0) acrescentado de soluções estoque glicose 0,02

M e magnésio 0,02 M. As bactérias foram mantidas sob agitação constante a 37°C até obter-se uma OD_{600nm} 0,6. Em condições de baixa temperatura (0 a 4 °C) estas células foram isoladas do seu meio e ressuspensas em glicerol 10 % v/v. Utilizando câmara fria e material de laboratório resfriado, submetidas a centrifugação de 20 min cada, as células receberam mais três lavagens com glicerol 10 % até retirar teoricamente qualquer volume de meio remanescente, assim, na última centrifugação após descartar o sobrenadante, ficou como pellet, as células com o volume suficiente de glicerol para obter uma OD_{600nm} entre 200-250. Esta preparação foi aliqüotada de 100 µL em tubos *ependorf* e guardadas no -80 °C até a transformação.

4.3.7 Transformação de células competentes

Células competentes *E. coli* DH5α foram transformados com os plasmídeos contendo os insertos de cDNA por eletroporação por meio de um choque elétrico sob condições específicas de voltagem (2,5 kV) e tempo (5,0 ms).

4.3.8 Clonagem do material plasmidial

Logo depois, as células transformadas foram cultivadas em meio SOC (constituído de extrato de levedura 0,5% (p/v), Bacto-triptona 2% (p/v), NaCl 0,058% (p/v), KCl 0,018% (p/v), Mg 20 mM e glicose 20 mM, pH 7,0) por uma hora e alíquotas desta cultura foram transferidas para o meio LB ágar (constituído de peptona de caseína 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) e ágar bacteriológico 1,4% (p/v) a pH 7,0) para crescimento de colônias a noite toda a 37°C. Este meio de cultura estava adicionado de IPTG 1 mM, X-GAL 75 mg/mL e ampicilina 150 µg/mL.

4.3.9 Seleção do material plasmidial

A seleção das colônias foi feita por meio de PCR de colônia, nas condições de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Em seguida, 72 °C por 7 minutos e, por último, a 4 °C para finalizar a reação. Os produtos da PCR de colônia foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. As colônias que apresentaram insertos maiores de 500 pb foram submetidas à lise alcalina.

A lise alcalina permitiu isolar o plasmídeo do restante da célula bacteriana. Para isso, as colônias previamente selecionadas a partir dos resultados da PCR de colônia foram cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina 150 µg/mL por 16 horas a 37 °C. Após, as bactérias foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 6,000 rpm, logo depois, foram acrescentadas três soluções, 200 µL de cada. A solução I, em concentração mM (Dextrosa 50, Tris 25 e EDTA 10 a pH8), a solução II (SDS 1 %, NaOH 2 M) e por último, a solução III (KCH₃CO₂ 5M e ácido acético glacial). Posterior à centrifugação e isolamento do sobrenadante, foi precipitado o material genético com álcool em duas etapas (com álcool 100 % e 70 %). Ao precipitado secado a temperatura ambiente foi adicionado 50 µL de água mais RNase 0,1 mg/mL (RNase A, DNase and protease-free Fermentas). Os plasmídeos foram guardados em -80 °C até seu sequenciamento.

4.3.10 Sequenciamento dos plasmídeos e análises de bioinformática

Os plasmídeos purificados foram sequenciados a partir da sua extremidade 5' com o *Forward screening Primer* (Clontech) em um sequenciador automático ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas foram submetidas aos programas de busca de similaridade em bancos de dados não redundantes por meio dos algoritmos blastx e blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com valores de expectância (*e-values*) ajustados para $< 10^{-5}$ para a identificação das possíveis funções e estrutura desses compostos. Simultaneamente, essas sequências de nucleotídeos foram traduzidas com o programa BioEdit. A comparação dessas sequências peptídicas com outras disponibilizadas na rede foi feita com protein blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). A região de provável peptídeo sinal de cada sequência de aminoácidos foi predita pelo programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Os alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As massas moleculares teóricas monoisotópica e média das sequências putativas de novas KTxS foram calculadas pelo programa PeptideMass

(<http://web.expasy.org/peptidemass/>) e comparadas às dos peptídeos isolados diretamente da peçonha.

4.4 FRACIONAMENTO DA PEÇONHA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A peçonha extraída dos escorpiões foi fracionada em sistema RP-HPLC utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 µm). Alíquotas de 1 mg de peçonha ressuspensa em TFA 0,12% (solução A) foram cromatografadas utilizando um gradiente linear de 0 a 60% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 60 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi lida a 216 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente, secas sob vácuo e armazenadas a -20°C.

As frações cromatográficas de interesse foram recromatografadas com gradientes otimizados de solução B com a mesma coluna.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As massas moleculares dos componentes presentes nas frações de interesse foram determinadas em um espectrômetro de massa tipo MALDI TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). Cada fração cromatográfica de aproximadamente 100mV de intensidade de absorbância foi dissolvida em 10 µL de água deionizada e colocada, em triplicata, com a matriz saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3%;5:4:1;v:v:v), sendo 3 µL de matriz para 1 µL de amostra, na placa (MTP Anchorchip 600-384) de aço inoxidável do equipamento. As massas moleculares foram medidas em modo linear e refletido positivo. Massas acuradas foram medidas no espectrômetro micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização eletrospray (ESI) ortogonal, operado em modo positivo. As amostras foram diluídas em concentrações

variadas em uma solução de acetonitrila 50% contendo 4% de ácido fórmico, e, aplicadas no equipamento por infusão direta.

A fragmentação dos peptídeos para o posterior sequenciamento MS/MS foi realizada por MS-MS utilizando a matriz 1,5-Diaminonaphthalene (1,5-DAN). Após aquisição, todos os espectros foram analisados mediante o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha).

As massas moleculares e as sequências parciais obtidas foram comparadas aos dados obtidos da análise da biblioteca de cDNA.

4.6 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS AMINOÁCIDOS

Os peptídeos purificados e de quantidade foram também sequenciados por degradação automática de Edman por meio de um Sequenciador de Peptídeos e Proteínas Beckman LF 3000 Protein Sequencer (Palo Alto, CA, EUA). Essa etapa foi realizada no Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México (em colaboração com Dr. Lourival Possani).

4.7 CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

Os ensaios eletrofisiológicos foram realizados pela técnica de *patch clamp* utilizando células de Gânglio Dorsal de Rato (DRG), isoladas de *Rattus norvegicus*. Foram utilizadas 12 células para o estudo com capacitância média de $38,5 \pm 5,1$ pF e uma densidade de corrente de $302,2 \pm 36,8$ pA/pF. As células foram transferidas e mantidas em solução externa constituída de (em mM): NMDG 140, KCl 5, D-glicose 5, HEPES 10, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 e $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 em pH 7,4. A solução interna da pipeta de *patch clamp* foi constituída de (em mM) KCl 140, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, EGTA 11, HEPES 10, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 a pH 7.2.

As medidas de correntes foram feitas utilizando micropipetas de borossilicato de resistência aproximadamente 2 M Ω , quando preenchidas com

a solução interna. As correntes iônicas foram medidas na configuração “whole-cell”. Foram utilizados dois protocolos de voltagens. No primeiro, após o selo ter sido estabelecido, a célula foi submetida a um potencial de -60 mV, constante ao longo do tempo (holding). No segundo, foi aplicada uma “rampa” de voltagem entre -100 e $+100$ mV, por dois segundos, da qual foi obtida a relação corrente-voltagem. As respostas de corrente foram armazenadas em microcomputador, com auxílio de uma placa de conversão analógica e digital e analisadas “off-line” por programas adequados.

Adicionalmente, dois peptídeos dos purificados da peçonha do escorpião *Tityus* sp. foram testados em canais para potássio hK_v1.1 e hK_v1.4 expressos em células de ovário de hamster chinês (CHO). O protocolo de preparo das células, expressão dos canais iônicos e os testes eletrofisiológicos foram feitos como descrito por (Camargos *et al.*, 2011).

5. RESULTADOS

5.1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DO ESCORPIÃO.

A extração do RNA total das glândulas dos escorpiões resultou em 4,452 µg do material. Inicialmente, uma alíquota de 0,52 µg do RNA total foi usado para a síntese das primeiras fitas de cDNA, a partir das quais foram sintetizadas e purificadas as fitas de ds cDNA. A quantidade de ds cDNA sintetizado (522,5 ng/µL) e avaliado por espectrofotometria (*Nanovue*, General Electric Company) foi de 52,25 µg, e seu resultado no gel apresentou uma banda de boa qualidade (Fig. 9A). Após a purificação do ds cDNA, obteve-se 3,9 µg de ds cDNA por cromatografia. Uma alíquota (600ng) deste foi usada para inserção no vetor (300 ng), e o produto foi usado na transformação bacteriana.

Após conseguir as células competentes, estas foram transformadas por eletroporação para inserção dos plasmídeos. As células transformadas foram cultivadas em meio líquido enriquecido com nutrientes e foram cultivadas em placas com meio LB ágar com ampicilina. Aquelas células que receberam o plasmídeo conseguiram crescer como colônias independentes devido à presença do gene que expressa resistência a ampicilina.

O título da biblioteca de cDNA foi de 2×10^3 colônias. A discriminação das colônias selecionadas foi feita pelo tamanho das bandas no gel da PCR de colônia. Das 350 colônias isoladas, 144 colônias brancas (se esperava tinham plasmídeo com inserto) foram submetidas a PCR de colônia. Por avaliação do gel (Fig 9C), foram escolhidas 118 colônias, as quais possuíam tamanho entre 500 e 1000 pb. Como apresentado na figura 9B, foram descartadas colônias que apresentavam dupla banda (colônia Tsp108), e as colônias que não tinham material representativo (colônia Tsp94).

As colônias selecionadas por PCR foram submetidas à lise alcalina (Fig. 9C). Foram selecionados e encaminhados ao sequenciamento 72 plasmídeos. O critério de seleção foi verificar efetivamente as bandas que representam as formas de arranjo destes plasmídeos. Como observado na figura 9C, aqueles

plasmídeos que sumiram (Colônia Tsp29) não foram selecionados para sequenciamento.

Para o sequenciamento foram utilizados 190 ng de plasmídeo em 5 μ L de solução. A quantificação plasmidial foi por comparação no gel de todas as colônias de lise alcalina utilizando como padrão o primeiro plasmídeo sequenciado e do qual foi determinado o primeiro precursor de uma α -KTxs. O critério de seleção foi a intensidade das bandas no gel quando comparadas às colônias com o controle (Fig. 9C).

Após revisão dos plasmídeos no gel de PCR da colônia que codificaram estas KTxs, foi identificado que suas bandas se encontravam ao mesmo nível entre 700 e 800 pb. Uma análise feita da sequência dos plasmídeos, mostrou que todos os precursores das prováveis KTxs (Tpy1, Tpy2, Tpy3, Tpy4 e Tpy5) encontrados neste trabalho, tinham a mesma quantidade de códons (61) independentemente do número de resíduos de aminoácidos que transcreve para KTxs madura, 38 para discrepina-*like*, 39 para butantoxina-*like* e 35 para o Tpy5 (Figs. 10 e 11). Neste caso, o que variou foi o número de aminoácidos do peptídeo sinal. Teoricamente para o Tpy4, o seu peptídeo sinal é menor em um resíduo de aminoácido, pois esta KTx precursora começaria a sua sequência com uma cisteína, de acordo com o programa *SignalP*. Dos cinco precursores encontrados, só as sequências que codificam para as Tpy1, Tpy3 e Tpy5 foram obtidas mais de um clone (2, 5 e 3 respectivamente) formando um *contig* para cada. As outras duas α -KTxs foram clones únicos (*singlets*).

Por meio do sequenciamento e análises de bioinformática, foram obtidos precursores entre *singlets* e *contigs* que compartilham similaridade com diversas espécies de escorpiões: peptídeos aniônicos, proteínas hipotéticas, peptídeos antimicrobianos, RNA mitocondrial, neurotoxinas, peptídeos sem atividade biológica aparente, metaloproteases e cinco precursores de prováveis α -KTxs, sendo três KTxs semelhantes à α -KTxs15.6 e, portanto, denominadas aqui como discrepina-*like*, uma semelhante à α -KTxs12.1, e, portanto, denominada de butantoxina-*like* e o Tpy5 com similaridade à subfamília α -KTxs18. Um alinhamento dos precursores obtidos da glândula do escorpião *Tityus* sp. é apresentado (Fig.12). A comparação destes com suas toxinas homólogas disponibilizadas nos bancos de dados também (Fig. 13).

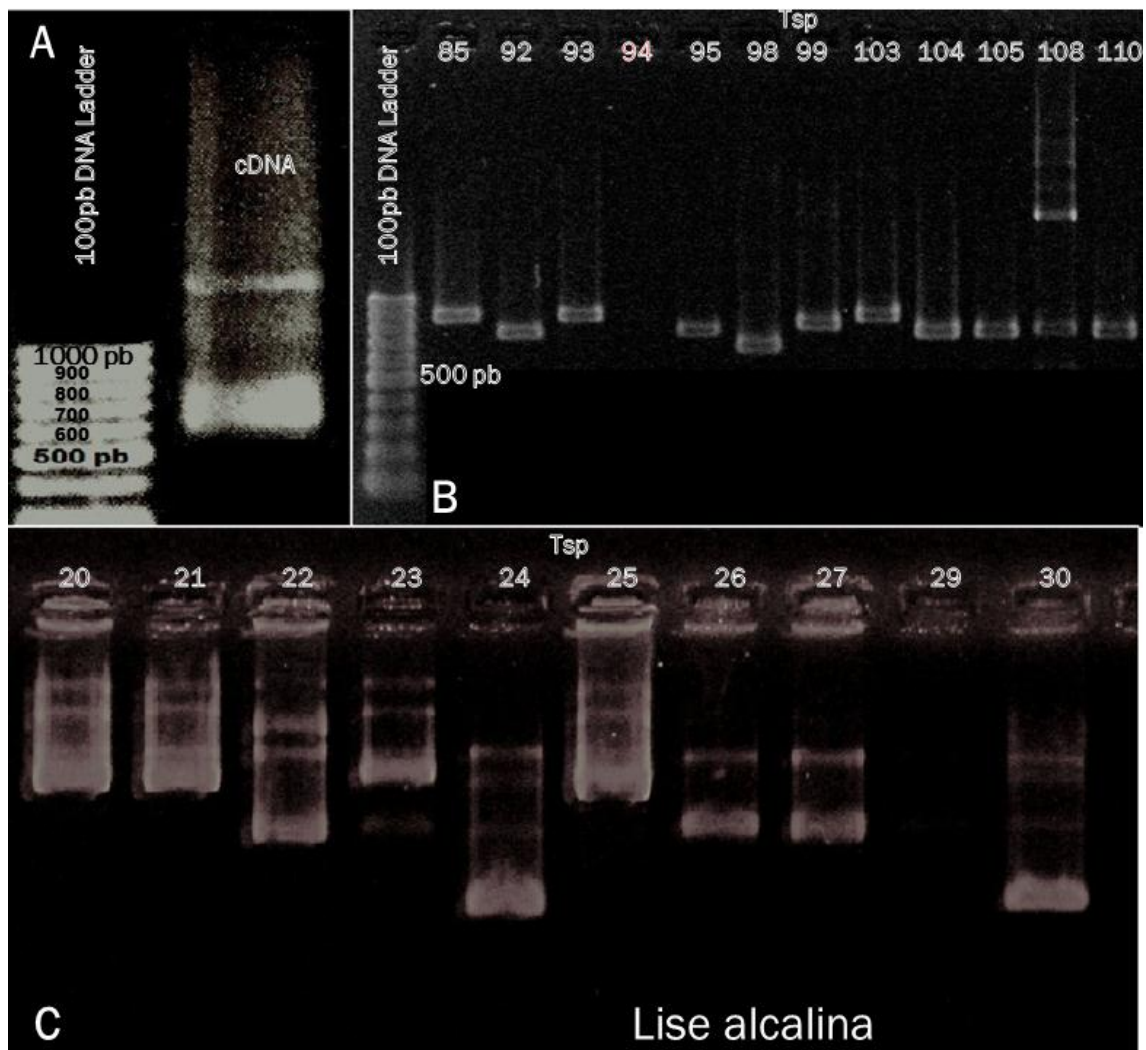


Figura 9. Gel de agarose dos cDNAs obtidos da glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. O marcador usado foi GeneRuler 100 pb (Fermentas). A: cDNA obtido a partir do RNA total da glândula de peçonha. B: Gel de agarose obtido da PCR da colônia. C: Gel de agarose obtido com os plasmídeos purificados por lise alcalina.

A discrepina (Fig. 13) é uma KTx isolada do escorpião *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2004). Esta toxina possui 38 resíduos de aminoácidos, 4.177,70 Da e, em um fracionamento da peçonha bruta desse escorpião em condições similares às usadas no presente trabalho, elui aos 23,65 min (23,65 % acetonitrila). A butantoxina, isolada do escorpião *T. serrulatus* (Novello *et al.*, 1999), possui 41 resíduos de aminoácidos, 4.520 Da e 8 cisteínas, que se arranjam formando quatro ligações dissulfeto (Fig. 13). A Tc32 ou α -KTx18.1 é uma toxina purificada do escorpião *Tityus obscurus*, possui 35 resíduos de aminoácidos e 3.521,50 Da de massa molecular (Batista *et al.*, 2002).

A

1	<u>ATG</u>	AAA	GCT	TTC	TAC	GGT	GTA	TTG	ATG	ATA	TTC	ATT	TTA	TGT	TCG
1	M	K	A	F	Y	G	V	L	M	I	F	I	L	C	S
46	<u>ATG</u>	TGT	TAC	ATT	CCA	GTT	GAT	TCG	CAA	ATT	GAT	ATA	AAT	GTT	GTT
16	M	C	Y	I	P	V	D	S	Q	I	D	I	N	V	V
91	TGC	ATC	AGA	TCA	TAT	GAC	TGT	AGA	GAA	CCA	TGT	ATA	ACC	CGA	AAA
31	C	I	R	S	Y	D	C	R	E	P	C	I	T	R	K
136	GGA	ACT	GCT	AAA	AGC	AAA	TGC	ATA	AAT	CGC	AGC	TGC	AAA	TGT	TAT
46	G	T	A	K	S	K	C	I	N	R	S	C	K	C	Y
181	CTA	TGA													186
61	L	*													

B

1	<u>ATG</u>	AAA	GCT	TTC	TAC	GGT	GTA	TTG	ATG	ATA	TTC	ATT	TTA	TGT	TCG
1	M	K	A	F	Y	G	V	L	M	I	F	I	L	C	S
46	<u>ATG</u>	TGT	TAC	ATT	CCA	GTT	GAT	TCG	CAA	ATT	GAT	ATA	AAT	GTT	AAA
16	M	C	Y	I	P	V	D	S	Q	I	D	I	N	V	K
91	TGC	AGC	GGA	TCG	CAG	CAT	TGT	AGA	CAA	CCA	TGT	ATA	GAC	CTA	AAA
31	C	S	G	S	Q	H	C	R	Q	P	C	I	D	L	K
136	AAA	ACT	GCT	AAA	AGC	AAA	TGC	ATA	AAT	CGC	AGC	TGC	AAA	TGT	TAT
46	K	T	A	K	S	K	C	I	N	R	S	C	K	C	Y
181	CTA	TGA													186
61	L	*													

C

1	<u>ATG</u>	AAA	GCT	TTT	TAC	GGT	GTA	TTG	ATG	ATA	TTC	ATT	TTA	TGT	TCG
1	M	K	A	F	Y	G	V	L	M	I	F	I	L	C	S
46	<u>ATG</u>	TGC	TCC	ATT	CCA	GTT	GAT	TCG	CAA	ATT	GAT	ATA	AAT	GTT	AAA
16	M	C	S	I	P	V	D	S	Q	I	D	I	N	V	K
91	TGC	AGC	GGA	TCG	CAG	CAT	TGT	AGA	CAA	CCA	TGT	ATA	GAC	CTA	AAA
31	C	S	G	S	Q	H	C	R	Q	P	C	I	D	L	K
136	AAA	ACT	GCT	GGA	AGC	AAA	TGC	ATA	AAT	GGC	AGA	TGC	AAA	TGT	TAT
46	K	T	A	G	S	K	C	I	N	G	R	C	K	C	Y
181	CCA	TGA													186
61	P	*													

Figura 10. Transcritos discrepina-like provenientes da glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. Os transcritos apresentam peptídeo sinal (precursor sublinhado), a sequência madura do peptídeo putativo em negrito destacando cisteínas em vermelho e o códon stop (TGA) finalizando o transcrito. **A:** Tpy1, **B:** Tpy2 e **C:** Tpy3.

A

1	ATG	AAA	GTT	TTT	TGT	GGT	ATA	TTG	TTA	ATA	TTT	ACC	TTA	TGT	TCC
1	M	K	V	F	C	G	I	L	L	I	F	T	L	C	S
46	ATG	ATT	TAT	TTG	AGT	GAG	CAA	TGC	TTT	ACC	TGC	CTA	GAT	ATT	GTT
16	M	I	Y	L	S	E	Q	C	F	T	C	L	D	I	V
91	TGC	GGA	GCA	TCC	CGA	GAA	TGT	TAT	GAT	CCC	TGT	TAT	AAA	GCA	TTT
31	C	G	A	S	R	E	C	Y	D	P	C	Y	K	A	F
136	GGA	AGA	GCC	CAC	GGC	AAA	TGT	ATG	AAT	AAC	AGA	TGC	AGA	TGT	TAT
46	G	R	A	H	G	K	C	M	N	N	R	C	R	C	Y
181	ACA	TAA													
61	T	*													

B

1	ATG	CAC	TTC	TCT	GGT	ATT	GTT	TTC	ATT	CTT	ATT	TCA	ATG	ACT	TTA
1	M	H	F	S	G	I	V	F	I	L	I	S	M	T	L
46	ATC	GAT	TCT	TTC	TTC	GAA	ATG	AAA	GTT	GAA	GCA	ACG	GGT	CCG	CAG
16	I	D	S	F	F	E	M	K	V	E	A	T	G	P	Q
91	ACT	GTG	TGC	GAG	GCT	TCG	ATA	TGT	GAG	GCG	GCA	TGT	AAA	CAA	ATG
31	T	V	C	E	A	S	I	C	E	A	A	C	K	Q	M
136	GGA	AAA	TCA	ATG	GAA	TCC	TGC	CAA	GGC	GAT	GCG	TGC	AAA	TGC	AAA
46	G	K	S	M	E	S	C	Q	G	D	A	C	K	C	K
181	GCC	TGA													
61	A	*													

Figura 11. Transcritos provenientes da glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. Os transcritos apresentam peptídeo sinal (precursor sublinhado) e a sequência madura do peptídeo putativo em negrito destacando cisteínas em vermelho. Os transcritos (A) Tpy4 ou butantoxina-like e o códon stop (TAA) finalizando o transcrito, (B) Tpy5 semelhante à subfamília α -KTxs18 e o códon stop (TGA) finalizando o transcrito.

