



TESE DE DOUTORADO

**Identificação e caracterização de peptídeos bioativos
presentes na peçonha do escorpião Colombiano
Centruroides margaritatus (Gervais, 1841)**

Rosa Amalia Dueñas Cuellar

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**BRASÍLIA - DF
FEVEREIRO 2014**



TESE DE DOUTORADO

**Identificação e caracterização de peptídeos bioativos
presentes na peçonha do escorpião Colombiano
Centruroides margaritatus (Gervais, 1841)**

Rosa Amalia Dueñas Cuellar

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biología Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor.**

**BRASÍLIA - DF
FEVEREIRO 2014**

**Tese defendida e aprovada na Universidade de Brasília, em sessão pública
no dia 14 de fevereiro de 2014.**

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Mariana de Souza Castro. (orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Carlos André O. Ricart (examinador)
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama (examinadora)
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau (examinador)
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília**

**Dra. Natália Florêncio Martins (examinadora)
EMBRAPA/CENARGEN**

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”.

Marie Curie

“A felicidade deve ser o objetivo final de todo ser humano, o que nos faz feliz é capaz de mover o nosso coração, corpo e mente, libertar nossas paixões e fazer-nos alcançar o que parece inacreditável”.

Rosa Dueñas

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Mariana S. Castro, minha orientadora, por me acolher com carinho e confiança no laboratório, por ser um exemplo de pessoa e cientista e me incentivar sempre na procura da excelência.

A todos os meus colegas do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas: Micaella Pereira, Anne Dias, Elaine Nascimento, Diana Gómez, Aline Barbosa, Aline Chagas, Ana Carolline Toledo, César Augusto Prías e Adelson Silva pela colaboração e disponibilidade sempre que foram necessárias, os papos científicos e não tão científicos, os cafés intermináveis, a amizade e as risadas.

A meus amigos do coração, Jéssica Kele, Andréa Cruz e Carvalho, Jaques Souza e Rayner Myr, não teria palavras para descrever o quanto a minha vida seria diferente sem vocês no meu dia a dia no laboratório. Achei em vocês o carinho de irmãos, obrigada por cada momento juntos e cada palavra no momento certo.

Aos professores e técnicos do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, Prof. Dr. Wagner Fontes, Prof. Dr. Pedro José P. Zanotta, Prof. Dr. Sebastián Charneu, Prof. Dr. Carlos André Ricart, Profa. Dra. Consuelo de Lima, Nuno Donmingues e Antônio Rufino dos Santos, pelos conhecimentos transmitidos e ajuda.

Ao Professor Dr. Christopher Kushmerick, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo acolhimento no seu laboratório, seus ensinamentos e colaborações científicas.

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, pela eficiência na determinação das estruturas primárias parciais das toxinas em estudo.

Ao *Centro de Investigaciones Biomedicas* da Universidade do Cauca (CIBUC), sob a coordenação do professor Jose Toribio Beltrán, por providenciar a captura e manutenção dos escorpiões, assim como a extração da peçonha.

Ao Professor Dr. Jimmy Guerrero Vargas pelo seu inigualável apoio acadêmico, por me introduzir no mundo da Toxinologia e me brindar sua amizade sincera.

Aos meus pais Mabel Amalia Cuellar e Alvaro Hernán Dueñas por compreender e impulsionar meus sonhos e semear em mim, através do exemplo, o carinho pelos estudos e pela dedicação ao trabalho.

Ao meu irmão Juan Sebastian Dueñas Cuellar por cuidar da nossa família na minha ausência, por ser meu apoio e meu ponto de referência ante as dificuldades.

À minha família e amigos por acompanhar de perto minhas experiências, se alegrar com cada um dos meus triunfos e me apoiar nas dificuldades.

À Deus pela benção da vida, saúde, inteligência e entendimento. Por ter feito de todos os meus caminhos um grande aprendizado e colocar anjos em cada lugar onde tenho chegado.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto foi desenvolvido graças ao apoio financeiro da Universidade de Brasília (UnB) e das agências de fomento à pesquisa brasileira (CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

INDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	ESCORPIÕES	1
1.1.1.	Toxinas escorpiônicas.....	2
1.1.2.	Escorpiões de interesse médico na Colômbia.....	3
1.1.3.	Estudos que envolvem a peçonha do escorpião <i>Centruroides margaritatus</i>	4
1.2.	CÂNCER.....	6
1.2.1.	Apoptose.....	8
1.2.2.	As toxinas escorpiônicas e o câncer	10
1.3.	DOENÇAS INFECCIOSAS	15
1.3.1.	Resistência bacteriana.....	16
1.3.2.	Características das membranas bacterianas	18
1.3.3.	Mecanismos de ação dos PAMs	21
1.3.4.	PAMs isolados de escorpiões	24
1.4.	CANAIS IÔNICOS	28
1.4.1.	Canais iônicos para sódio	28
1.4.2.	Toxinas que agem em canais para sódio	30
1.4.3.	Doenças ligadas aos canais para sódio (“Canalopatias”)	39
1.4.4.	O potencial de ação e a técnica DRG (<i>Dorsal Root Ganglia</i>).....	40
2.	JUSTIFICATIVA	43
3.	OBJETIVOS E METAS	44
3.1.	Objetivo geral	44
3.2.	Metas estabelecidas	44
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1.	Reagentes químicos	47
4.2.	Coleta e manutenção dos escorpiões em cativeiro	47
4.3.	Extração da peçonha bruta.....	47
4.4.	Dosagem de proteínas e peptídeos