																	#	R.
Tpy1	M	K	A	F	Y	G	V	L	M	I	F	I	L	C	S	M	C	61
Tpy2	M	K	A	F	Y	G	V	L	M	I	F	I	L	C	S	M	C	61
Tpy3	M	K	A	F	Y	G	V	L	M	I	F	I	L	C	S	M	C	61
Tpy4	M	K	V	F	C	G	I	L	L	I	F	T	L	C	S	M	C	61
Tpy5	-	M	H	F	S	G	I	V	F	I	L	I	S	M	T	L		61
	*	*	:	:	:	:	:	:	:	*	*	*	:	*	:	:	*	:

*resíduo idêntico, : conservativo, . semi-conservativo

Figura 12. Alinhamento de transcritos. Os transcritos encontrados na glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. apresentando peptídeo sinal, peptídeo maduro (em negrito) e número de resíduos de aminoácidos (# R). Em vermelho, aminoácidos que se diferenciam entre as Tpy2 e Tpy3.

As sequências maduras previstas para os precursores sequenciados discrepin-*like*, butantoxin-*like* e aquele da subfamília α -KTxs18 foram nomeadas Tpy, seguidas de numeração cronológica, e possuem igual número de resíduos de aminoácidos e de cisteínas às das suas KTxs similares já reportadas. Além destes, outros dados de características bioquímicas das KTxs já descritas são apresentados na Tabela 2.

sp.	Subfamília		Ident. %
A.a	alfa-KTx15.1	QNETNKKCQGGG-CASVCRRVIGVAAGK C INGRCVCYP-	35 37
B.m	alfa-KTx15.2	QVETNVK C QGGG-CASVCRKAIGVAAGK C INGRCVCYP-	40 43
A.m	alfa-KTx15.3	QIETNKKCQGGG-CASVCRK V IGVAAGK C INGRCVCYP-	40 43
A.a	alfa-KTx15.4	QIETNKKCQGGG-CASVCRRVIGVAAGK C INGRCVCYP-	40 43
A.a	alfa-KTx15.5	QVETNKKCQGGG-CASVCRRVIGVAAGK C INGRCVCYP-	40 37
T.d	alfa-KTx15.6	QIDTNVKCSGSSK C VKICIDRYNTRGAKCINGRCCTCYP-	50 57
A.a	alfa-KTx15.7	QVQTNKKCKGGG-CASVCAKEIGVAAGK C INGRCVCYP-	40 37
B.m	alfa-KTx15.8	QVSTNKKCSNTSQCYKTCEKVVGVAAGK C MNGKICICYP-	39 42
L.m	alfa-KTx15.9	QVSTNKKCSNTSQCYKTCEKVVGVAAGK C MNGKICICYP-	34 36
Tpy1	alfa-KTx15.10	QIDINVKCSGSQHCRQPCIDLKK TAKS KINRSCKCYL-	100
Tpy2	alfa-KTx15.11	QIDINVKCSGSQHCRQPCIDLKK TAGS KINGRCCKCYP-	-----
Tpy3	alfa-KTx15.12	QIDINVV C IRSYD C REP C ITRKGTAK S KINRSCKCYL-	100
		* . * * * . * . * . ** : * * **	

sp.	Subfamília		Ident. %
T.s	alpha-KTx12.1	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGK C MNNKRCY T -----	87
T.t	alpha-KTx12.2	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGK C MNNKRCY T -----	87
T.c	alpha-KTx12.3	WCSTCLDLECGASRECYDPCFKAFGRAHGK C MNNKRCY T -----	87
T.s	alpha-KTx12.4	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGK C MNNKRCY T -----	87
L.m	alpha-KTx12.5	--QKHTDIKCSSSSSCY E PCRGV T GRAHGK C MNGRC T CY Y -----	55
L.m	alpha-KTx12.6	--QNKLDVK C VRLE T CE R PC K Q L CLLPMK C MNGK C VC S PS R K I C	33
L.m	alpha-KTx12.7	--QK P TEIK C RY P AD C HIM C RV T GRA E GK C MNGK C T C Y Y -----	42
Tpy4	alpha-KTx12.8	-C F TCLD I VC G ASRECYD P CY K AF G RAHGK C MNN R CR C Y T -----	100
		. : * * * * * : * *	

sp.	Subfamília		Ident. %
T.o	alpha-KTx18.1	--TGPQ T T C QAAM C EAG K GL G K S ME S CQGD T C K KA	77
T.d	alpha-KTx18.2	--TGPQ T T C AST C EAG K Q I G K SM K SCQGD T CE C A-	73
T.d	alpha-KTx18.3	-G E GP K SD C K P DL C E A AK D L G K P MD F CK D GT C K C --	47
Tpy5	alpha-KTx18.4	--TGPQ T V C E A S I C E A A CK Q M G K S ME S CQGD A CK K KA	100
		** : : * : . * * * . * * : * * . * : . . . : * *	

*resíduo idêntico, : conservativo, . semi-conservativo

Figura 13. Alinhamento das toxinas das subfamílias α -KTxs15, α -KTxs12 e α -KTxs18. Comparação dos transcritos encontrados na glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. com as toxinas reportadas na literatura. Cisteínas marcadas (faixa) em cinza e os resíduos de aminoácidos que por alinhamento cumprem com o modelo de "díade" marcado (faixa) em amarelo, a identidade (Ident.%) dos transcritos com suas toxinas homólogas e (sp.) a espécie de escorpião do qual foi purificada (A.a *Androctonus australis*, B.m *Buthus martensi*, A.m *A. mauretanicus*, T.d *Tityus discrepans*, L.m *Lychas mucronatus*, T.s *T. serrulatus*, T.t *T. trivittatus*, T.c *T. cambridgei*, T.o *T. obscurus* e T.d *T. discrepans*).

Tabela 2. Características gerais dos transcritos do escorpião *Tityus* sp. comparados às toxinas homólogas. As massas moleculares experimentais dos peptídeos Discrepina, Butantoxina e Tc32 (α -KTxs18) são apresentadas, bem como as massas moleculares teóricas dos peptídeos maduros, Tpy1 a Tpy5. (a.a.) número de resíduos de aminoácidos e (N-T) N-terminal daquelas toxinas.

KTxs	a.a.	Massa (Da)	N-T	Cys	A. Biológica
Discrepina	38	4.177,70	Q	6	Inibe correntes em K_v
Tpy1	38	4.356,16	Q	6	
Tpy2	38	4.288,14	Q	6	Por similaridade
Tpy3	38	4.171,02	Q	6	
Butantoxina	40	4.508,08	W	8	Bloqueador de K_{Ca}^{+2}
Tpy4	39	4.450,88	C	8	Por similaridade
α -KTxs18	35	3.521,50	T	6	Bloqueador de $K_v1.3$
Tpy5	35	3.590,50	T	6	Por similaridade

5.2 FRACIONAMENTO DA PEÇONHA POR HPLC

A finalidade desta técnica é isolar o material de interesse nesta pesquisa, procurando os transcritos identificados na biblioteca de cDNA. O fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus* sp. originou 54 frações cromatográficas. As frações mais abundantes eluíram nos tempos de retenção entre 33 e 41 minutos, correspondendo a 33-41 % de acetonitrila. Porém, as frações cromatográficas de maior interesse, neste projeto, são aquelas que eluem entre os tempos a retenção de 18 e 33 minutos, correspondendo a 18-33 % de acetonitrila (Fig. 14). Esta é a faixa de eluição de outras KTxs já descritas de diferentes espécies de escorpiões (Selisko *et al.*, 1998; Srinivasan *et al.*, 2002; D'Suze *et al.*, 2004; Carmargos *et al.*, 2011). Zhu e colaboradores, em 2010, identificaram no cromatograma da peçonha do escorpião *Mesobuthus eupeus*, os locais onde eluem as diferentes famílias de toxinas. Assim, foi selecionada esta última faixa (18-33% de B) onde se esperava eluir os peptídeos que bloqueiam os canais para potássio. O critério de seleção para continuar purificando foi utilizar frações de maior intensidade nesta faixa de eluição como apresentado no cromatograma (Fig 14).

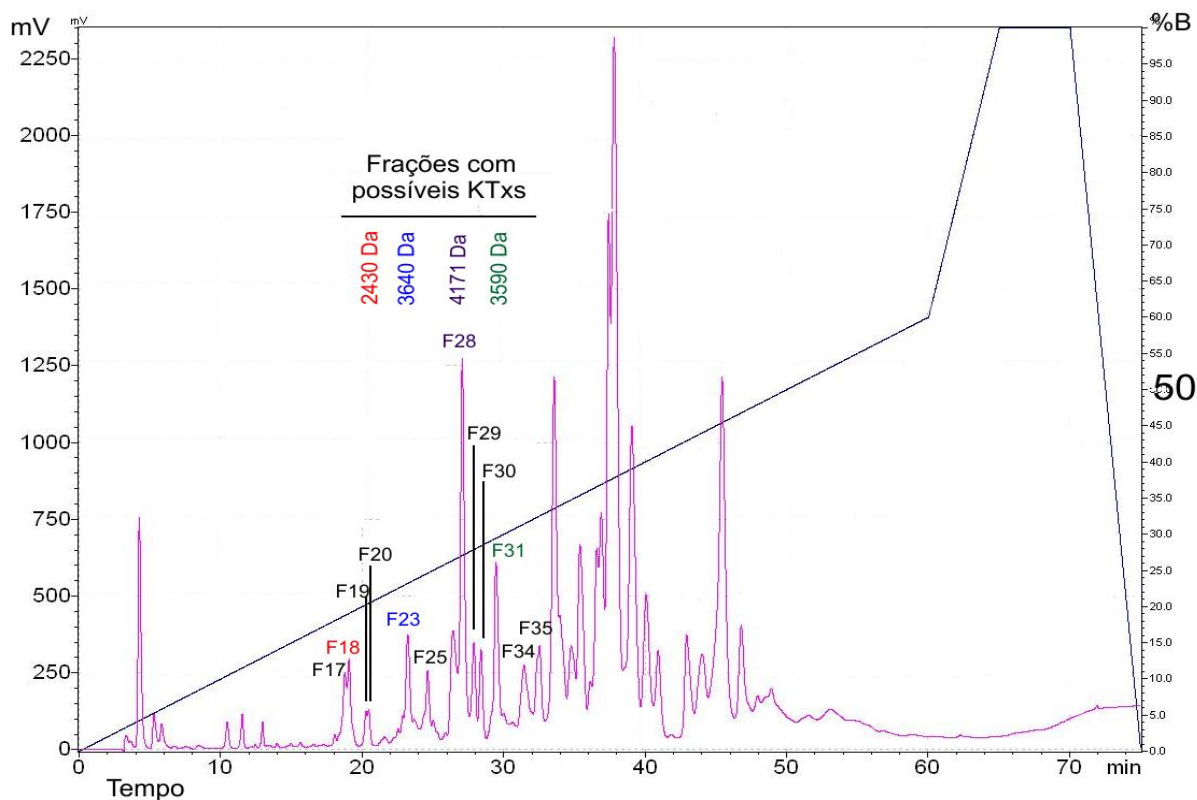


Figura 14. Cromatograma da peçonha bruta do escorpião *Tityus* sp. Neste se apresenta a faixa das frações objetivo deste estudo. As frações pesquisadas estão numeradas da F17 até F35, destas se identificam com cores aquelas frações onde eluíram as KTxs (2430 Da, 3640 Da, 4171 Da e 3590 Da).

Antes de purificar as frações de interesse, foi feita uma análise de onde poderiam eluir os transcritos discrepina-*like*. Comparando os nossos resultados com o trabalho que descreve a discrepina (D'Suze *et al.*, 2004) sugeriu-se os tempos de eluição das Tpy1, Tpy2 e/ou Tpy3 (26-28 min). Foram selecionadas 12 frações sem incluir frações de menor tamanho na faixa da fração 17 até 35. Após isso, estas frações selecionadas foram recromatografadas e tiveram suas massas moleculares identificadas na Tabela 7.

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS FRAÇÕES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS

Os passos a continuação incluem purificação do material, seleção desse material mais abundante de cada fração e reunião do mesmo prévio à análise de massa feita por MALDI-TOF/TOF. Este último passo é importante porque permitiu reunir material principal que elui em uma fração, com o mesmo material que eluiu em outras frações e com menor intensidade.

Após purificação do material, foi selecionado aquele material que por quantidade permitiu continuar com o processo de caracterização bioquímica e atividade biológica. Foi feito sequenciamento por MS-MS e degradação de Edman, medição de massa acurada por ESI, e, por último, as toxinas selecionadas como possíveis KTx foram testadas em correntes de potássio de neurônios do gânglio da raiz dorsal de rato. O passo do sequenciamento foi critério de seleção para definir possíveis KTx quando comparadas com toxinas disponibilizadas em bancos de dados. Como resultado, se descreve quatro toxinas denominadas aqui como Tx, seguido da massa inicialmente determinada com MALDI-TOF/TOF (Tx2430 da F18, Tx3590 da F31, Tx3640 da F23 e Tx4171 da F28). A massa molecular experimental feita com ESI foi comparada com a teórica identificando o erro por meio da fórmula:

$$\Delta_m = \frac{[m_T - m_E]}{m_T}$$

Onde, m_T é a massa teórica e, m_E é a massa experimental da molécula. O valor resultante se apresenta em partes por milhão (ppm).

5.3.1 fração 17

Nesta fração seis componentes com diferentes características hidrofóbicas foram separados (Fig. 15). Após análise da intensidade de material no cromatograma, foi determinado que a fração de maior intensidade não teve quantidade suficiente para continuar purificação e caracterização bioquímica. Embora, a análise da massa molecular feita por MALDI-TOF/TOF dos componentes de maior intensidade permitiu identificar uma toxina (2430 Da) de interesse que eluiu em outra fração, isso dado às características tanto de massa quanto da porcentagem de acetonitrila na que eluiu.

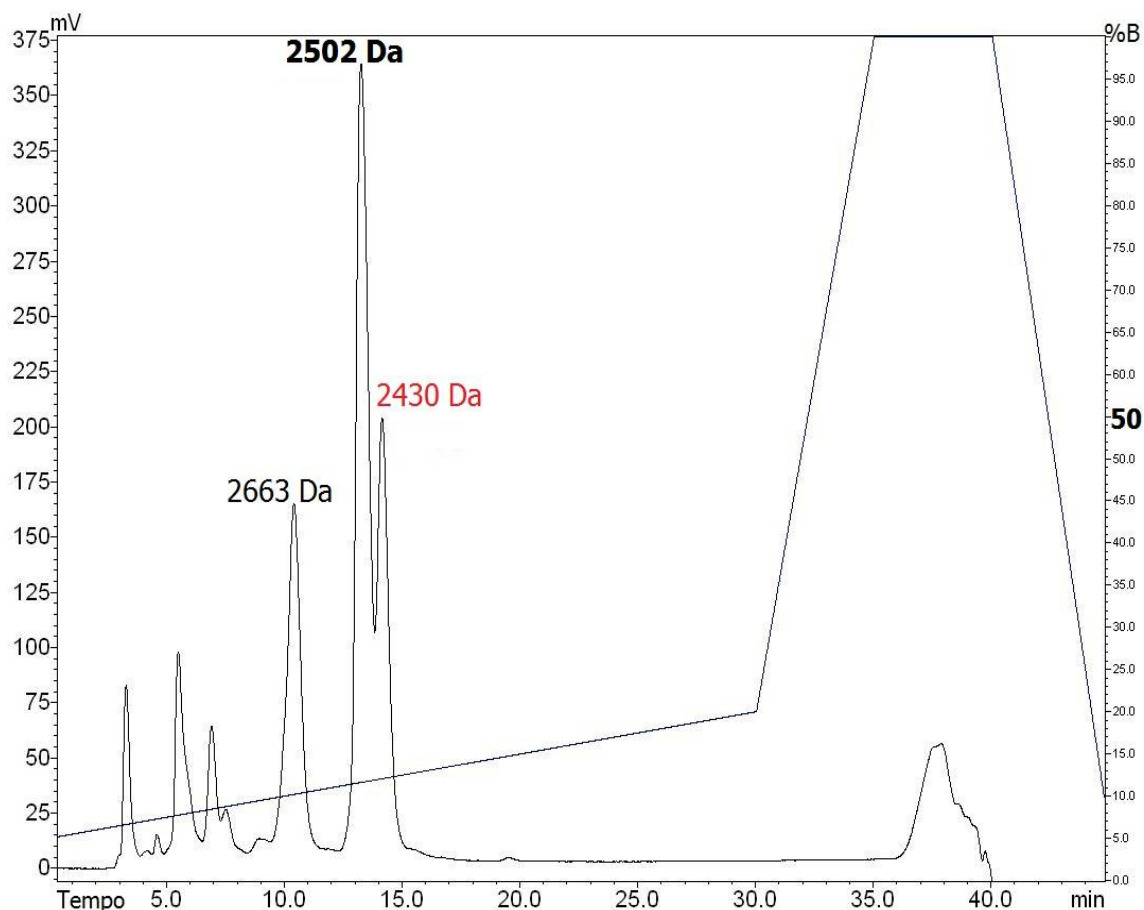


Figura 15. Cromatografia da fração 17. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C_{18} analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 5 a 20% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.2 fração 18

Esta fração requereu de um passo cromatográfico para purificar a toxina própria deste tempo de eluição (Fig. 16). Nesta, o componente principal (2430 Da) e outros componentes de menor intensidade com diferentes características hidrofóbicas foram separados. A massa determinada por MALDI-TOF/TOF deste passo cromatográfico permitiu identificar as massas dos componentes. A Tx2430 também eluiu nas frações 17, 19 e 20 (Figs. 15, 19 e 20). A Tx2430 foi selecionada para sequenciamento por degradação de Edman (Fig. 17).

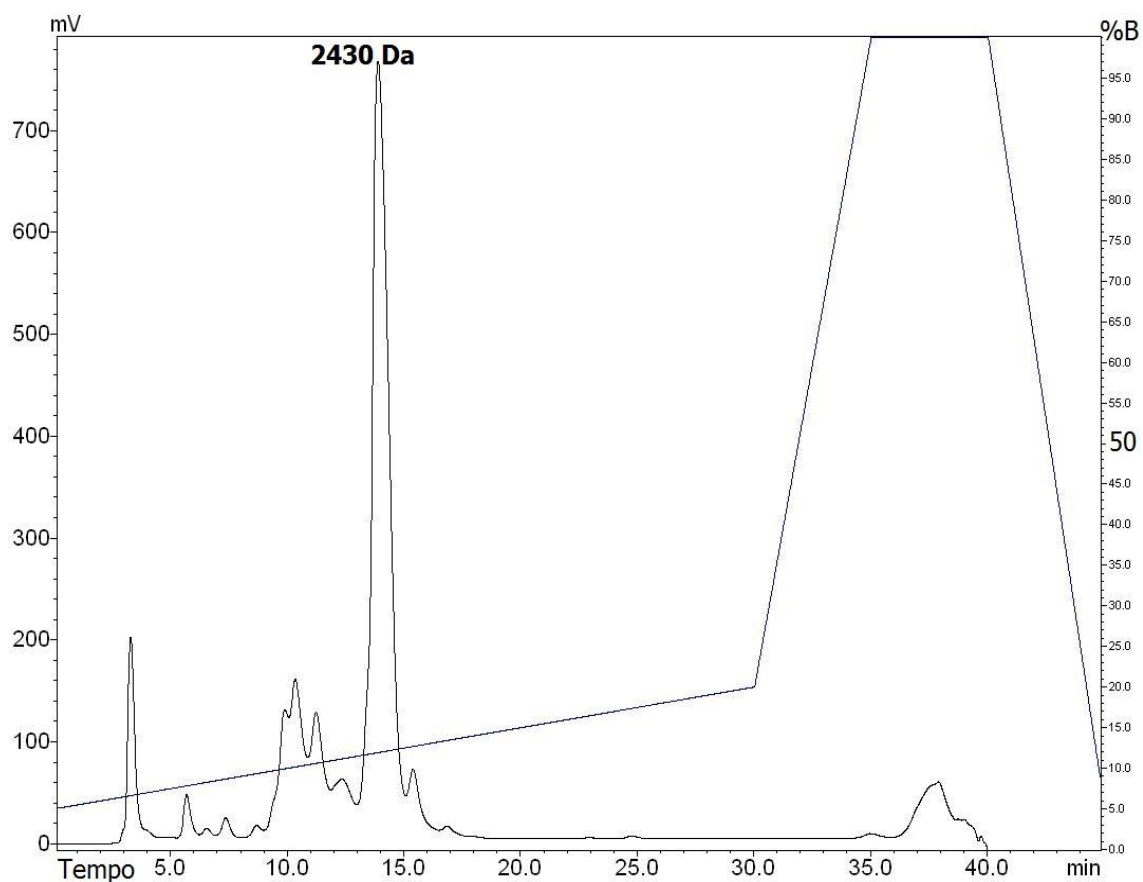


Figura 16. Cromatografia da fração 18. Entre seus componentes, eluiu (12%B) o de maior intensidade, a Tx2430. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 5 a 20% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

A sequência da Tx2430 é apresentada na Figura 17. Esta possível KTx possui 2.430,03 Da determinado por MALDI-TOF/TOF. A massa molecular $[M+H]^+$ acurada obtida por ESI foi de 2.430,1067 Da e a massa molecular teórica 2.430,1014 Da com um erro de 2,18 ppm (Fig. 17). Esta toxina está amidada no seu N-terminal. A amidação foi confirmada por diferença (~ 1 Da) da massa molecular teórica com a experimental, e, a comparação desta toxina com sua toxina homóloga, a Tpa1 ou α -KTx_{s13.3} (Barona *et al.*, 2006) que também possui amidação na tirosina N-terminal (Fig. 18A). Após modificar (HNO) a sequência da Tx2430, sua massa molecular teórica (Fig. 17B e C) foi semelhante à massa molecular experimental, igualmente, a ionização teórica e experimental da molécula é similar.

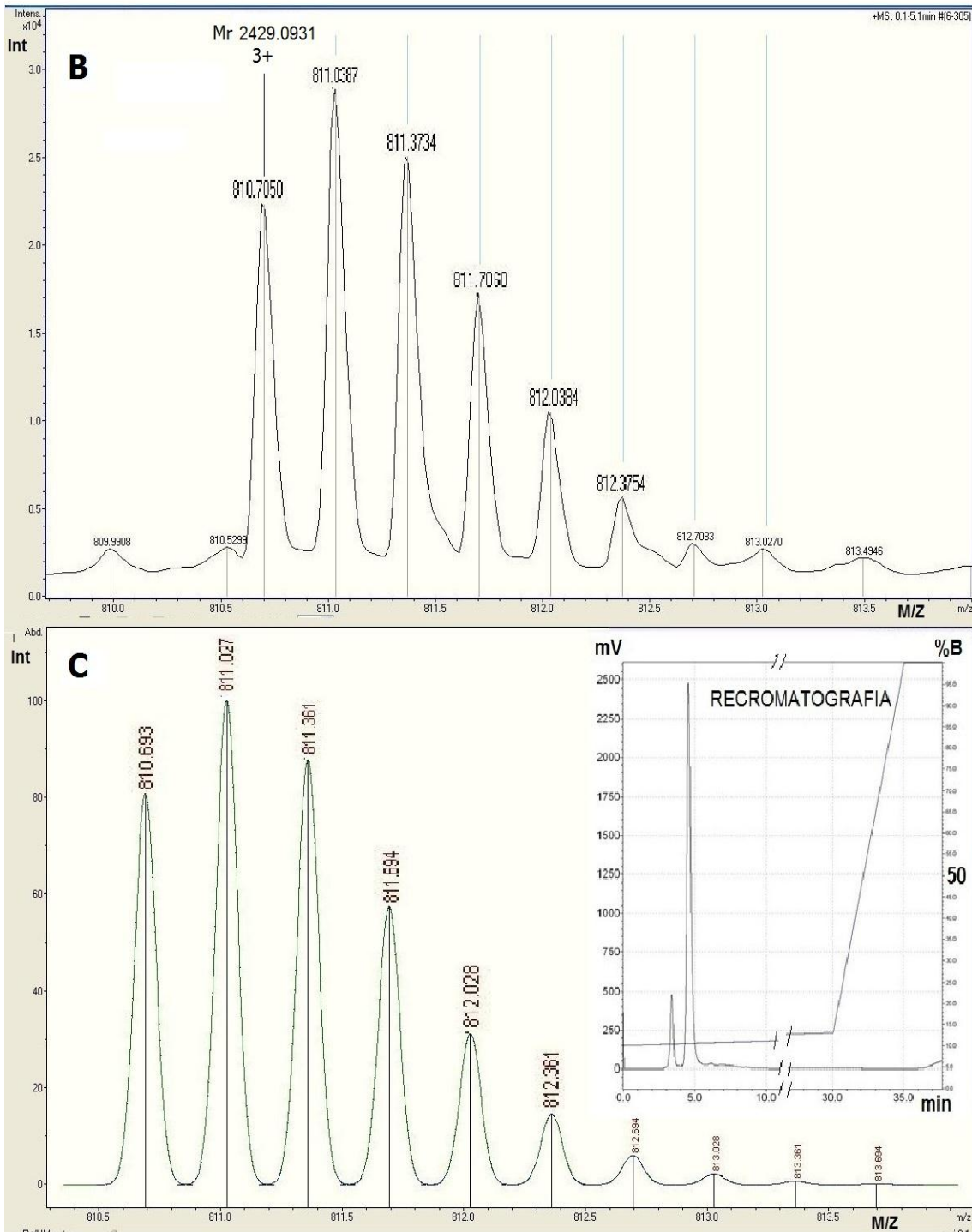
A**Tx2430Edman****ACGSCRKKCKGAGKCINGRCKCY 23**

Figura 17. Sequência, espectro de massa molecular e recromatografia da Tx2430. **A**, sequência feita por Edman apresentando o número de resíduos de aminoácidos da toxina. **B**, espectro da massa experimental. **C**, espectro da massa molecular teórica. No espectro gerado por ESI se apresenta tripla carga da molécula, especificando a massa molecular monoisotópica neutra [M]. A recromatografia apresenta a eluição desta KTx em um gradiente de 10,5%B.

Esta molécula sequenciada foi comparada com toxinas descritas para outras espécies de escorpião por meio do programa *protein Blast*. A Tx2430 apresentou similaridade com toxinas da subfamília α -KTxs13 (Fig. 18A). Com este alinhamento se consegue evidenciar a elevada similaridade que a Tx2430 compartilha com outras toxinas, principalmente isoladas de peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*. Adicionalmente, por homologia no alinhamento, a Tx2430 poderia compartilhar o modelo da díade.

A Tx2430 foi testada na concentração de 500 nM sobre células DRG (n = 3). Apesar da concentração relativamente alta, esta toxina apenas exerceu efeito inibitório discreto (Fig. 18B), não chegando a 20% de inibição da corrente total e não apresentando uma diferença estatística significativa entre a inibição da amplitude do pico da corrente ($10,8 \pm 3,7$ %) ou a corrente ao final do pulso despolarizante ($14,7 \pm 4,0$ %).

Adicionalmente, a Tx2430 foi testada em canais para potássio hK_v1.1 e hK_v1.4 expressos em células de ovário de hamster chinês (Fig. 18C). Esta toxina diminuiu as correntes de K⁺ nos canais hKv1.1 em quase 50% quando foi adicionado 2 μ M à solução externa. O efeito desta toxina foi reversível quando a preparação foi lavada com solução externa.

A $K_d \approx 7 \mu$ M foi baseada na equação de Michaelis-Menten relacionando o pico da corrente do controle com o pico da corrente experimental (Tx2430). Usando só uma concentração (2 μ M) foi calculada a constante de tempo da cinética de bloqueio e de lavado, Seguindo o bloqueio e o lavado no tempo, os resultados se ajustaram com um exponencial obtendo assim, as constantes de associação e dissociação da toxina. Estas constantes do tempo são (tau) "on" e "off" do processo com [T] como a concentração da toxina testada (Restano-Cassulini *et al.*, 2006):

$$K_d = \tau(\text{on})[T] / \tau(\text{off}) - \tau(\text{on})$$

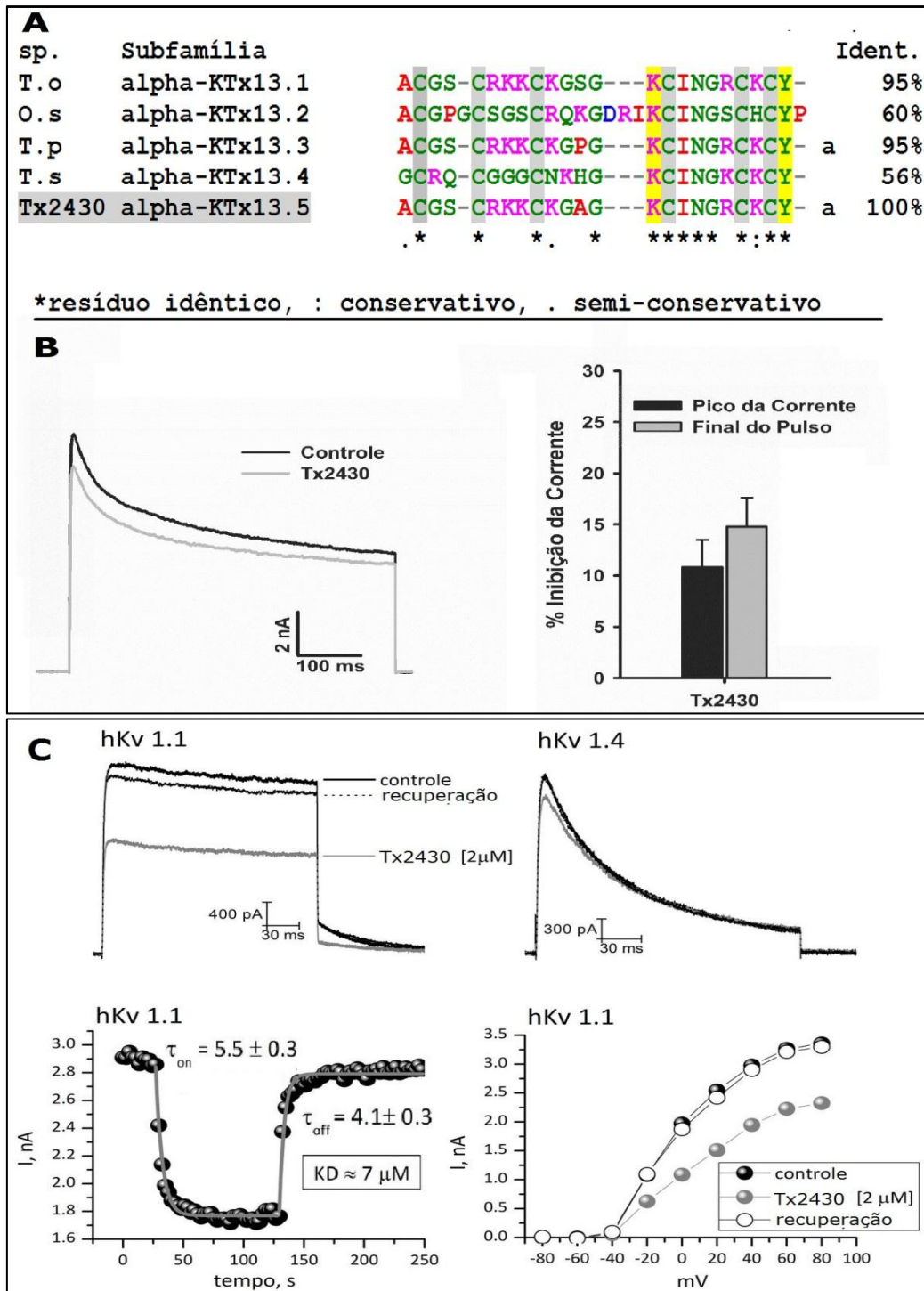


Figura 18. Alinhamento das toxinas da subfamília α -KTxs13 e teste biológico da Tx2430. **A.** Resíduos de cisteínas são apresentados em faixa cinza, e, em amarelo, possíveis resíduos chaves para interação como o canal alvo, (**a**) indica amidração no C-terminal. (**sp**) a espécie de escorpião. A identidade (**Ident.**) é apresentada, **B.** Teste eletrofisiológico da Tx2430 sobre correntes de K^+ em células DRG e **C.** Teste eletrofisiológico da Tx2430 sobre canais $hK_v1.1$ e $hK_v1.4$ expressos em células de ovário de hamster chinês. Para a atividade da Tx2430 sobre canais $hK_v1.1$ são apresentados o K_d e a relação corrente/voltagem.

Por último, a relação corrente/voltagem (I/V) da Tx2430 sobre canais para potássio hK_v1.1 apresenta um bloqueio produzido pela toxina independente da voltagem. A Tx2430 foi menos eficiente quando testada nos canais hK_v 1.4 diminuindo a corrente em 16% aproximadamente. Uma comparação das toxinas homólogas testadas eletrofisiologicamente é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs13. Nesta se apresentam subtipos de canais onde foram testadas as toxinas. A Tx2430 foi testada a uma concentração de 2 μ M sobre canais hK_v1.1 com K_d definido. Resultados destes testes fisiológicos com concentrações fixas de toxina aparecem sublinhados. **(N.c.)** nome comum da toxina e **(R)** atividade reversível.

Espécie	Subfamília	N.c.	Canal testado	K (d) nM	Ref.
<i>Tityus</i> sp.	<u>Tx2430</u>		<u>DRG</u>	<u>500</u> (\approx 7 μ M)	Presente trabalho
<i>T. obscurus</i>	α -KTx13.1	Tc1	(R) <i>Shaker</i> Sf9	65	Batista <i>et al.</i> , 2000
<i>Orthochirus scrobiculosus</i>	α -KTx13.2	OsK2	K _v 1.2	97	Dudina <i>et al.</i> , 2001
<i>T. pachyurus</i>	α -KTx13.3	Tpa1	(R) <i>Shaker</i> Sf9	200	Barona <i>et al.</i> , 2006
<i>T. stigmurus</i>	α -KTx13.4	Tst-17	<i>Shaker</i> Sf9	<u>3 μM</u>	Batista <i>et al.</i> , 2007

5.3.3 fração 19

Vários componentes eluíram nesta fração (Fig. 19). Entre eles, o de massa 1289 Da não tinha quantidade suficiente, além disto, sua massa molecular não corresponde a KTxs. Para esta fração, o processo parou neste passo cromatográfico. Embora, foi aproveitada a fração onde eluiu a molécula de 2430 Da.

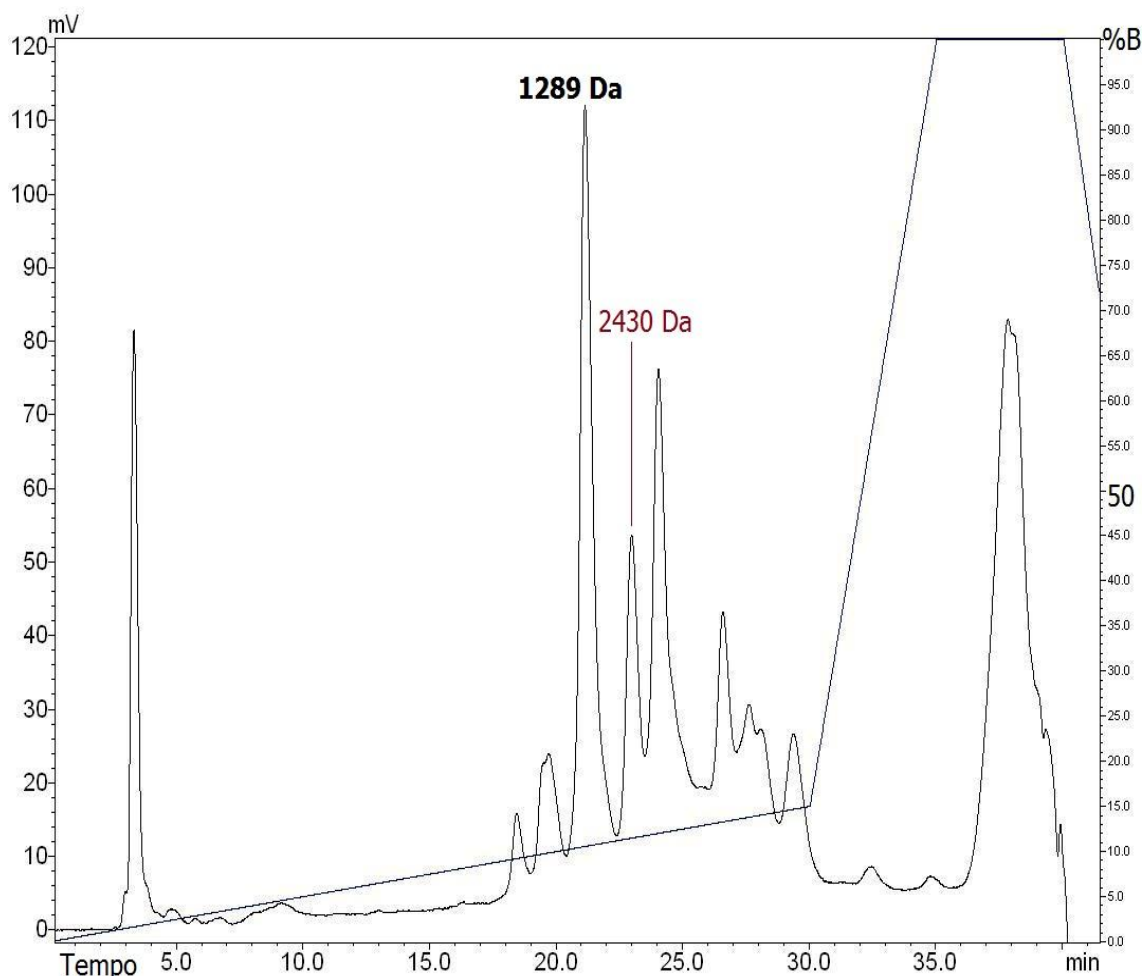


Figura 19. Cromatografia da fração 19. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, o vermelho, componente de interesse nesta pesquisa. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C_{18} analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 0 a 15% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.4 fração 20

Nesta fração Três componentes se destacam com diferentes características hidrofóbicas (Fig. 20). Após análise da intensidade de material no cromatograma, foi determinado que a fração de maior intensidade (2488 Da) não teve quantidade suficiente para continuar purificação e caracterização bioquímica. Embora, uma análise da massa molecular feita por MALDI-TOF/TOF destes componentes permitiu identificar uma toxina (2430 da) de interesse que eluiu em outra fração.

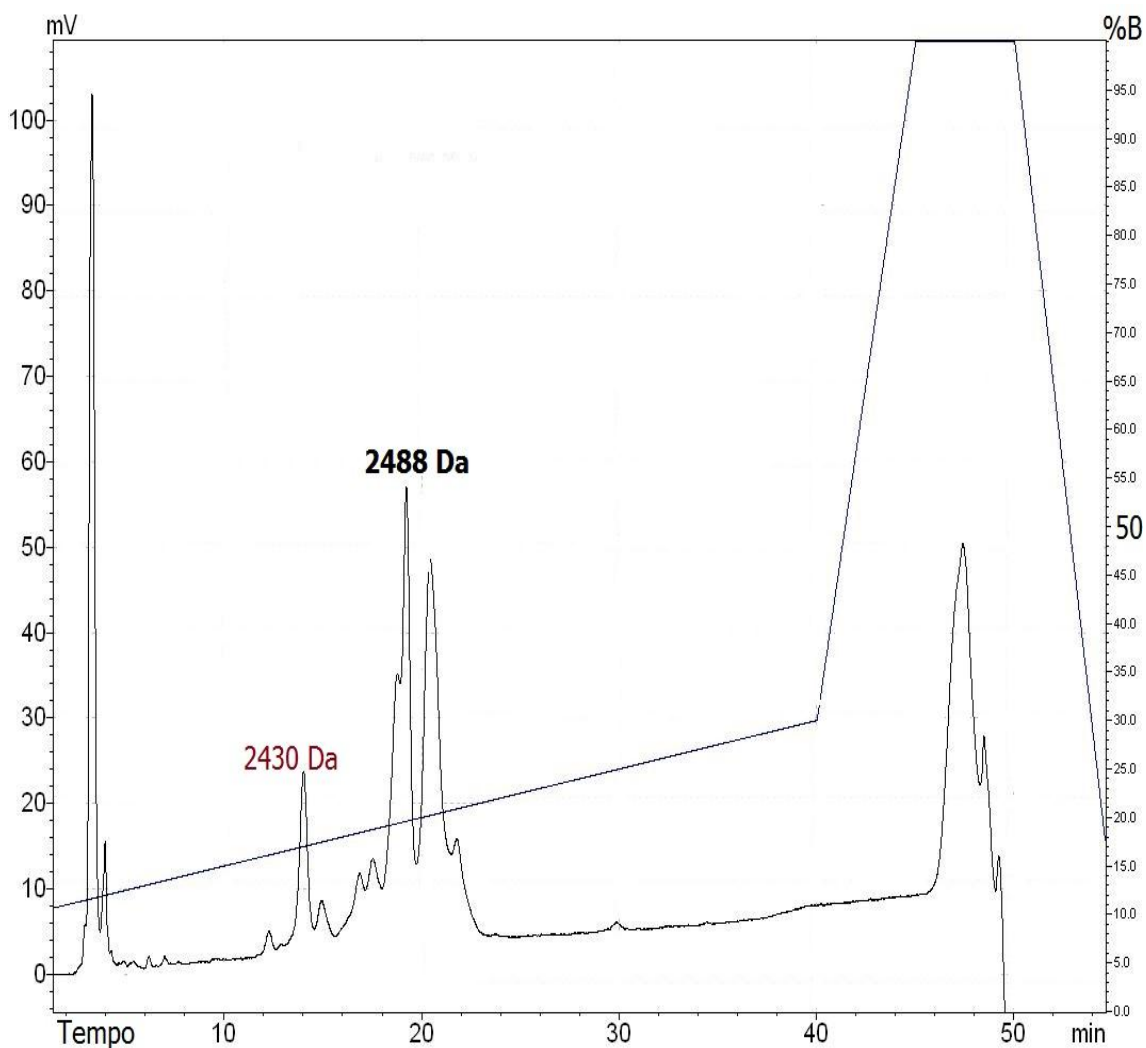


Figura 20. Cromatografia da fração 20. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μm) utilizando um gradiente linear de 10 a 30% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.5 fração 23

Nesta fração, seis componentes com diferentes características hidrofóbicas foram separados (Fig. 21). Da peçonha do escorpião *Tityus* sp. se requereu de dois passos cromatográficos para purificar a toxina própria desta fração. A Tx3640 foi preparada para sequenciamento por MS-MS e degradação de Edman (Fig. 22A). Outros componentes que eluíram nesta fração não foram selecionados pela quantidade da amostra limitante.

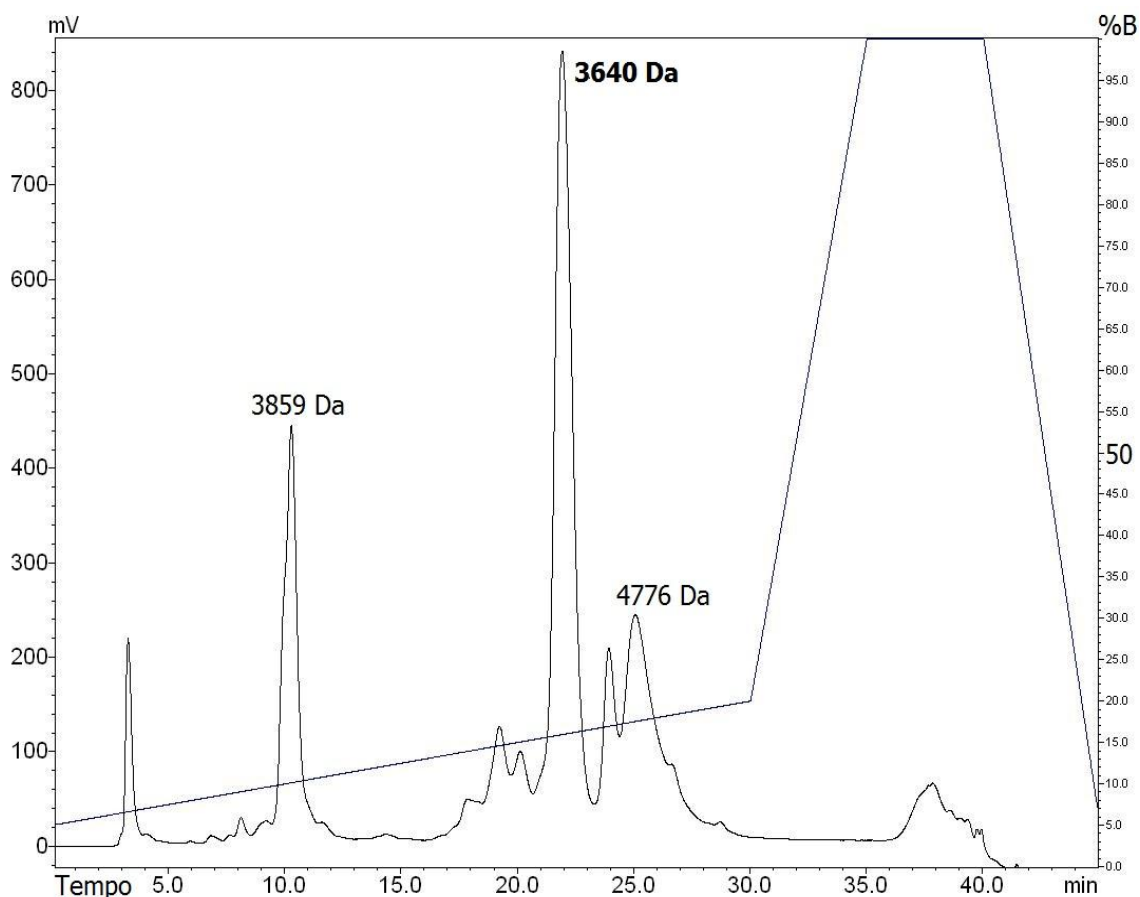


Figura 21. Cromatografia da fração 23. Entre seus componentes, em negrito, a Tx3640 de maior intensidade eluiu em 15,9%B. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 µm) utilizando um gradiente linear de 5 a 20% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

A Tx3640 foi sequenciada. Esta toxina possui 3.640,33 Da determinado por MALDI-TOF/TOF. A massa molecular [M+H]⁺ acurada obtida por ESI foi de 3.640,5372 Da e a massa molecular teórica 3.640,5390 Da com um erro de 0,49 ppm (Fig. 22). A Tx3640 foi sequenciada por degradação de Edman faltando somente três resíduos de aminoácidos (Fig. 22A). Para finalizar o sequenciamento da estrutura primária desta KTx foi utilizado sequenciamento MS-MS. Desta forma, foram determinados os resíduos de aminoácidos internos da sequência. Para resolver o resíduo no C-terminal da molécula, adicionalmente, foi utilizada a massa molecular acurada feita com ESI e comparado com a massa molecular teórica da toxina.

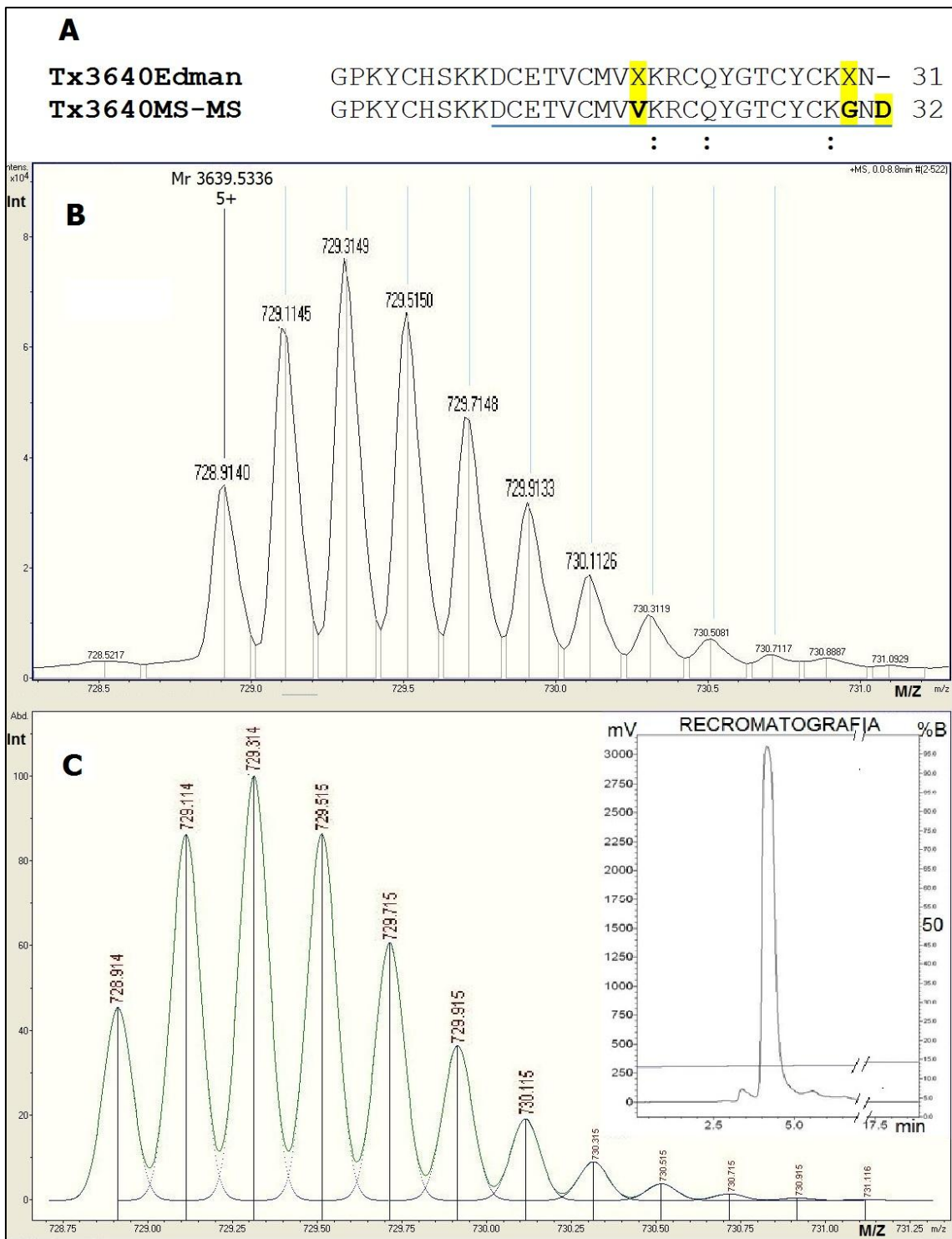


Figura 22. Espectro de massa molecular e recromatografia da Tx3640. **A**, sequência feita por Edman e MS-MS sublinhado apresentando o número de resíduos de aminoácidos da toxina. A finalização da sequência da Tx3640 se apresenta em amarelo. Os dois pontos indicam incapacidade do espectrômetro de massa para diferenciar entre K/Q. **B**, espectro da massa molecular experimental. **C**, espectro da massa molecular teórica. No espectro gerado por ESI se apresenta quintupla carga da molécula, especificando a massa molecular monoisotópica neutra [M]. A recromatografia apresenta a eluição desta KTx em um gradiente de 13,3%B.

Esta molécula sequenciada foi comparada com toxinas descritas para outras espécies de escorpião por meio do programa *protein Blast*. A Tx3640 apresentou similaridade com toxinas da subfamília α -KTxs17 (Fig. 23A). Com este alinhamento se consegue evidenciar a similaridade que a Tx3640 compartilha com duas toxinas, uma delas (α -KTxs17.1) purificada da peçonha do escorpião *Buthus martensi* (Li *et al.*, 2003).

A Tx3640 foi testada na concentração de 500 nM sobre células DRG (n = 3). Apesar da concentração relativamente alta, esta toxina apenas exerceu efeito inibitório discreto (Fig. 23B), não chegando a 20% de inibição da corrente total e não apresentando uma diferença estatística significativa entre a inibição da amplitude do pico da corrente ($13,5 \pm 4,7$ %) ou a corrente ao final do pulso despolarizante ($13,7 \pm 7,5$ %). Adicionalmente, uma comparação das toxinas homólogas testadas eletrofisiologicamente é apresentada na Tabela 4.

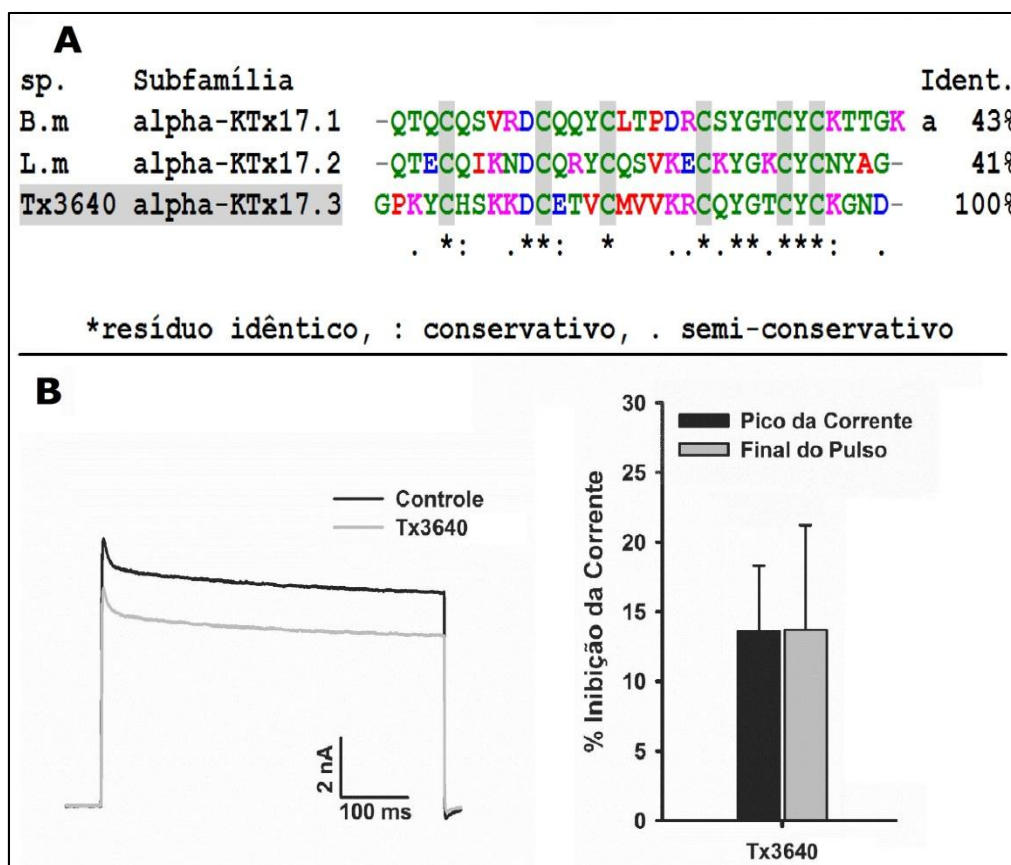


Figura 23. Alinhamento das toxinas da subfamília α -KTxs17 e teste biológico da Tx3640. **A**. Resíduos de cisteínas são apresentados em cinza. (a) indica amidação no C-terminal. (**sp**) a espécie de escorpião. A identidade (**Ident.**) é apresentada, **B**. Teste eletrofisiológico da Tx3640 sobre correntes de K^+ em células DRG.

Tabela 4. Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs17. Nesta se apresentam linhagens celulares onde foram testadas as toxinas. Resultados destes testes fisiológicos com concentrações fixas de toxina aparecem sublinhados. (**N.c.**) nome comum da toxina.

Espécie	Subfamília	N.c.	Canal testado	Concentração	Ref.
<i>Tityus</i> sp.	Tx3640		DRG	<u>500 nM</u>	Presente trabalho
<i>B. martensi</i>	α -KTx17.1	BmKK4	N. do hipocampo (I_A I_d)	<u>10-100 μM</u>	Li <i>et al.</i> , 2003

5.3.6 fração 25

Nesta fração se destacam cinco componentes com diferentes características hidrofóbicas (Fig. 24). Um componente de massa molecular 4.150,435 Da foi purificado, mas no sequenciamento por MS-MS, esta molécula não ionizou. Portanto, o experimento não foi continuado. Desta molécula se sugere purificar material adicional e continuar a sua caracterização. Nesta fração eluiu também a Tx3640.

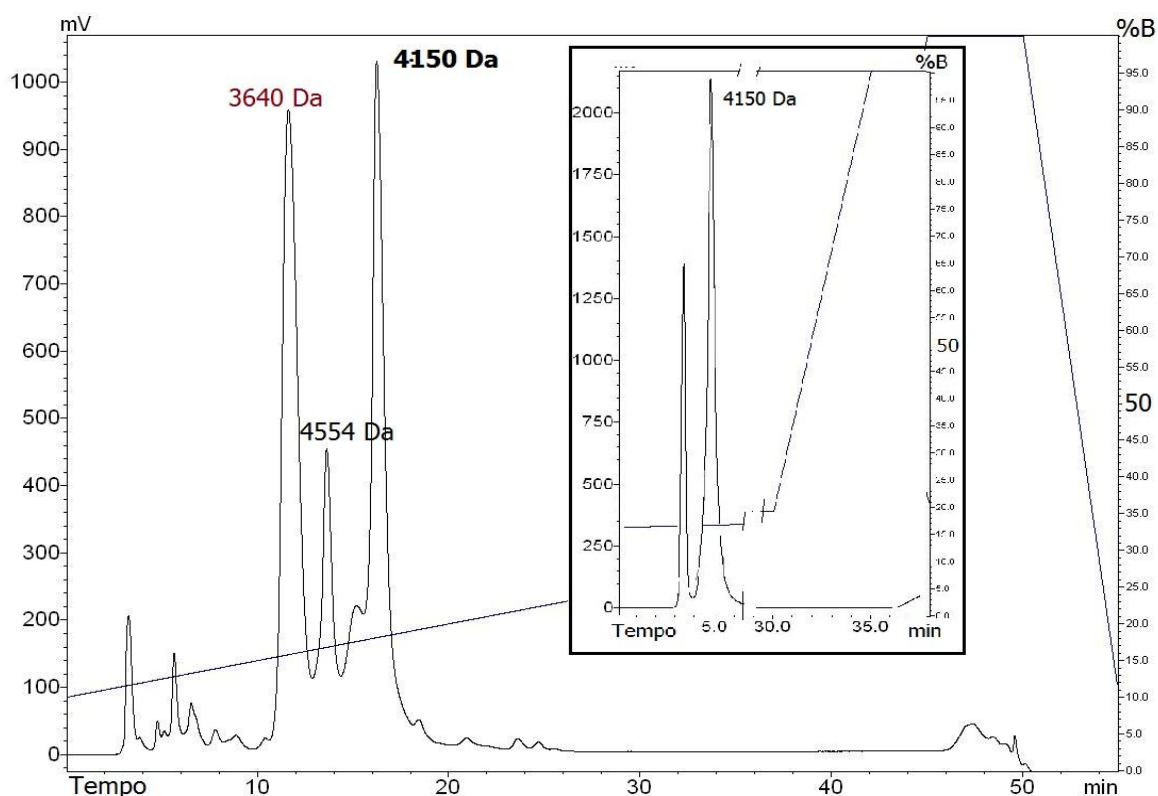


Figura 24. Cromatografia da fração 25. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C_{18} analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 10 a 30% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.7 fração 28

Nesta fração sete componentes com diferentes características hidrofóbicas foram separados (Fig. 25). Entre elas, a Tx4171 foi purificada com quatro passos cromatográficos. Após análise de massa destes componentes foi selecionado o material de interesse para sequenciamento por MS-MS (Fig. 26A). Outras moléculas eluíram nesta fração como a Tx3590 e um componente de 4.150 Da.

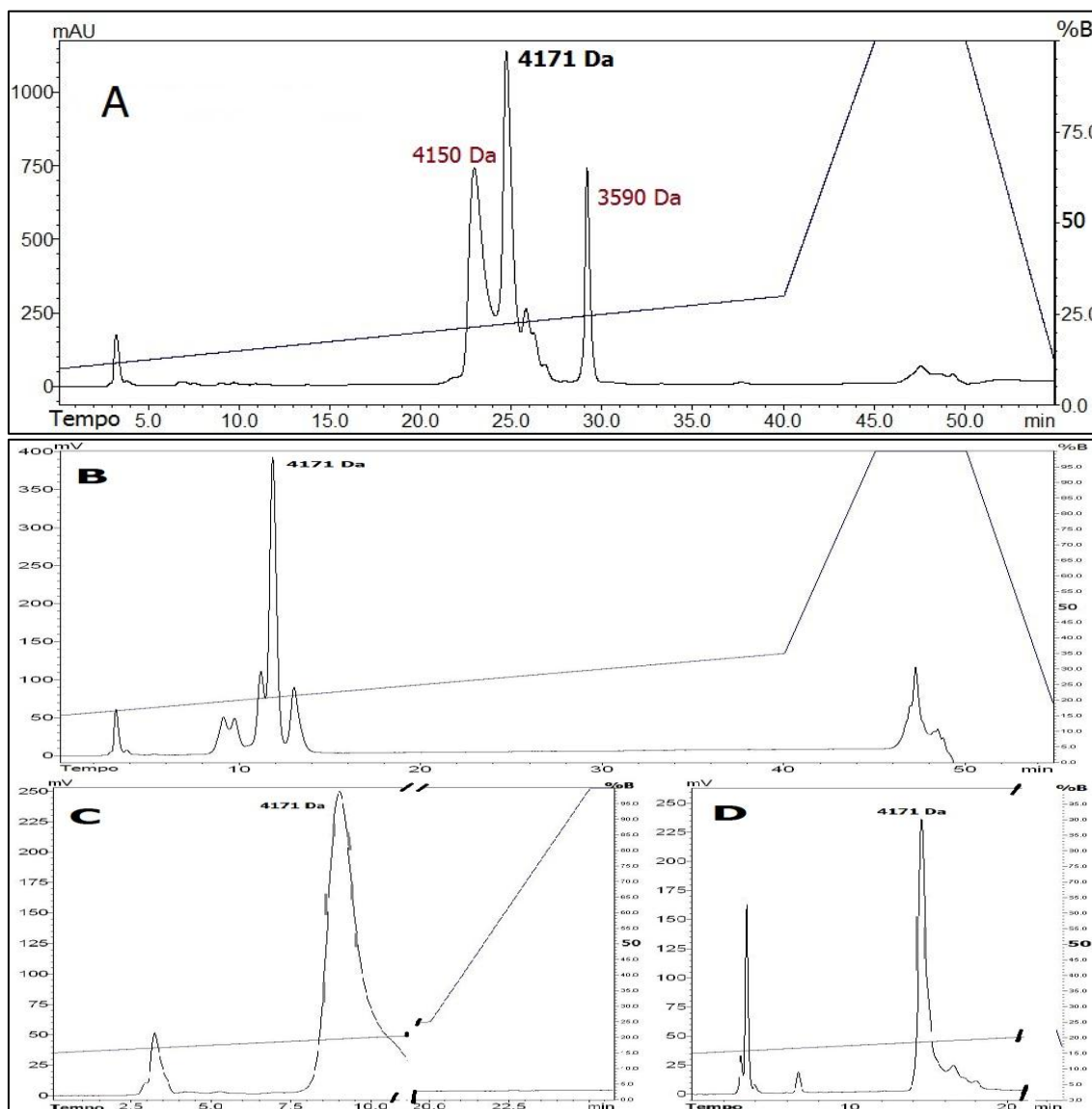


Figura 25. Cromatografia da fração 28. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. **A**, **B**, **C** e **D** foram os passos cromatográficos para purificar a Tx4171 que inicialmente eluiu em 20,3%B. A corrida inicial foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 µm) utilizando um gradiente linear de 10 a 30% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

A Tx4171 não foi sequenciada por Edman porque esta toxina apresentou massa molecular idêntica (Fig. 26) à massa molecular teórica do transcrito Tpy3, uma discrepina-*like*. Adicionalmente, sua sequência parcial por MS-MS foi idêntica a parte da sequência do transcrito (Fig. 26A). Assim, o transcrito e a toxina sendo a mesma molécula, como discrepina-*like*, poderia incapacitar o sequenciador para iniciar sua reação. Esse fenômeno aconteceu quando se tentou sequenciar a discrepina (D'Suze *et al.*, 2004).

Esta toxina possui 4.171,25 Da determinado por MALDI-TOF/TOF. A massa molecular $[M+H]^+$ acurada obtida por ESI foi de 4.171,960 Da (Fig. 26B). Devido a que sua sequência parcial foi obtida por MS-MS, a massa molecular monoisotópica teórica da toxina completa (4.171,9530 Da) pertence à sequência do transcrito Tpy3 caracterizado pela biblioteca de cDNA da glândula de peçonha. O erro para a Tx4171 comparado com Tpy3 foi de 1,6 ppm. Como se esperava, esta toxina apresentou uma diferença (~ 17 Da) entre massa molecular teórica e experimental. Esta diferença é dada pelo ácido piroglutâmico presente no N-terminal, típico deste grupo de toxinas. Adicionalmente, a Tpy3 facilitou superar a ambiguidade K/Q e I/L que a sequência experimental tinha. Uma comparação dos espectros gerados por ESI tanto da massa molecular experimental, quanto da sequência teórica da Tpy3 confirmam essa identidade devido à ionização análoga da molécula (Fig. 26B e C).

Esta molécula sequenciada foi comparada com toxinas descritas para outras espécies de escorpião por meio do programa *protein Blast*. A Tx4171 apresentou similaridade com toxinas da subfamília α -KTxs15. Este alinhamento foi feito anteriormente com o transcrito Tpy3 (Fig. 13).

A Tx4171 foi testada na concentração de 500 nM sobre células DRG ($n = 3$). Apesar da concentração relativamente alta, esta toxina apenas exerceu efeito inibitório discreto (Fig. 27), não chegando a 20% de inibição da corrente total e não apresentando uma diferença estatística significativa entre a inibição da amplitude do pico da corrente ($14,5 \pm 3,4 \%$) ou a corrente ao final do pulso despolarizante ($17,8 \pm 4,1 \%$). Adicionalmente, uma comparação das toxinas homólogas testadas eletrofisiologicamente é apresentada na Tabela 5.

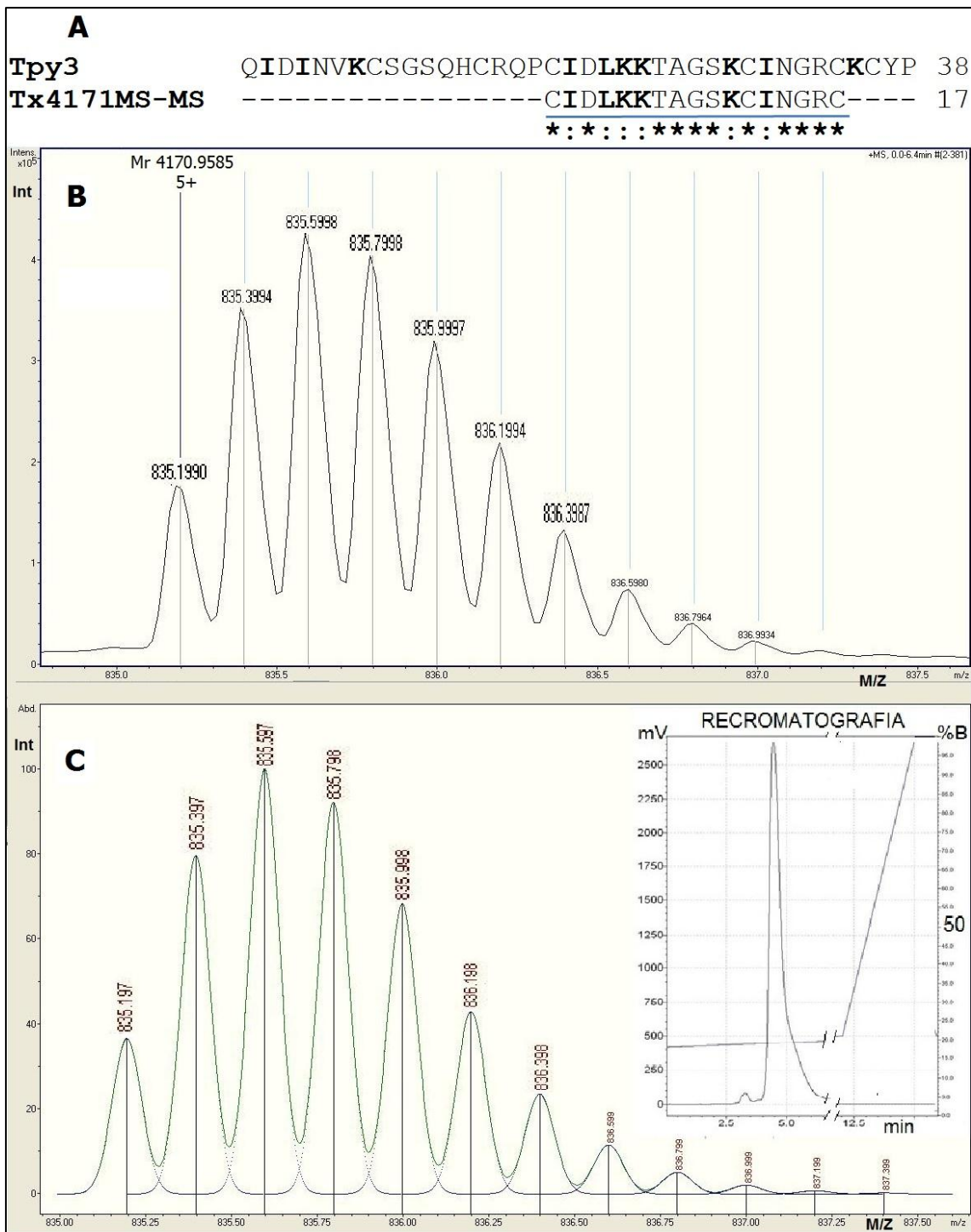


Figura 26. Espectro de massa e recromatografia da Tx4171. **A**, sequência feita por MS-MS sublinhado apresentando o número de resíduos de aminoácidos da toxina. O alinhamento da sequência parcial da Tx4171 com o transcrito Tpy3 demonstra similaridade. Os dois pontos indicam incapacidade do espectrômetro de massa para diferenciar entre K/Q ou I/L e asteriscos indicam resíduos de aminoácidos idênticos. **B**, espectro da massa molecular experimental. **C**, espectro da massa molecular teórica. No espectro gerado por ESI se apresenta quintupla carga da molécula, especificando a massa monoisotópica neutra [M]. A recromatografia apresenta a eluição desta KTx em um gradiente de 19,0%B.

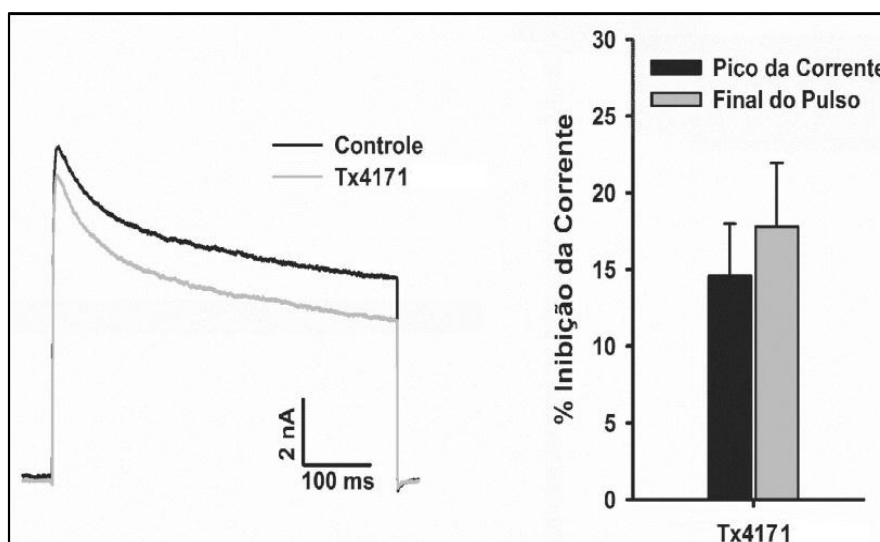


Figura 27. Teste biológico da Tx4171. Resultado eletrofisiológico da Tx4171 sobre correntes de K^+ em células DRG.

Tabela 5. Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs15. Nesta se apresentam as linhagens celulares onde foram testadas as toxinas. Resultados destes testes fisiológicos com concentrações fixas de toxina aparecem sublinhados. (**N.c.**) nome comum da toxina.

Espécie	Subfamília	N.c.	Canal testado	K (d) nM	Ref.
<i>Tityus</i> sp.	<u>Tx4171</u>		<u>DRG</u>	<u>500</u>	Presente trabalho
<i>A. australis</i>	α -KTx15.1	Aa1	Células do c. granular (I_A)	150	Pisciota <i>et al.</i> , 2000
<i>B. martensi</i>	α -KTx15.2	BmTx3	Neurônios estriados (I_A)	54	Vacher <i>et al.</i> , 2001
<i>A. mauretanicus</i>	α -KTx15.3	AmmTx3	Neurônios estriados (I_A)	131	Vacher <i>et al.</i> , 2002
<i>A. australis</i>	α -KTx15.4	AaTX1	Células do c. granular (I_A)	150	Pisciota <i>et al.</i> , 2000
<i>T. discrepans</i>	α -KTx15.6	discrepina	Células do c. granular (I_A)	190	D'Suze <i>et al.</i> , 2008

5.3.8 fração 29

Nesta fração oito componentes com diferentes características hidrofóbicas foram separados (Fig. 28). Um componente de massa molecular 3.891,061 Da foi característico desta fração. Após análise da intensidade de material no cromatograma, foi determinado que a fração de maior intensidade não teve quantidade suficiente para continuar purificação e caracterização bioquímica. Embora, uma análise da massa molecular feita por MALDI-

TOF/TOF destes componentes permitiu identificar a Tx4171 eluindo com menor intensidade.

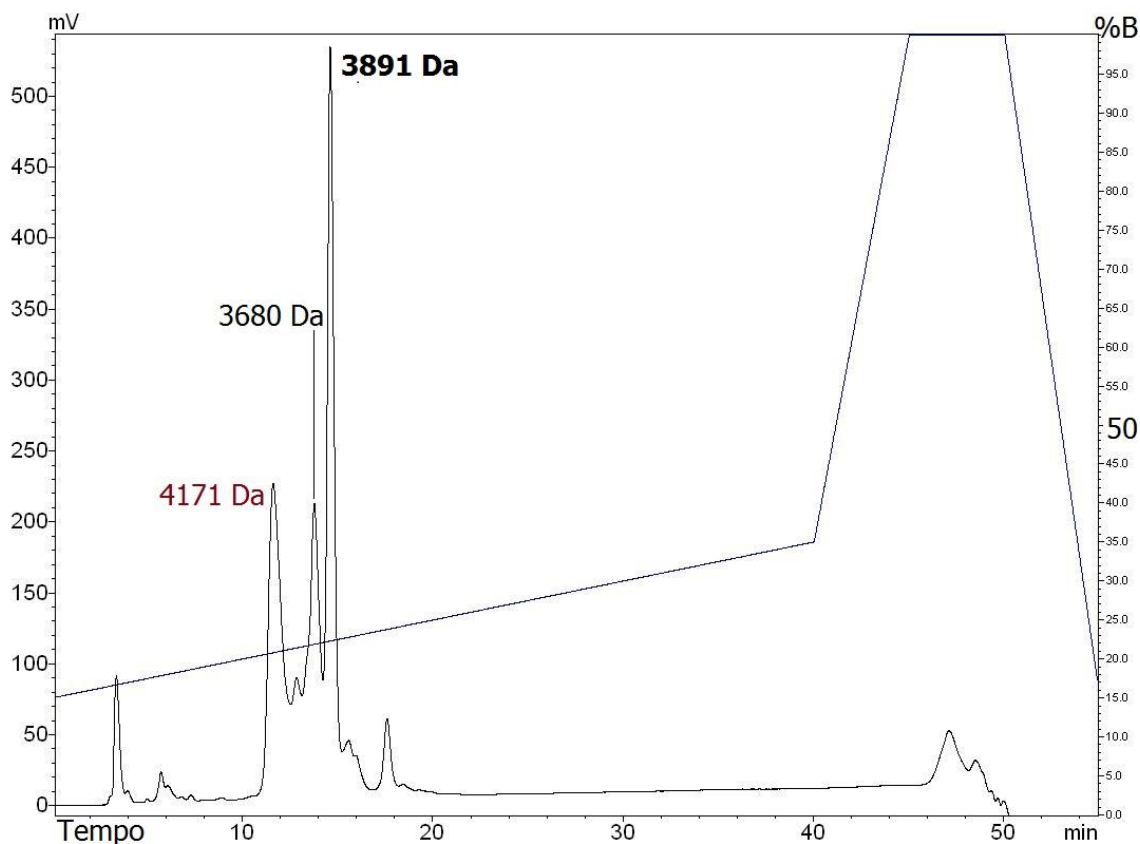


Figura 28. Cromatografia da fração 29. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. A corrida foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 15 a 35% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.9 fração 30

Nesta fração se destacam sete componentes com diferentes características hidrofóbicas (Fig. 29). A análise da massa molecular feita por MALDI-TOF/TOF destes componentes permitiu identificar uma molécula de massa molecular 4.130,03 Da característica desta fração, e, a Tx4171 que eluiu em outra fração. Outros componentes não foram relevantes para esta pesquisa pela quantidade pouco representativa.

A molécula de massa molecular 4.130,031 Da foi sequenciada por MS-MS (Fig. 29D). Sua sequência foi mínima devido a sua ineficiência de ionização dado provavelmente às características físico-químicas próprias da molécula.

Após comparação desta sequência parcial com outras toxinas disponibilizadas em bancos de dados, esta molécula apresentou similaridade com parte de uma enzima do escorpião *Opisthophthalmus carinatus*. Fato que impediu continuar a pesquisa desta molécula.

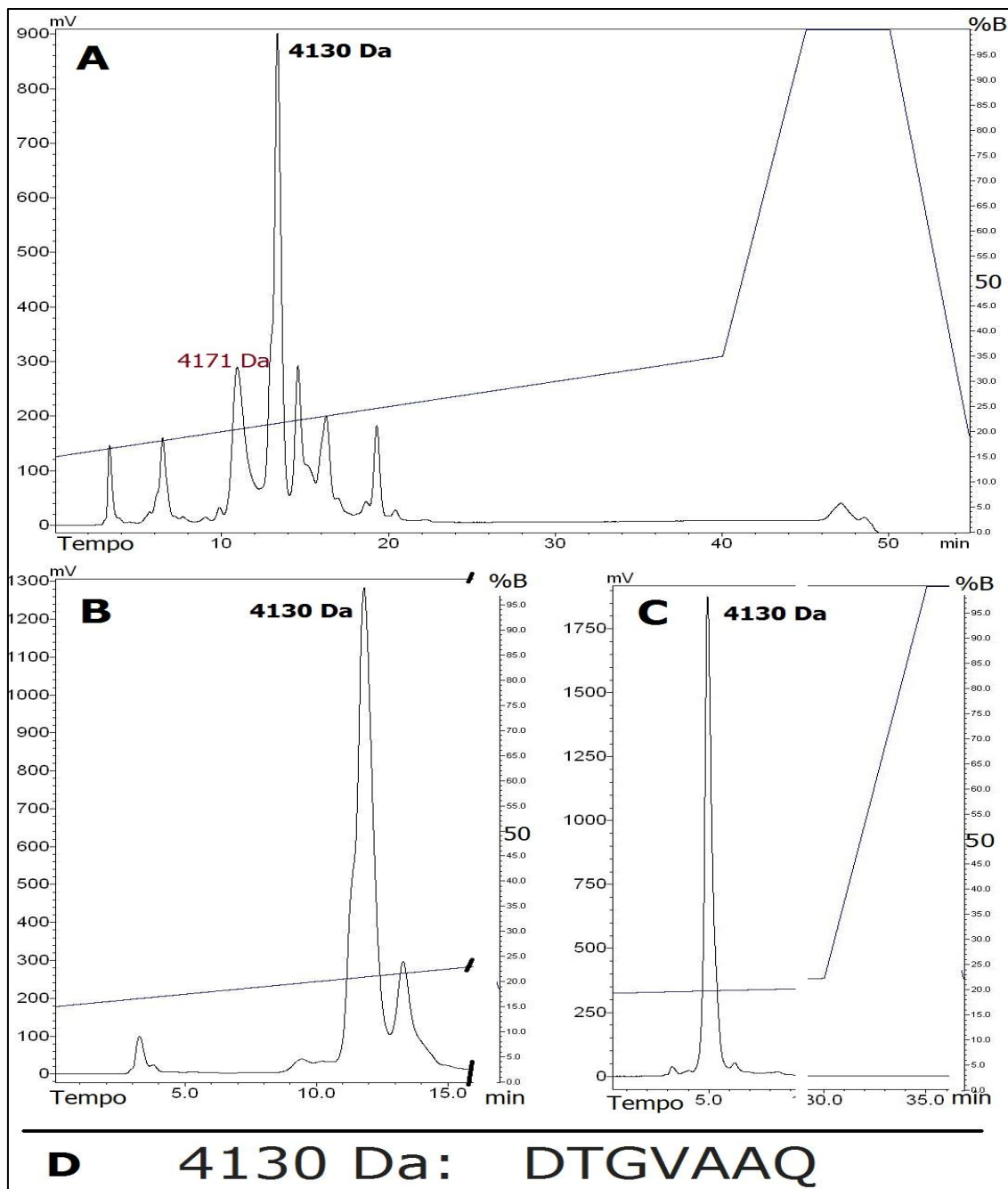


Figura 29. Cromatografia da fração 30. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. **A**, **B** e **C** foram os passos cromatográficos para purificação da molécula de massa molecular 4.130 Da. A corrida inicial foi feita com uma coluna de fase reversa C_{18} analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 15 a 35% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.10 fração 31

Foram separados seis componentes com diferentes características hidrofóbicas (Fig. 30). Após análise de massa destes componentes foi purificada a Tx3590 sendo necessários três passos cromatográficos. Esta toxina foi selecionada para sequenciamento por MS-MS e degradação de Edman (Fig. 31A). Outros componentes desta fração por sua pequena quantidade não foram selecionados.

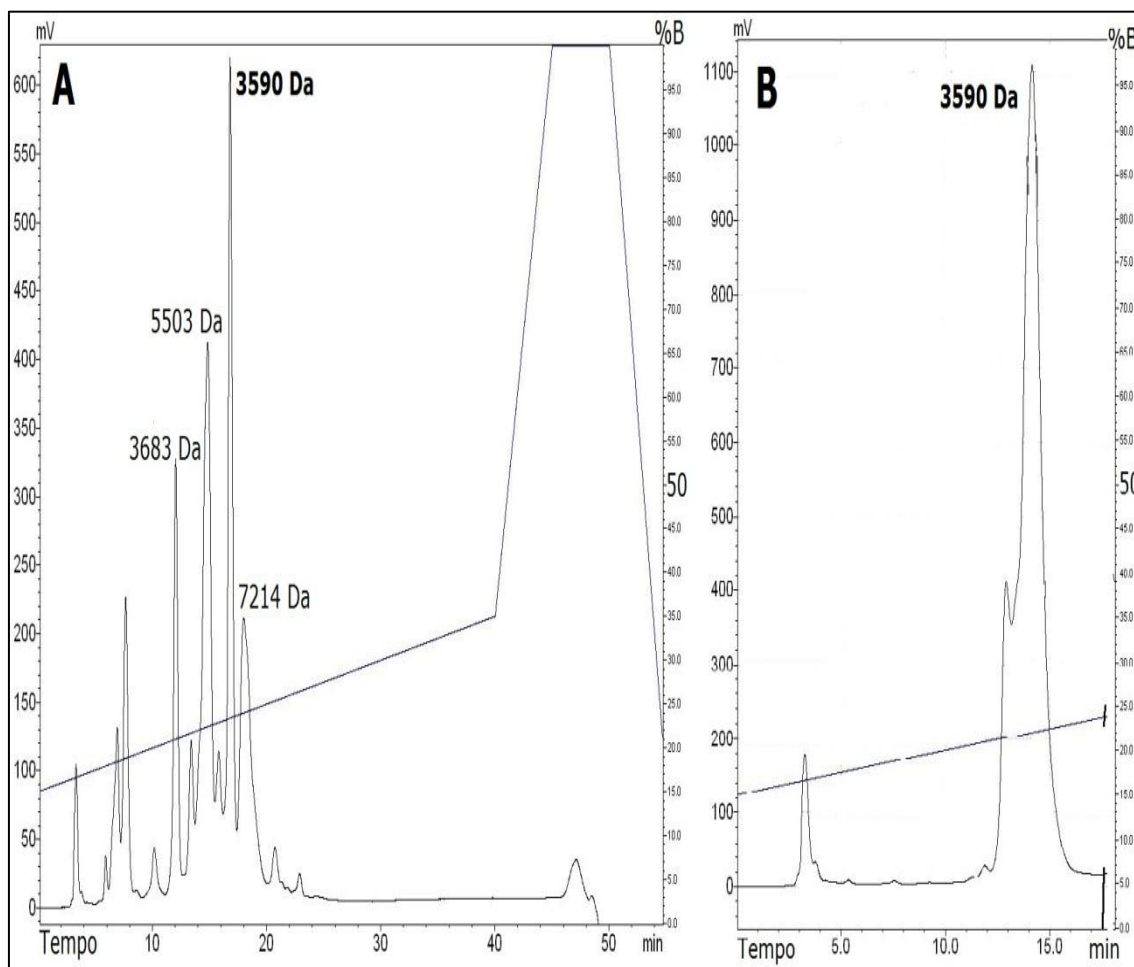


Figura 30. Cromatografia da fração 31. Entre seus componentes, em negrita, o componente de maior intensidade, a Tx3590 que eluiu em 23%B. **A**, **B** foram os passos cromatográficos para purificação da toxina. A corrida inicial foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 15 a 35% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

A Tx3590 foi sequenciada. Esta toxina possui 3.590,14 Da determinado por MALDI-TOF/TOF. A massa molecular $[M+H]^+$ acurada obtida por ESI foi de 3.590,4613 Da e a massa molecular teórica 3.590,4639 Da com um erro de 0,72 ppm (Fig. 31).

A

Tpy5 MHFSGIVFILSMTLIDFFEMKVEATGPQTVCEASICEAACKQMGKSMESCQGDACKCA 61
 Tx3590Edman -----TGPQTVCEASICEAACKQMGKSMESCQGDACKC-- 33
 *****:

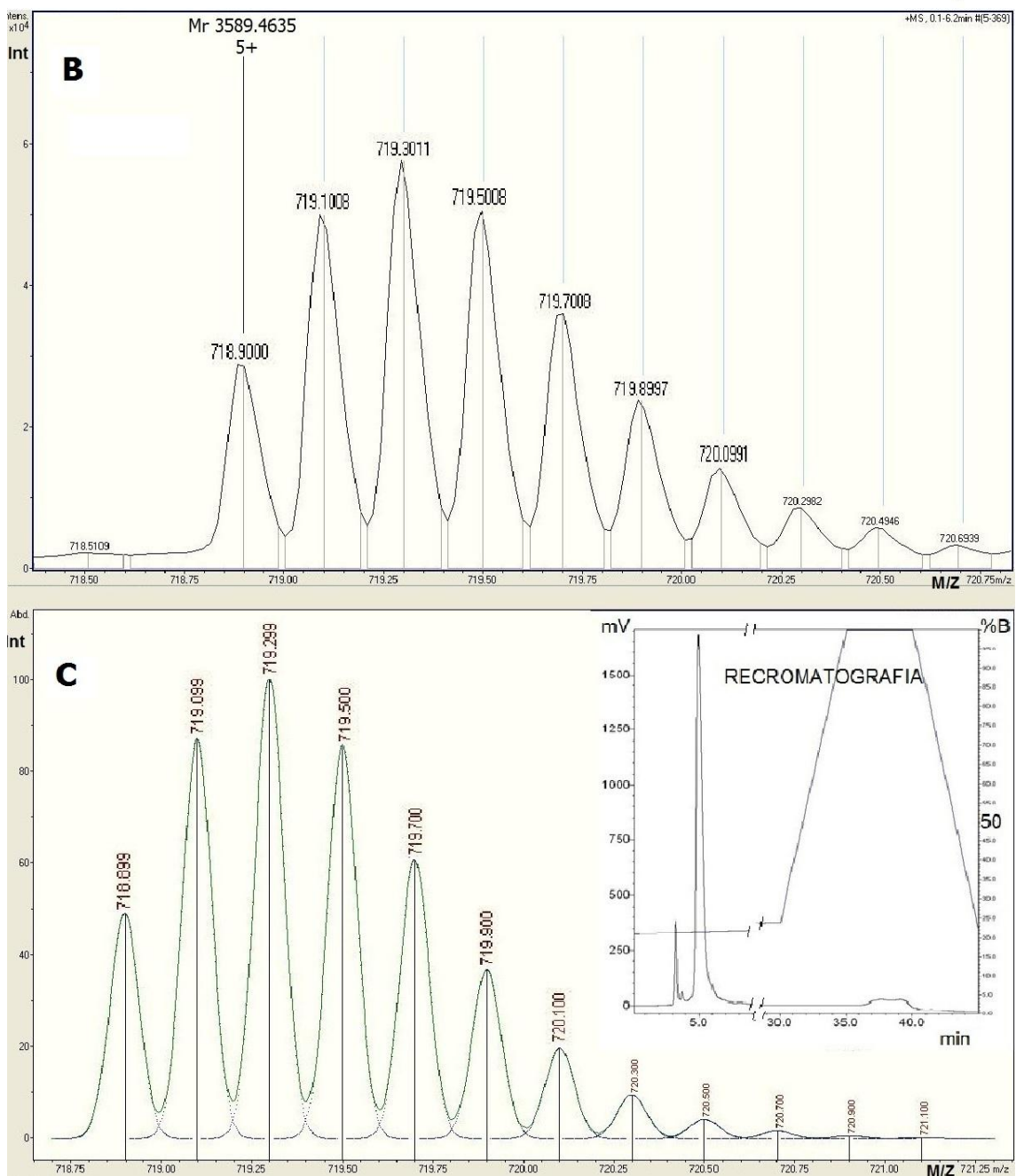


Figura 31. Sequência, espectro de massa molecular e recromatografia da Tx3590. **A**, sequência do transcrito Tpy5 e Tx3590 feita por Edman e confirmado por MS-MS. O número de resíduos de aminoácidos da toxina é mostrado. A finalização da sequência da Tx3590 se apresenta em amarelo. Os dois pontos indicam incapacidade do espectrômetro de massa para diferenciar entre K/Q. **B**, espectro da massa molecular experimental. **C**, espectro da massa molecular teórica. No espectro gerado por ESI se apresenta quintupla carga da molécula, especificando a massa monoisotópica neutra [M]. A recromatografia apresenta a eluição desta KTxS em um gradiente de 19,5%B.

A sequência feita por degradação de Edman foi incompleta faltando somente dois resíduos de aminoácidos no C-terminal da Tx3590 (Fig. 31A). Para finalizar o sequenciamento da estrutura primária desta KTx foram utilizados comparando, por alinhamento, a Tx3590 com o transcrito Tpy5 e sua toxina homóloga (Tc32), e, sequenciamento dos resíduos faltantes por espectrometria MS-MS. O transcrito Tpy5 descreve a estrutura primária completa, com o sequenciamento MS-MS foram confirmados os dois resíduos faltantes, mas dado às ambiguidades K/Q, foi usada, para resolver esta estrutura primária, a diferença de massa molecular teórica com a experimental e a análise por comparação da ionização da toxina teórica com a experimental (Fig. 31B e C). Estes dados em seu conjunto confirmam a sequência da Tx3590.

Esta molécula sequenciada foi comparada com toxinas descritas para outras espécies de escorpião por meio do programa *protein Blast*. A Tx3590 apresentou similaridade com toxinas da subfamília α -KTxs18 (Fig. 32A). Com este alinhamento se consegue evidenciar a elevada similaridade que a Tx3590 compartilha com outras toxinas isoladas de escorpiões do gênero *Tityus*.

A Tx3590 foi testada na concentração de 500 nM sobre células DRG (n = 3). Apesar da concentração relativamente alta, esta toxina apenas exerceu efeito inibitório discreto (Fig. 32B), não chegando a 20% de inibição da corrente total e não apresentando uma diferença estatística significativa entre a inibição da amplitude do pico da corrente ($12,4 \pm 2,4$ %) ou a corrente ao final do pulso despolarizante ($17,2 \pm 3,8$ %).

Adicionalmente, esta toxina foi testada sobre canais para potássio hKv 1.1 e hKv1.4 expressos em células de ovário de hamster chinês a uma concentração de 2 μ M, mas não diminuiu as correntes de K⁺ na preparação (dado não apresentado). Uma comparação das toxinas homólogas testadas eletrofisiologicamente é apresentada na Tabela 6.

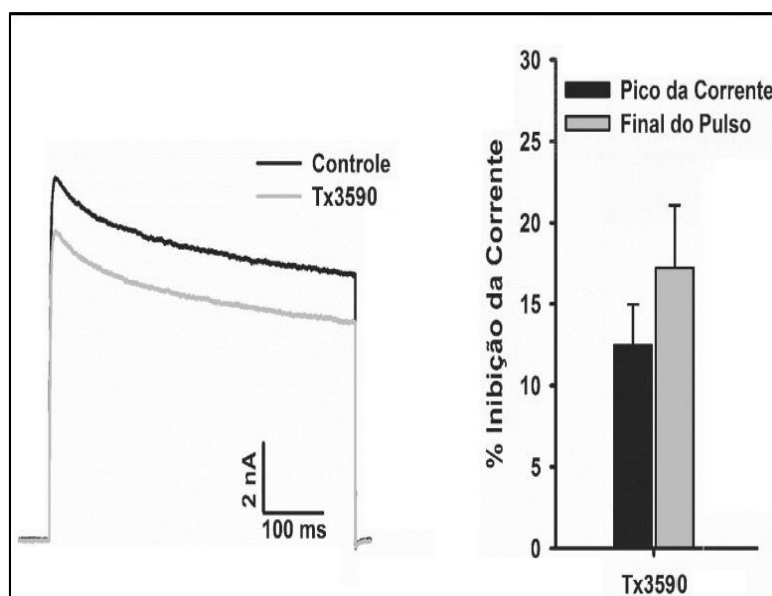


Figura 32. Teste biológico da Tx3590. Resultado eletrofisiológico da Tx3590 sobre correntes de K^+ em células DRG.

Tabela 6. Testes eletrofisiológicos realizados com as toxinas da subfamília α -KTxs18. Nesta se apresentam linhagens celulares ou subtipos de canais específicos onde foram testadas as toxinas. Resultados destes testes fisiológicos com concentrações fixas de toxina aparecem sublinhados. (**N.c.**) nome comum da toxina e (**Na**) não foi ativa sobre canais hKv 1.1 e hKv1.4 quando testada na concentração de 2 μ M.

Espécie	Subfamília	N.c.	Canal testado	K (d) nM	Ref.
<i>Tityus</i> sp.	<u>Tx3590</u>		<u>DRG</u>	<u>500 (Na)</u>	<u>Presente trabalho</u>
<i>T. obscurus</i>	α -KTx18.1	Tc32	hK _v 1.3	10	Batista <i>et al.</i> , 2002
	α -KTx18.2	TdK2	<i>Shaker Sf9</i>	1,5 μ M	
<i>T. discrepans</i>	α -KTx18.3	TdK3	xxxx	xxxx	Batista <i>et al.</i> , 2006

5.3.11 fração 34

Nesta fração doze componentes com diferentes características hidrofóbicas foram separados (Fig. 33). Uma molécula de 4.359,569 Da foi característica, mas, após análise da intensidade de material no cromatograma, foi determinado que esta fração de maior intensidade não tinha quantidade suficiente para continuar a purificação e caracterização bioquímica. Embora, uma análise da massa feita por MALDI-TOF/TOF destes componentes permitiu identificar outra molécula de massa molecular 3.480,279 própria de outra fração e a Tx3590.

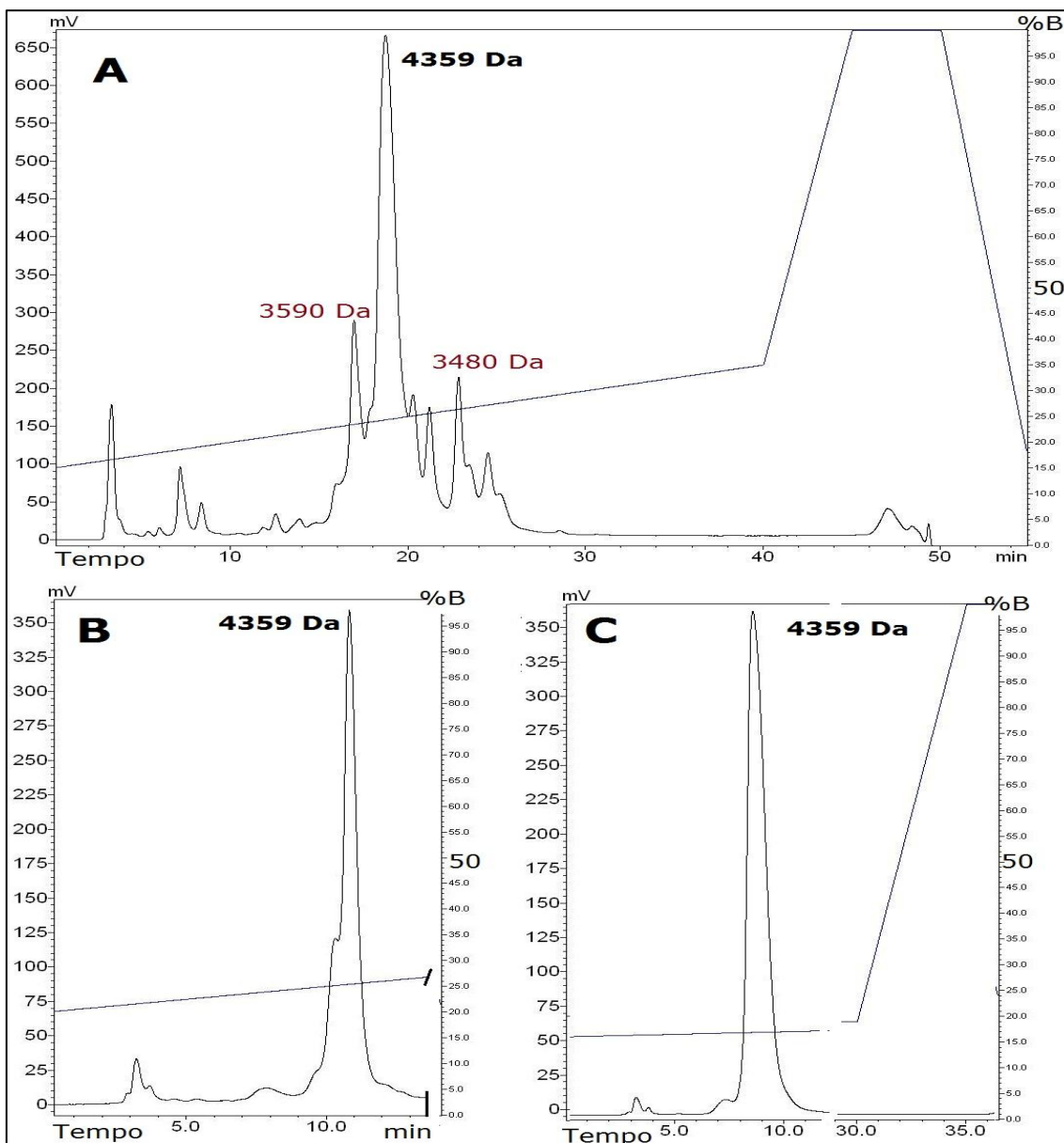


Figura 33. Cromatografia da fração 34. Entre seus componentes, em negrito, o de maior intensidade, e, em vermelho, o componente de interesse nesta pesquisa. A corrida inicial foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μ m) utilizando um gradiente linear de 15 a 35% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.3.12 fração 35

Nesta fração se destacam sete componentes com diferentes características hidrofóbicas (Fig. 34). Após análise da intensidade de material no cromatograma, foi determinado que a fração maior possui uma molécula de 3.480,279 Da. Outros componentes de diferentes massas moleculares eluíram nesta fração.

A molécula de 3.480,279 Da foi sequenciada parcialmente por MS-MS (Fig. 34D). A comparação desta com toxinas homólogas revelaram que esta provável toxina tem similaridade com aquelas toxinas que agem sobre canais para Na⁺ (NaScTx), e, por isso, não foi de interesse na presente dissertação.

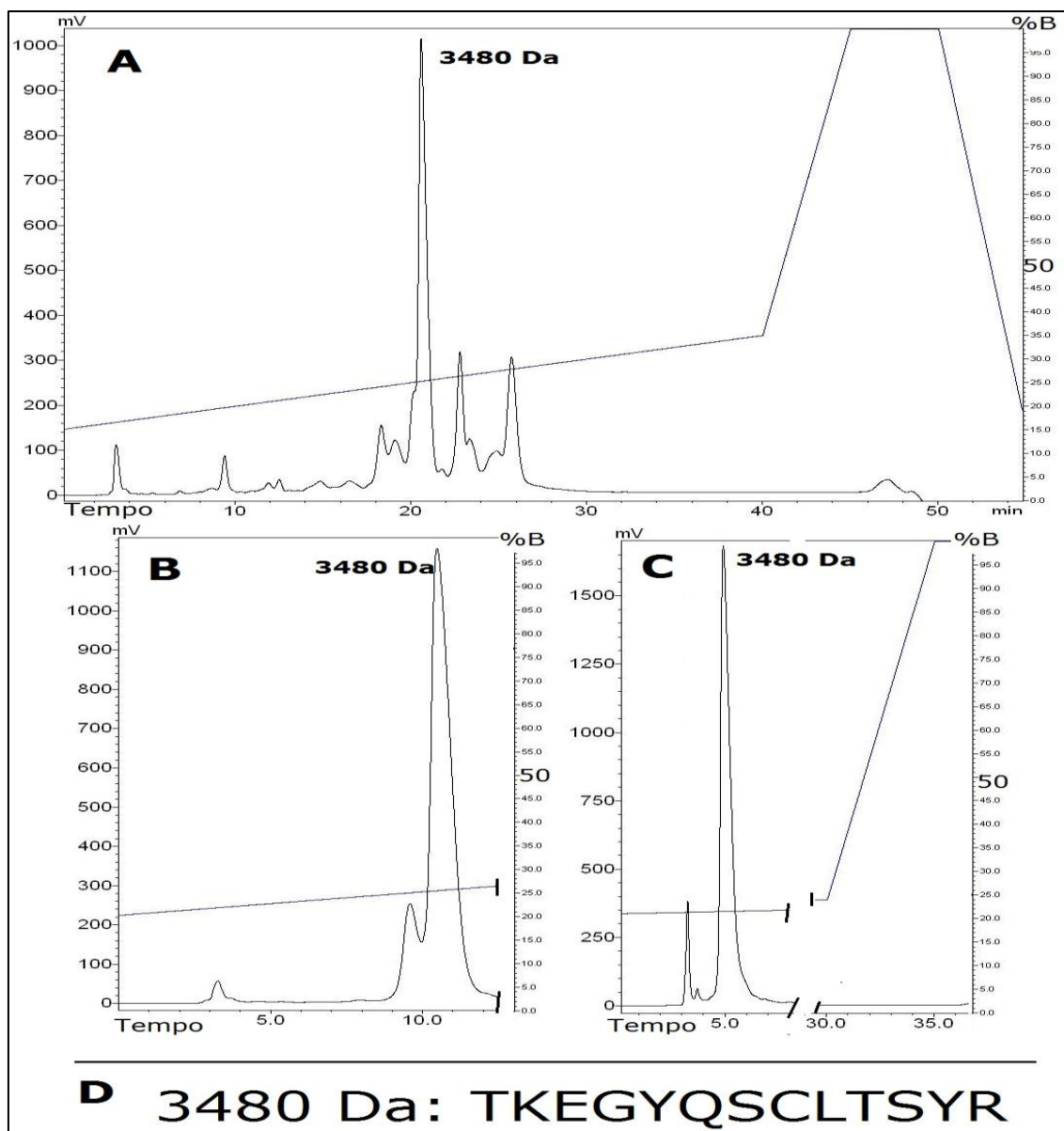


Figura 34. Cromatografia da fração 35. Entre seus componentes, em negrito, o componente de maior intensidade, o peptídeo de massa molecular 3.480 Da que eluiu em 25,6%B. **A**, **B** e **C** foram os passos cromatográficos para purificação do peptídeo. A corrida inicial foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μm) utilizando um gradiente linear de 10 a 30% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A corrida inicial foi feita com uma coluna de fase reversa C₁₈ analítica (*Phenomenex* 250 x 4.6 mm, 4 μm) utilizando um gradiente linear de 15 a 35% de solução B (Acetonitrila + TFA 0,1%) em 40 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

5.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS FRAÇÕES OBTIDAS DA PEÇONHA E OS TRANSCRITOS OBTIDOS DA BIBLIOTECA DE cDNA

As massas moleculares de componentes presentes nas frações da peçonha do escorpião *Tityus* sp. e as massas moleculares teóricas dos transcritos que são prováveis toxinas que agem sobre canais para K⁺ são apresentadas na Tabela 7. Um resumo dos resultados gerais mostra que cada fração cromatográfica possui mais de cinco componentes com um deles de maior quantidade. Como observado nas re-cromatografias, alguns componentes eluíram em diferentes frações, destacando que cada componente era o mesmo dado sua massa molecular e hidrofobicidade. Nos transcritos caracterizados foi encontrado que tinham massas moleculares teóricas entre 3590 Da e 4450 Da. Todos eles se apresentam com massa molecular teórica ajustada subtraindo ≈ 1 Da por Cisteína presente na molécula. Adicionalmente, aqueles transcritos que teoricamente teriam modificações pós-tradução foram corrigidos também. Dos transcritos Tpy1, Tpy2 e Tpy3 foram subtraídos ≈ 17 Da de cada devido à ciclização que ocorre na Q N-terminal. Após isto, foram comparadas as massas moleculares tanto das moléculas purificadas da peçonha, quanto das massas moleculares teóricas dos transcritos. A análise desta comparação mostra que dois transcritos, Tpy3 e Tpy5 (em vermelho) compartilham massa molecular com componentes purificados nas frações 28 e 31, respectivamente. Outros dois transcritos, Tpy1 e Tpy2 (em azul), compartilham semelhança com componentes de massa molecular que eluíram nas frações 34 e 25, respectivamente. Destes últimos componentes, o de massa molecular 4.280 Da não foi caracterizado bioquimicamente dada à quantidade limitante da amostra. O transcrito Tpy4 não compartilhou massa molecular com nenhum componente caracterizado da peçonha do escorpião *Tityus* sp.

Tabela 7. Massas moleculares detectadas nas frações cromatográficas da peçonha do escorpião *Tityus* sp. (parte superior) e obtidas a partir da biblioteca de cDNA de sua glândula de peçonha (parte inferior). Os íons de maior intensidade estão em negrito. As toxinas caracterizadas cujas massas moleculares experimentais foram idênticas às teóricas estão em vermelho. Outros componentes com possíveis semelhanças estão em azul. As massas moleculares experimentais foram obtidas em MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha).

Fração	Massa molecular experimental (Da)
17	2.415, 2.430, 2.436, 2.502 , 2.663
18	2.415, 2.430 , 2.436, 2.502, 2.561
19	1.289 , 2.430, 2.502, 3.603, 3.657
20	2.415, 2.430, 2.488 , 3.859
23	2.169, 3.473, 3.041, 3.596, 3.605, 3.640 , 38.59, 4.776, 4.793
25	3.640, 4.101, 4.115, 4.150 , 4.280 , 4.554, 4.685, 4.938, 5.102
28	3.590, 4.120, 4.130, 4.171 , 4.190, 4.363, 4.378, 4.391, 4.410
29	2.165, 2.316, 3.227, 3.680, 3.742, 3.841, 3.891 , 3.909, 4.130
30	3.683, 3.735, 3.746, 3.880, 4.094, 4.116, 4.130 , 4.958, 5.503
31	3.306, 3.590 , 3.735, 3.746, 3.577, 3.614, 4.259, 4.560, 5.665
34	3.480, 3.555, 3.560, 3.590, 3.976, 4.008, 4.359 , 4.434, 5.006
35	3.393, 3.444, 3.478 , 3.499, 3.927, 5.006, 5.296, 7.265, 7.297
Transcrito	Massa molecular teórica (Da)
Tpy1	4.356
Tpy2	4.288
Tpy3	4.171
Tpy4	4.450
Tpy5	3.590

6. DISCUSSÃO

As descrições de novas toxinas de escorpiões que agem sobre canais para potássio KTx têm aumentado proporcionalmente o número de pesquisas com peçonhas destes animais (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>). Estas toxinas, além de outras presentes nas peçonhas, são utilizadas por estes animais como mecanismo de caça e defesa (Loret & Hammock, 2001). A atividade das KTx de escorpiões promovem alterações fisiológicas nas células do organismo afetado, por exemplo, liberando neurotransmissores ou secreção de hormônios (Tygat *et al.*, 1999), em decorrência do bloqueio do fluxo iônico (Gati *et al.*, 2012). Adicionalmente, devido à abundância e às diferenças estruturais ou de atividade biológica apresentadas entre estas KTx, estas foram agrupadas em subfamílias (Tytgat *et al.*, 1999; Possani *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2002; Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Zhu *et al.*, 2010; <http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>). *Tityus* sp. pertence à família Buthidae, e provavelmente faz parte das espécies que podem apresentar novas KTx. Estas toxinas purificadas permitirão identificar propriedades farmacocinéticas próprias delas, dada sua composição estrutural primária única. Os transcritos aportarão informação valiosa na compressão do desenvolvimento molecular na transcrição dessas toxinas quando sintetizadas pela glândula de peçonha. Em seu conjunto, tanto as toxinas purificadas quanto os transcritos poderiam favorecer um avanço na compreensão dos processos moleculares e biológicos entre elas e dos escorpiões também. Apesar de não ter sido analisado um grande número de clones obtidos da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha, foram descritos no presente trabalho cinco precursores que traduzem para novas prováveis α -KTx. Dos estudos com a peçonha propriamente dita, foram purificadas e caracterizadas outras quatro toxinas.

Dos transcritos encontrados, os Tpy1, Tpy3 e Tpy5 foram *contigs*, enquanto que as Tpy2 e Tpy4 foram *singlet*. A importância de que aqueles transcritos sejam *contigs* baseia-se no fato de que quanto mais repetições de um plasmídeo, maior a probabilidade da toxina ser, de fato, traduzida na peçonha. Por outro lado, *singlets* que apresentam poucas diferenças nas suas sequências precisam ser melhor investigados. Os transcritos deste escorpião estão associados à presença de três α -KTx, discrepina-like (Tpy1, Tpy2 e

Tpy3), uma α -KTxs butantoxina-like (Tpy4) e o Tpy5 da subfamília α -KTxs18. As Tpy2 e Tpy3 foram muito semelhantes. Uma análise feita no eletroferograma (sequência cDNA) dos três primeiros precursores revelou que efetivamente a sequência nucleotídica da Tpy1 é diferente das Tpy2 e Tpy3, mas estas duas últimas compartilham uma identidade de 89%. Só cinco resíduos de aminoácidos as diferenciam entre si (Fig. 12). Similarmente, um estudo feito com precursores da glândula de peçonha do escorpião *Lychas mucronatus* revelou que três transcritos se diferenciavam entre si, somente por um ou dois resíduos de aminoácidos (Chen *et al.*, 2012). Não obstante, considerando que na glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. exista uma ampla variabilidade dos transcritos, a expressão destes na peçonha deve ser caracterizada (Quintero-Hernández *et al.*, 2011). Os Tpy3 e Tpy5 foram purificados da peçonha deste escorpião, mas, para confirmar a produção fisiológica dos transcritos Tpy1, Tpy2 e Tpy4 na peçonha, é necessário continuar pesquisando a peçonha deste escorpião.

A caracterização de precursores por meio da biblioteca de cDNA fornece informação adicional sobre um polipeptídeo à que poderia fornecer uma purificação convencional por métodos bioquímicos. Um precursor agrega informações adicionais como sequências de aminoácidos correspondentes ao peptídeo sinal, pre- e propeptídeo, peptídeo maduro, além de, para alguns casos, modificações pós-traducionais na sequência (Quintero-Hernández *et al.*, 2011). Os transcritos Tpy1, Tpy2, Tpy3, Tpy4 e Tpy5, produtos da biblioteca da glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp., não apresentaram outros componentes diferentes do peptídeo sinal e do peptídeo maduro. O peptídeo sinal destes transcritos, como para a maioria de proteínas e peptídeos, apresentaram cerca de 20 resíduos de aminoácidos (Figs. 10 e 11) e são importantes para sinalização do início da síntese da toxina em si. Adicionalmente, estes peptídeos favorecem o transporte do local de síntese da toxina até o espaço extracelular antes de se tornar biologicamente ativo. O peptídeo maduro dos transcritos Tpy1, Tpy2, Tpy3 e Tpy5 quando comparados com suas toxinas homólogas disponibilizadas em bases de dados foi similar, enquanto que, o Tpy4 apresentou no seu extremo N-terminal uma cisteína segundo a predição do programa *signalP4* (Fig. 11). Curiosamente, o

alinhamento do Tpy4 com a sua toxina homóloga, a butantoxina (Novello *et al.*, 1999) mostrou uma notável diferença. Esta última apresentou um triptofano no N-terminal.

A identidade das discrepina-*like* (Tpy1, Tpy2 e Tpy3), butantoxina-*like* (Tpy4) e a Tpy5 com as KTxs das suas respectivas subfamílias foi de até 57%, 87% e 77%, respectivamente (Fig. 13). Tanto a butantoxina como a discrepina e as α -KTx18 foram isoladas de peçonhas de escorpiões do gênero *Tityus*. Esperava-se encontrar mais moléculas similares àquelas de outras espécies do mesmo gênero, considerando-se a variabilidade dessas moléculas reportada na literatura. As butantoxinas-*like* ou α -KTx12 se distribuem em peçonhas de *T. serrulatus* (Novello *et al.*, 1999), *T. trivittatus* (Coronas *et al.*, 2003), *T. costatus* (Diego-García *et al.*, 2005) *T. stigmurus* (Batista *et al.*, 2007), e em *Lychas mucronatus* (Ruiming *et al.*, 2010). Os três transcritos (α -KTx12.5, α -KTx12.6 e α -KTx12.7) desta última espécie diferem das outras α -KTx12 pela ausência de duas cisteínas no N-terminal (Fig. 13), mas as toxinas descritas para esta subfamília assim como para as α -KTx18, ocorrem majoritariamente no gênero *Tityus*, evento que reflete o parentesco deste grupo de escorpiões. Embora ainda tenha sido descrita uma α -KTx12 na peçonha de escorpiões que não pertençam ao gênero *Tityus*, as KTxs da subfamília α -KTx15 ocorrem em diferentes gêneros da família Buthidae. Estas ocorrem em peçonhas de *Androctonus australis* (Pisciotta *et al.*, 2000), *Mesobuthus martensii* (Vacher *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2006), *Androctonus australis* (Legros *et al.*, 2003), *A. mauretanicus* (Vacher *et al.*, 2002), *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2004), *Androctonus amoreuxi* (Chen *et al.*, 2005) e *Lychas mucronatus* (Ruiming *et al.*, 2010) para um total de nove KTxs, todas isoladas de escorpiões da família Buthidae.

Os transcritos (Tpy1 – Tpy5) isolados do escorpião *Tityus* sp. compartilham características físico-químicas com as KTxs das suas respectivas subfamílias (Tabela 2). Estas propriedades estão associadas às estruturas primária, secundária e terciária (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tytgat *et al.*, 1999). Os transcritos apresentam entre seis e oito cisteínas distribuídas equivalentemente às discrepina-*like*, butantoxina-*like* ou aquelas da subfamília α -KTx18, que teoricamente formariam três ou quatro ligações dissulfeto

respectivamente. Este arranjo nas moléculas, favorecido pela sua estrutura primária, está de acordo com o modelo proposto “díade” (Fig. 13), no qual a posição de dois resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica, um resíduo básico e um aromático (K e Y, respectivamente), é conservada e formam o sítio reativo que permite reconhecer o canal iônico alvo (Dauplais *et al.*, 1997; Rodríguez de la Vega & Possani, 2004). Estas toxinas putativas, por similaridade, teoricamente seriam ativas sobre canais para K⁺ (Tabela 2) como suas toxinas homólogas (D’Suze *et al.*, 2004; Novello *et al.*, 1999; Batista *et al.*, 2002)

Neste estudo com a peçonha do escorpião *Tityus* sp. esperava-se encontrar as mesmas KTx dos precursores. Nossos resultados, tanto da transcritômica como da caracterização das toxinas presentes na peçonha, apresentaram duas coincidências. Uma análise espectrométrica de cada fração feita por MALDI-TOF/TOF revelou uma quantidade considerável de componentes com diferentes massas moleculares (Tabela 7). Aparentemente, nenhuma destas massas moleculares presentes nas frações foi similar às massas moleculares teóricas dos transcritos Tpy1, Tpy2 ou Tpy4. O fato de não conseguir estes transcritos na peçonha do escorpião *Tityus* sp. pode ter diversas explicações. Possivelmente estas toxinas eluem em alguma fração não pesquisada, ou ainda, que sejam expressas em pequenas quantidades na peçonha, como provavelmente aconteceu com aquela de massa molecular similar à da Tpy2, ou que o transcrito seja modificado por pós-tradução (Kozlov & Grishin, 2007). No entanto, foi determinado que dois transcritos, o Tpy3 e o Tpy5 são, provavelmente, os precursores dos componentes de massa molecular 4.171 Da, obtido da fração 28 e 3.590 Da, da fração 31, respectivamente (Tabela 7). Além destes parâmetros discutidos, um componente de massa molecular 4.359 Da, que eluiu na fração 34, apresentou em massa molecular semelhante com o Tpy1. Este componente não foi sequenciado devido à pequena quantidade de material (Fig. 33 C), motivo pelo qual não foi possível a caracterização protéica. Fato semelhante poderia estar acontecendo com o Tpy2, quando comparado com o componente de massa molecular 4.280 Da, que eluiu na fração 25 (Tabela 7). Após examinar as massas moleculares das frações comparando-as com a massa molecular do

transcrito Tpy4 não foi possível determinar outra equivalência peptídeo maduro-precursor.

Da peçonha do escorpião *Tityus* sp. foram caracterizadas quatro KTxS, aqui denominadas segundo a sua massa molecular em Tx2430, Tx3590, Tx3640 e Tx4171. Cada uma delas têm similaridade com uma subfamília diferente das α -KTxS, que são α -KTx13, α -KTx18, α -KTx17 e α -KTx15, respectivamente (Figs. 13, 18A e 23A). As α -KTxS são as toxinas mais abundantes das KTxS descritas (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>). Portanto, a probabilidade de ocorrência de novas toxinas desta subfamília em peçonhas de escorpiões é maior. Assim, características físico-químicas similares nessas toxinas são esperadas. Todas as α -KTxS isoladas da peçonha de *Tityus* sp. são de natureza básica e compõem-se de seis cisteínas ao longo da sua estrutura primária que favorecem o seu arranjo tridimensional. A similaridade na estrutura primária destas α -KTxS com homólogas de outras espécies de escorpiões foi maior quando as espécies foram mais aparentadas. As toxinas (p.e. α -KTx13.1 e α -KTx18.1), caracterizadas da peçonha do escorpião *T. obscurus* apresentaram maior similaridade com as Tx2430 e Tx3590 caracterizadas da peçonha de *Tityus* sp., respectivamente, que a α -KTx17.1 isolada de *B. martensi* com a Tx3640 (Fig. 22A), indicando uma proximidade evolutiva que reflete na expressão destas toxinas.

Estas toxinas foram submetidas a sequenciamento por degradação de Edman auxiliada com sequenciamento MS-MS. A Tx4171 não foi submetida ao sequenciamento por Edman por duas razões: esta toxina tem similaridade com toxinas da subfamília α -KTxS15 e sua sequência parcial de 17 aminoácidos, feita por MS-MS, originou a mesma sequência de um fragmento do transcrito Tpy3 que contém 38 resíduos, uma discrepina-*like*. Toxinas como a discrepina (D'Suze *et al.*, 2004) e a AmmTX3 (Vacher *et al.*, 2002), com um resíduo Gln no N-terminal, não puderam ser sequenciadas por Edman. Este impedimento é dado pela modificação do N-terminal do peptídeo. A Gln se cicliza formando um ácido piroglutâmico (Abraham & Podell 1981) e liberando NH₃. Esta molécula liberada gera uma diferença de ~17 Da a menos na massa molecular experimental. Após subtrair o valor da massa molecular correspondente à essa

modificação (-NH₃), a massa molecular do transcrito Tpy3 foi semelhante à da Tx4171, com um erro de 1,6 ppm (Fig. 26). Em concordância, o trabalho feito com a α -KTxs15.3 (Vacher *et al.*, 2002), onde foi utilizada a piroglutaminase para remover o ácido piroglutâmico, foi encontrada uma diferença semelhante desta modificação. Igualmente, com a discrepina este ácido piroglutâmico foi obtido e confirmado pela diferença da massa molecular teórica e experimental. Assim, nossos resultados mostram que essa Tx4171 isolada da peçonha é, provavelmente, consequência da expressão do transcrito Tpy3 encontrado na biblioteca de cDNA da glândula de peçonha deste escorpião.

A subfamília α -KTx13 à qual pertence a Tx2430 é representada por outras quatro toxinas isoladas de outras espécies, *T. obscurus* (Batista *et al.*, 2000), *Orthochirus scrobiculosus* (Dudina *et al.*, 2001) *T. pachyurus* (Barona *et al.*, 2006) e *T. stigmurus* (Batista *et al.*, 2007). A Tx2430 com 23 resíduos de aminoácidos, semelhante à Tc1 (Batista *et al.*, 2000), apresentou amidação (HNO) no extremo C-Terminal. Este dado foi confirmado por diferença de massa molecular teórica e experimental e, também por similaridade com a Tpa1 (Barona *et al.*, 2006). A Tpa1 isolada do escorpião *T. pachyurus* apresenta amidação na Y²³. Curiosamente, os escorpiões *T. pachyurus* e *Tityus* sp. ocorrem na Colômbia, estão muito próximos geograficamente e ambas espécies pertencem ao mesmo complexo taxonômico (grupo *forcipula*). Assim, a possibilidade que a Tx2430 sofra a amidação na Y²³ é muito alta. A subfamília α -KTx13 é representada por toxinas com o menor tamanho entre as KTxs e possuem, na estrutura primária, os resíduos típicos K¹⁴ e Y²³ que caracterizam o modelo da “díade” ativos na interação canal iônico-toxina (Batista *et al.*, 2000). O alinhamento da sequência da Tx2430 com homólogos permite inferir que esta toxina apresenta características compatíveis com o modelo da díade. Adicionalmente, a Tx2430, como a toxina mais próxima tanto da Tc1 quanto da Tpa1, se diferencia em um resíduo de aminoácido na mesma posição (A¹²) para todas.

Somente três toxinas da subfamília α -KTx18 foram caracterizadas dos escorpiões *T. obscurus* (Batista *et al.*, 2002) e *T. discrepans* (Batista *et al.*, 2006). A Tx3590, caracterizada por identidade com o transcrito Tpy5, foi semelhante à subfamília α -KTx18 e apresentou maior identidade com a Tc32.

Igualmente à sua toxina homóloga (Fig. 13), a Tx3590 possui uma S²⁵ no lugar da Lys²⁷ e também está ausente o resíduo aromático C-terminal próprio do modelo da “díade” (Batista *et al.*, 2002). A Tx3590 pertence a uma subfamília com poucos representantes e sua estrutura primária não apresenta características compatíveis com o modelo da “díade”. Recentemente, segundo a última modelagem feita da interação Tc32-canais K_v1.1 e K_v1.3, foi determinado que a afinidade da toxina ao canal iônico era determinada pelas características eletrostáticas, superfície de contato e ao momento dipolar tanto da toxina como do canal iônico alvo (Stehling *et al.*, 2012). Além disso, foi observado que a cadeia lateral do resíduo K presente na toxina interage com os resíduos G e Y presentes no poro do canal, segundo as propriedades farmacocinéticas mencionadas (Fig. 7).

A modelagem molecular da interação das toxinas homólogas à Tc32 também foi descrita (Stehling *et al.*, 2012). Dadas as propriedades de cada toxina, pode-se explicar o motivo pelo qual estas toxinas, mesmo sendo da mesma subfamília, tiveram atividades biológicas diferentes quando testadas eletrofisiologicamente (Batista *et al.*, 2002; 2006). A K³⁶ da Tc32, ausente nas TdK2 e TdK3, apresentou afinidade por K_v1.3 (Stehling *et al.*, 2012). No alinhamento da Tx3590 com a Tc32 (Fig. 13) também foi observada a ausência dessa K³⁶, mas a equivalência na presença e distribuição dos resíduos de K na Tx3590 foi maior com a TdK3. Assim, teoricamente, a Tx3590 não bloquearia K_v1.1 nem K_v1.3. Adicionalmente, segundo nossos resultados, esta toxina não bloqueia canais hK_v1.1 nem hK_v1.4. Portanto, é preciso investigar o tipo do canal iônico alvo desta toxina.

A Tx3640 é classificada como uma α-KTx17, subfamília representada por duas outras KTxs, uma toxina purificada e um transcrito identificado da peçonha dos escorpiões *B. martensi* (Li *et al.*, 2003) e *L. mucronatus* (Ruiming *et al.*, 2010), respectivamente. A Tx3640 pertence a uma das subfamílias com poucos representantes e não apresentou modificações químicas na sua estrutura primária, contrário de como mostrado para a BmKK4 (α-KTx17.1), esta toxina apresentou amidação na Thr C-terminal (Li *et al.*, 2003). Este dado foi determinado pela semelhança entre as massas moleculares teórica e experimental da Tx3640, e, adicionalmente, pelo alinhamento desta toxina com

sua homóloga, no qual foi observada a ausência do resíduo de aminoácido amidado em Tx3640 e presente na BmKK4 (Fig. 22A). A Tx3640 é a primeira toxina desta subfamília caracterizada para um *Tityus*. Esta toxina compartilha o mesmo resíduo básico com o resíduo R¹⁹ da sua toxina homóloga, a BmKK4, resíduo que substituiria a Lys²⁷ típica no modelo da “díade”. No entanto, mesmo possuindo este resíduo de aminoácido básico, foi proposto por Li e colaboradores em 2003, que o mecanismo de ação da BmKK4 não era conhecido e precisava ser investigado.

As quatro α -KTxs purificadas no presente trabalho foram avaliadas quanto à atividade sobre correntes iônicas de K⁺ em células DRG, na concentração de 500 nM. Nenhuma das toxinas avaliadas apresentou atividade biológica notável nesta concentração. A linhagem celular provavelmente seja a causa da atividade não detectada destas α -KTxs. É sabido que cada linhagem celular expressa diferentes subtipos de canais iônicos (Rasband *et al.*, 2001; Matsuyoshi *et al.*, 2012). As células DRG expressam isoformas das quatro famílias de canais para potássio K_{ir}, K_{2P}, K_{Ca} e K_v (Lee *et al.*, 2012). Entre estes estão expressos os subtipos de canais para K⁺, K_{2P} (Lee *et al.*, 2012), BK_{Ca} ou dependentes de cálcio de condutância alta (Zhang *et al.*, 2003; 2010), K_{Na} ou canais para potássio dependentes de sódio (Tamsett *et al.*, 2009) e canais para potássio dependentes de voltagem como K_v1.1, K_v1.2, K_v1.3, K_v1.4, K_v1.5, K_v1.6, K_v2.1, K_v3.4 (Ishikawa *et al.*, 1999; Duan *et al.*, 2012), K_v4.1 e K_v4.3 (Matsuyoshi *et al.*, 2012)

Como já é bem estabelecido, a atividade biológica ou afinidade da KTxs pelo canal iônico é dependente da composição do peptídeo. Toxinas da subfamília α -KTx13 mostraram ser ativas em canais tipo *Shaker* (homólogos à família K_v1). A OsK2, por exemplo, mostrou ser potente (K_d 97 nM) e seletiva para canais K_v1.2 (Dudina *et al.*, 2001), enquanto que a Tc1, com K_d 65 nM (Batista *et al.*, 2000), e a Tpa1, com K_d 200 nM (Barona *et al.*, 2006), foram ativas sobre canais tipo *Shaker* expressos em células Sf9. A Tx2430 reflete a baixa especificidade sobre correntes de K⁺ nos modelos testados. Esta toxina foi mais eficiente sobre canais hK_v1.1 que em canais hK_v1.4 ou corrente totais de potássio em células DRG mostrando maior afinidade pelo canal hK_v1.1. A OsK2 tem sido a mais potente e seletiva KTxs desta subfamília e sua estrutura

primária também revelou a maior diferença entre estas toxinas, incluindo a Tx2430. Esse fato poderia explicar a diferença na atividade biológica entre si, mas, curiosamente, as toxinas Tc1 e Tpa1 exibem uma diferença notável na diminuição de correntes de K⁺, embora, a diferença da estrutura primária delas junto à Tx2430 é só de um resíduo de aminoácido na mesma posição da sequência peptídica (Fig. 19). A Tx2430 (K_d ≈ 7 μM) foi ainda menos ativa sobre o bloqueio das correntes de potássio que a Tpa1 (K_d 200 nM).

Contrariamente às α-KTx13, as toxinas da subfamília α-KTx18 não apresentam afinidade pelos canais tipo *Shaker*. A Tc32 e a TdK2 mostraram inibir correntes de K⁺ em canais *Shaker* a 4 μM (Batista *et al.*, 2002) e 1 μM (Batista *et al.*, 2006), respectivamente. Só a Tc32 foi ativa (K_d 10 nM) sobre K_v1.3 expressos em linfócitos T (Batista *et al.*, 2002). A Tx3590 apresentou diminuição de correntes sobre canais retificadores retardados, mas não foi notável quanto a Tc32. Os linfócitos T expressam canais K_v1.3 com maior abundância (Gutman *et al.*, 2005) que as células DRG. Embora tenha sido discutido anteriormente o modelo de inibição proposto a partir da análise da interação Tc32- K_v1.1 e K_v1.3 (Stehling *et al.*, 2012), a probabilidade que uma toxina da mesma subfamília tenha atividade biológica e afinidade pelo mesmo canal alvo vai depender das cargas líquidas da superfície de contato e do momento dipolar. A diferença no bloqueio de correntes de potássio produzida pelas toxinas desta subfamília é, portanto, devido a essas características citadas. Estes dados, quando confirmados, podem esclarecer a afinidade da Tx3590 por canais para K⁺.

Da subfamília α-KTx17, só a BmKK4 foi purificada e testada sobre neurônios do hipocampo, mostrando que inibe correntes (10-100 μM) tanto do tipo retificador retardado, quanto de rápida inativação (Li *et al.*, 2003). A Tx3640, como sua homóloga, apresentou pouca diminuição neste tipo correntes *I_d* e *I_A*. Estas KTxs provavelmente apresentam o modelo do anel básico, indicado pela disposição de resíduos de aminoácidos básicos na cadeia polipeptídica. Nem a BmKK4 nem a Tx3640 foram testadas sobre subtipos específicos de canais para K⁺. Tanto a BmKK4 quanto a Tx3640 são as únicas duas toxinas purificadas e caracterizadas eletrofisiologicamente da subfamília α-KTx17 e seus alvos ainda estão por serem elucidados. Portanto,

considerando as características apresentadas, é necessária a investigação eletrofisiológica da Tx3640 em diferentes subtipos de canais para K⁺, visando identificar seus canal(is) alvo(s).

As toxinas purificadas e caracterizadas da subfamília α -KTx15 já foram testadas sobre células do cerebelo granular ou neurônios do cerebelo estriado. Desde aquela que teve a menor atividade, a discrepina com K_d 190 nM (D'Suze *et al.*, 2008), até a de maior atividade, a BmTx3 com K_d 54 nM (Vacher *et al.*, 2001), todas apresentaram diminuição das correntes do componente I_A , mas não do componente I_d . Similarmente, a Tx4171 diminuiu correntes deste tipo, mas também diminuiu correntes de K⁺ do tipo I_d . O tipo de correntes I_A ou rápida inativação são produzidos pelos canais K_v1.4, K_v3.4, K_v4.1 e K_v4.3 (Gutman *et al.*, 2005) As células DRG expressam estes subtipos de canais para K⁺ (Lee *et al.*, 2012), mas a pequena atividade da Tx4171 sobre correntes de K⁺ das células DRG sugerem a importância que tem o número destes subtipos de canais expressos nesta linhagem celular. A Tx4171, como suas KTxs homólogas, apresentou os resíduos de aminoácidos que compõe o modelo da díade. O alinhamento das toxinas (Fig. 12) mostra a K²⁷ e a Y³⁶ distribuídas em todas as KTxs desta subfamília.

Os resultados obtidos nos ensaios eletrofisiológicos no presente trabalho podem ser explicados pelo fato das toxinas purificadas da peçonha do escorpião *Tityus* sp. serem específicas de subtipos de canais que não se expressam ou que se expressam em pouco número nas células DRG. Das toxinas das subfamílias α -Ktx13, α -Ktx15, α -Ktx17 e α -Ktx18, nenhuma das KTxs homólogas descritas na literatura foi testada sobre células DRG (Barona *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2000; 2002; 2006; 2007; Dudina *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Vacher *et al.*, 2002). Embora a atividade biológica das α -KTxs, objeto desta pesquisa, tenha sido menor, foi observado em todos os testes com as diferentes toxinas, resultado similar. Assim, para melhor entender deste fenômeno, duas possibilidades podem comprometer a interação de uma toxina com seu canal iônico alvo. A primeira está relacionada à expressão dos subtipos de canais alvo em cada linhagem celular, quando testada uma toxina sobre corrente total *whole-cell*. Estas correntes poderiam variar dependendo do número de canais alvos expressos pela linhagem celular. A segunda

possibilidade, como discutido com as toxinas Tc1 e Tpa1 da subfamília α -KTx13, a estrutura primária dos peptídeos é importante pois a modificação de só um resíduo de aminoácido altera as propriedades físico-químicas da molécula. Mesmo que os modelos de interação convencionais propostos para as toxinas das subfamílias α -KTx13, α -KTx15 seja a díade e para α -KTx17 e α -KTx18 seja o anel básico, o modelo da interação Tc32 e hK_v1.1 (Stehling *et al.*, 2012) poderia ser expandido à outras KTxS, uma vez que este modelo adiciona ao estudo da interação toxina-canal iônico variáveis, como a interação eletrostática das superfícies de contato e momentos dipolares, além de explicar a importante atividade do resíduo de K na toxina.

7. CONCLUSÃO

Da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *Tityus* sp. foram descritos cinco novos transcritos que, por similaridade, pertencem à família das α -KTx.

Foram caracterizadas quatro KTxs purificadas da peçonha do escorpião que apresentaram atividade biológica discreta sobre células DRG, diminuindo correntes tanto do tipo retificador retardado, quanto de rápida inativação. A Tx2430 diminuiu as correntes de K^+ quando testada (2 μ M) no canal $hK_v1.1$ da família *Shaker*.

A interação e afinidade das toxinas com o seu canal alvo depende da estrutura primária da toxina.

Foram identificadas duas KTxs pelas duas estratégias, por transcritômica e bioquimicamente.

Finalmente, as novas toxinas caracterizadas do escorpião *Tityus* sp., entre transcritos e peptídeos purificados, são sete que incrementa em número, a subfamília das α -KTxs.

8. PERSPECTIVAS

Sugere-se caracterizar quimicamente as modificações apresentadas na estrutura primária das Tx2430 e Tx4171. Para a primeira toxina, uma esterificação de Fisher, procurando revelar a amidação no C-terminal da molécula, é necessária. Para a segunda toxina, pretende-se caracterizar a ciclização do Q por digestão com piroglutaminase, para remover o ácido piroglutâmico do N-terminal da molécula (Abraham & Podell 1981), e sequenciar, por degradação de Edman, pelo menos, o fragmento seguinte até conseguir a sequência obtida por MS-MS.

Aumentar os dados da biblioteca de cDNA da glândula do escorpião *Tityus* sp. procurando novos precursores de toxinas similares as KTxs.

Testar atividade biológica das toxinas Tx2430, Tx3590, Tx3640 e Tx4171 sobre outros subtipos específicos de canais para K^+ , visando identificar o alvo de cada toxina.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-mottaleb, Y., Corzo, G., Martin-eauclaire, M.-france, Peigneur, S., Nambaru, P., Satake, H., Ce, B., *et al.* (2008). A common “ hot spot ” confers hERG blockade activity to α -scorpion toxins affecting K⁺ channels. *Biochemical Pharmacology*, 76, 805-815.
- Abraham, G. N., & Podell, D. N. (1981). Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 38, 181-190.
- Abraham, G. N., & Podell, D. N. (1981). Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 38, 181-190.
- Allan G. Gornall, C. J. B. and M. M. D. (1948). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, (11), 751-766.
- Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M. L., & Treptow, W. (2012). Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *PNAS*, 109(52), 21336-21341.
- Barona, J., Batista, C. V. F., Zamudio, F. Z., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., & Possani, L. D. (2006). Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ - and K⁺ -channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et biophysica acta*, 1764(1), 76-84.
- Barona, J., Otero, R., & Núñez, V. (2004). Aspectos toxicológicos e inmunológicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica, 42-49.
- Batista, C. V. F., Gómez-Lagunas, F., Lucas, S., & Possani, L. D. (2000). Tc1 , from *Tityus cambridgei* , is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺ -channels. *FEBS letters*, 486(2000), 117-120.
- Batista, Cesar V F, Gómez-Lagunas, F., Rodríguez de la Vega, R. C., 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 B K(+) -channels with distinctly different affinities. *Biochimica et biophysica acta*, 1601(2), 123-31.
- Batista, Cesar V F, D'Suze, G., Gómez-Lagunas, F., Zamudio, F. Z., Encarnación, S., Sevcik, C., & Possani, L. D. (2006). Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics*, 6(12), 3718-27.
- Batista, C V F, Román-gonzález, S. A., Salas-castillo, S. P., & Zamudio, F. Z. (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus* : Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species ☆. *CBP*, 146, 147-157.

- Beirão L., S. P. (2009). Canais iônicos e eletrogênese nas células excitáveis. In: Procópio, J., & Curi, R. *Fisiologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. Capítulo 6 (p. 109).
- Brownell, P., & Polis, G. (2001). *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, New York. (p. 431).
- Camargos, T. S., Restano-Cassulini, R., Possani, L. D., Peigneur, S., Tytgat, J., Schwartz, C. A., Alves, E. M. C., *et al.* (2011). The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides*, 32(7), 1509-17. Elsevier Inc.
- Campos, F. V., Chanda, B., Beirão, P. S. L., & Bezanilla, F. (2007). β -Scorpion Toxin Modifies Gating Transitions in All Four Voltage Sensors of the Sodium Channel, *130*(3), 257-268.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., & Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, 124-141.
- Chen, Z.-yun, Zhen, D.-yun, Hu, Y.-T., He, Y.-W., Pan, N., Ding, L.-P., Cao, Z.-J., *et al.* (2012). Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS ONE*, 7(4), e35154.
- Chippaux, J.-P., & Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica*, 107(2), 71-9.
- Choe, S. (2002). POTASSIUM CHANNEL STRUCTURES. *Neuroscience*, 3, 115-121.
- Chuang, R. S.-i, 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(8), 668-674.
- Cologna, C. T., Marcussi, S., Giglio, J. R., Soares, A. M., & Arantes, E. C. (2009). *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein and peptide letters*, 16(8), 920-32. Retrieved from
- Corona, M., Gurrola, G. B., Merino, E., Cassulini, R. R., Valdez-Cruz, N. a, García, B., Ramírez-Domínguez, M. E., *et al.* (2002). A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS letters*, 532(1-2), 121-6.
- Coronas, F. V., Roodt, A. R. D., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F., Gómez-Lagunas, F., & Possani, L. D. (2003). Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁺ channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 41, 173-179.
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., Medeiros, C. L. C. D., *et al.* (1997). On the Convergent Evolution of Animal Toxins. CONSERVATION OF A DIAD OF FUNCTIONAL RESIDUES IN

POTASSIUM CHANNEL-BLOCKING TOXINS WITH UNRELATED STRUCTURES. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 272(7), 4302-4309.

- Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., & Treptow, W. (2011). Intermediate states of the Kv1 . 2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *PNAS*, 2-7.
- Demeure, K., Gabelica, V., & Pauw, E. A. D. (2010). New Advances in the Understanding of the In-Source Decay Fragmentation of Peptides in MALDI-TOF-MS. *American Society for Mass Spectrometry*, 21, 1906-1917.
- Denny, R. A., Gavrin, L. K., & Saiah, E. (2013). Recent developments in targeting protein misfolding diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23, 1935-1944.
- Diego-garcía, E., Batista, C. V. F., Garcia, 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. doi:10.1016/j.toxicon.2004.10.014
- Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E. F., Rodríguez de la Vega, R. C., Tytgat, J., & Possani, L. D. (2008). Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 187-200.
- Doyle, D. a., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kou, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., et al. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- D'Suze, G., Batista, C. V. F., Frau, A., Murgia, A. R., Zamudio, F. Z., Sevcik, C., Possani, L. D., et al. (2004). Discrepin, a new peptide of the sub-family alpha-ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺ - channels (IA currents) of cerebellum granular cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(2), 256-63.
- Duan, K.-Z., Xu, Q., Zhang, X.-M., Zhao, Z.-Q., Mei, Y.-A., & Zhang, Y.-Q. (2012). Targeting A-type K(+) channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in a rat model. *Pain*, 153(3), 562-74.
- Dudina, E., Korolkova, Y. V., Bocharova, N., Koshelev, S., Egorov, T., Huys, I., Tytgat, J., et al. (2001). OsK2, a New Selective Inhibitor of Kv1.2 Potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 286, 841-847.
- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Luccio, E. D., Bichet, D., Ayeb, M. E., et al. (2000). Chemical synthesis and characterization of maurocalcine , a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel / ryanodine receptors. *FEBS*, 469, 179-185.

- Fatani, A. J. (2010). Comparative study between peripherally and centrally acting sublethal and lethal doses of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in rabbits: The usefulness of the sodium channel blocker lidocaine. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(3), 137-151. King Saud University.
- Fuller, M. D, Zhang, Z., Cui, G., Kubanek, J., A, N., Cohen, S. P., Haack, K. K. V., *et al.* (2004). Inhibition of CFTR channels by a peptide toxin of scorpion venom Inhibition of CFTR channels by a peptide toxin of scorpion venom. *American Journal Of Physiology*, 287, 1328-1341.
- Fuller, M. D, Thompson, C. H., Zhang, Z.-ren, Freeman, C. S., Schay, E., McMaster, D., French, R. J., *et al.* (2007). State-dependent Inhibition of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channels by a Novel Peptide Toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37545-37555.
- Gati, C. D. C., Mortari, M. R., & Schwartz, E. F. (2012). Towards therapeutic applications of arthropod venom k(+)-channel blockers in CNS neurologic diseases involving memory acquisition and storage. *Journal of toxicology*, 2012, 756358.
- Goldstein, S. A. N., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., & Plant, L. D. (2005). International Union of Pharmacology . LV . Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4),
- González-Sponga, M. A. (1996). *Guía para identificar escorpiones de Venezuela* (p. 204). Caracas: José Gonveia P.
- Guerrero-Vargas, J. A., Mourão, C. B. F., Quintero-Hernández, V., Lourival D., P., & Schwartz, E. F. (2012). Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺ -Channel Scorpion Toxins. *PLoS ONE*, 7(2), 1-13.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., *et al.* (2005). International Union of Pharmacology . LIII . Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473-508.
- Gómez C., J. P., & Otero P., R. (2007). Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública*, 25, 50-60.
- Gómez C., J. P., Otero Patiño, R., Núñez Rangel, V., Saldarriaga Córdoba, M. M., Díaz Cadavid, A., & Sandino Velásquez, P. M. (2002). Aspectos toxicológicos , clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin, (4), 159-165.
- Gómez, J. P., Quintana, J. C., Arbeláez, P., Fernández, J., Silva, J. F., Barona, J., Gutiérrez, J. C., *et al.* (2010). Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá ,

- Colombia : aspectos epidemiológicos , clínicos y toxicológicos. *Biomédica*, 30, 126-139.
- Hancock, R. E. W., Brown, K. L., & Mookherjee, N. (2006). Host defence peptides from invertebrates--emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 211(4), 315-22.
- Huys, I., Olamendi-Portugal, T., Garcia-Gómez, B. I., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Dyason, K., Clynen, E., *et al.* (2004). A subfamily of acidic alpha-K(+) toxins. *The Journal of biological chemistry*, 279(4), 2781-9.
- Huys, I., Xu, C.-qi, Wang, C.-zhong, Vachers, H., MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F., Chi, C.-W., & and Titgat, J. (2004). BmTx3 , a scorpion toxin with two putative functional faces separately active on A-type K + and HERG currents. *Biochem*, 378, 745-752.
- Ischikawa, K., Tanaka, M., Black, J., & Waxman, S. (1999). VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS IN DORSAL ROOT GANGLION NEURONS FOLLOWING AXOTOMY. *Muscle & Nerve*, (April), 502-507.
- 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 : official journal of the International Society on Toxinology*, 1-7. Elsevier Ltd.
- Karalliedde, L. (1995). Animal toxins. *British Journal of Anaesthesia*, (74), 319-327.
- Khattabi, A., Soulaymani-Bencheikh, R., Achour, S., & Salmi, L.-R. (2011). Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(7), 364-
- Korolkova, Y. V., Bocharov, E. V., Angelo, K., Maslennikov, I. V., Grinenko, O. V., Lipkin, A. V., Nosyreva, E. D., *et al.* (2002). New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1. *The Journal of biological chemistry*, 277(45), 43104-9.
- Kozlov, S. A., & Grishin, E. V. (2007). The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 49, 721-726.
- Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., *et al.* (2005). International Union of Pharmacology . LIV . Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 509-526.
- Lange, A., Giller, K., Hornig, S., Martin-Eauclaire, M.-F., Pongs, O., Becker, S., & Baldus, M. (2006). Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR. *Nature*, 440(7086), 959-62.

- Lee, J., Kim, T., Hong, J., Woo, J., Min, H., Hwang, E., Lee, S. J., et al. (2012). Imiquimod enhances excitability of dorsal root ganglion neurons by inhibiting background (K(2P)) and voltage-gated (K(v)1.1 and K(v)1.2) potassium channels. *Molecular pain*, 8(1), 2.
- Li, M.-H., Zhang, N.-X., Chen, X.-Q., Wu, G., Wu, H.-M., & Hu, G.-Y. (2003). BmKK4, a novel toxin from the venom of Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch, inhibits potassium currents in rat hippocampal neurons in vitro. *Toxicon*, 42(2), 199-205.
- Loret, E., & Hammock, B. (2001). Structure and Neurotoxicity of Venoms. In: P. Brownell & G. Polis (Eds.), *Scorpion biology and research* (p. 431). New York.
- Maertens, C., Cuypers, E., Amininasab, M., Jalali, A., & Vatanpour, H. (2006). Potent Modulation of the Voltage-Gated Sodium Channel Na v 1 . 7 by OD1 , a Toxin from the Scorpion *Odonthobuthus doriae*. *Molecular Pharmacology*, 70(1), 405-414.
- Martin-Eauclaire, M.-F., & Bougis, P. E. (2012). Potassium channels blockers from the venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, *J. Toxicol*, 2012, 1-9.
- Matsuyoshi, H., Takimoto, K., Yunoki, T., Erickson, V. L., Tyagi, P., Hirao, Y., Wanaka, A., et al. (2012). Distinct cellular distributions of Kv4 pore-forming and auxiliary subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Life sciences*, 91(7-8), 258-63.
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1(4), 1-5.
- Morales D., H. (2011). Determinación de la actividad neurotóxica y antimicrobiana del veneno del escorpión *Tityus* sp. (Buthidæ) del municipio de Popayán, Cauca. (98p)
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., & Sabatier, J.-M. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *The Biochemical journal*, 378.
- Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., & Sabatier, J.-marc. (2008). Animal Toxins Acting on Voltage-Gated Potassium Channels. *Current pharmaceutical design*, 14, 2503-2518.
- Nirathanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, Ponnampalam J., J. S., Sato, K., & Tytgat, J. (2005). Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom.pdf. *Biochemical Pharmacology*, 69, 669-678.
- Noskov, S. Y., & Roux, B. (2006). Ion selectivity in potassium channels. *Biophysical chemistry*, 124(3), 279-91.

- Novello, J. C., Arantes, E. C., Varanda, W. A., Oliveira, B., Giglio, J. R., & Marangoni, S. (1999). neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels, *37*, 651-660.
- Olamendi-Portugal, T., In, B., Walt, J. V. D., Dyason, K., Ulens, C., Tytgat, J., Felix, R., *et al.* (2002). Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochemical and biophysical research communications*, *299*, 562-568.
- Omran, M. A. A. (2003). Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 1-17.
- Otero R., Uribe FL., Sierra A. (1998). Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actualizaciones Pediátricas*, (8) 88-92.
- Otero, R., Navío, E., Céspedes, F. a, Núñez, M. J., Lozano, L., Moscoso, E. R., Matallana, C., *et al.* (2004). Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *98*(12), 742-50.
- Panyi, G., Possani, L. D., Rodríguez de la Vega, R. C., Gáspár, R., & Varga, Z. (2006). K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Current pharmaceutical design*, *12*(18), 2199-220.
- Pisciotta, M., Coronas, F. I., Bloch, C., Prestipino, G., & Possani, L. D. (2001). Fast K⁺ currents from cerebellum granular cells are completely blocked by a peptide purified from *Androctonus australis* Garzoni scorpion venom. *BBA*, *1468*(2000), 203-212.
- Possani, L. D, Merino, E., Corona, M., Bolívar, F., & Becerril, B. (2000). Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, *82*, 861-868.
- Poolos, N. P., & Johnston, D. (2012). Dendritic ion channelopathy in acquired epilepsy. *Epilepsia*, *53 Suppl 9*, 32-40.
- Pringos, E., Vignes, M., Martinez, J., Rolland, V., Mousseron, M., & E, P. (2011). Peptide Neurotoxins That Affect Voltage-Gated Calcium Channels: A Close-Up on ω -Agatoxins. *Toxins*, *3*, 17-42.
- Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E. F., Becerril, B., Corzo, G., & Possani, L. D. (2011). Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, *58*(8), 644-63.
- Rasband, M., Park, E., Vanderah, T., Lai, J., Porreca, F., & Trimmer, J. (2001). Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *neurobiology*, *98*(23), 13373-8.

- Restano-cassulini, R., Korolkova, Y. V., Diochot, S., Gurrola, G., Guasti, L., Possani, L. D., Lazdunski, M., et al. (2006). Species Diversity and Peptide Toxins Blocking Selectivity of Ether-à-go-go – Related Gene Subfamily K + Channels in the Central Nervous System. *Molecular Pharmacology*, 69(5), 1673-1683.
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 43, 865-875.
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 46(8), 831-44.
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2007). Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *World*, 49, 171-180.
- Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., & Possani, L. D. (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(5), 222-227.
- Ruiming, Z., Yibao, M., Yawen, H., Zhiyong, D., Yingliang, W., Zhijian, C., & Wenxin, L. (2010). Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. *BMC*, 11(452), 1-15.
- Saucedo, A. L., Flores-Solis, D., Rodríguez de la Vega, R. C., Ramírez-Cordero, B., Hernández-López, R., Cano-Sánchez, P., Noriega Navarro, R., et al. (2012). New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *The Journal of biological chemistry*, 287(15), 12321-30.
- 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(3), 392-403.
- Selisko, B., Garcia, C., Becerril, B., Gómez-Lagunas, F., Garay, C., & Possani, L. D. (1998). Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 254(3), 468-479.
- Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, K. S., Sato, K., et al. (2002). k-Hefutoxin1 , a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function. *Biochemistry*, 277(33), 30040 - 30047.
- Stahnke, H. L. (1970). Scorpion nomenclature and mesuration. *Entomological News*, 81(12), 297-316.

- Stehling, E. G., Sforça, M. L., Zanchin, N. I. T., Oyama, S., Pignatelli, A., Belluzzi, O., Polverini, E., et al. (2012). Looking over toxin-K(+) channel interactions. Clues from the structural and functional characterization of α -KTx toxin Tc32, a Kv1.3 channel blocker. *Biochemistry*, *51*(9), 1885-94.
- Tamsett, T. J., Picchione, K. E., & Bhattacharjee, A. (2009). NAD⁺ activates KNa channels in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(16), 5127-34.
- Tan, P. T. J., Veeramani, A., Srinivasan, K. N., Ranganathan, S., & Brusica, V. (2006). SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *47*(3), 356-63.
- Thompson, C H, Fields, D. M., Olivetti, P. R., Fuller, M. D., Zhang, Z. R., Kubanek, J., & Mccarty, N. A. (2005). Inhibition of ClC-2 Chloride Channels by a Peptide Component or Components of Scorpion Venom. *Membrane Biology*, *76*, 65-76.
- Thompson, Christopher H, Olivetti, P. R., Fuller, M. D., Freeman, C. S., McMaster, D., French, R. J., Pohl, J., et al. (2009). Isolation and Characterization of a High Affinity Peptide Inhibitor of ClC-2 Chloride Channels * □. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(38), 26051-26062.
- 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*(6), 2107-9.
- Tseng, G.-ny, Sonawane, K. D., Korolkova, Y. V., Zhang, M., Liu, J., Grishin, E. V., & Guy, H. R. (2007). Probing the Outer Mouth Structure of the hERG Channel with Peptide Toxin Footprinting and Molecular Modeling. *Biophysical Journal*, *92*, 3524-3540.
- 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*(11), 444-7.
- Vacher, H., Alami, M., Crest, M., Possani, L. D., Bougis, P. E., & Martin-eauclaire, M. F. (2002). Expanding the scorpion toxin a-KTX 15 family with AmmTX3 from *Androctonus mauretanicus*. *FEBS letters*, *6041*, 6037-6041. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03294.x
- Vacher, H., Romi-Lebrun, R., Mourre, C., Lebrun, B., Kourrich, S., Masméjean, F., Nakajima, T., et al. (2001). A new class of scorpion toxin binding sites related to an A-type K_v channel: pharmacological characterization and localization in rat brain. *FEBS letters*, *501*, 31-36.
- Valdivia, H. H., & Possani, L. D. (1998). Peptide Toxins as Probes of Ryanodine Receptor Structure and Function. *Trends Cardiovasc Med*, *8*(3), 111-118.

- Vetter, I., Davis, J. L., Rash, L. D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P. F., Lewis, R. J., et al. (2011). Venomics. a new paradigm for natural products-based.pdf. *Amino Acids*, 40, 15-28.
- 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(4), 463-472.
- Won, C., Eu, Y.-jae, Jung, H., Cho, E.-mi, Lee, J.-ho, Hyung, H., Nah, S.-yeol, et al. (2011). Expression and characterization of recombinant kurtoxin , an inhibitor of T-type voltage-gated calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(3-4), 277-282.
- 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*. *The Journal of biological chemistry*, 272(18), 11886-94.
- Zeng, X.-chun, Luo, F., & Li, W.-xin. (2006). Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* : Identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides. *Peptides*, 27, 1745-1754.
- Zhang, X.-F., Gopalakrishnan, M., & Shieh, C.-C. (2003). Modulation of action potential firing by iberiotoxin and NS1619 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 122(4), 1003-1011.
- Zhang, X.-L., Mok, L.-P., Katz, E., & Gold, M. (2010). BKCa currents are enriched in a subpopulation of adult rat cutaneous nociceptive dorsal root ganglion neurons. *European Journal of neuroscience*, 31, 450-462.
- Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., & Wenxin, L. (2006). Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 47(3), 348-55.
- Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., Lanz-Mendoza, Maria del Carmen Rodríguez, H., Peigneur, S., Diego-Garcia, E., Martin-Eauclaire, M.-F., et al. (2010). MeuTXKβ1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 872-883.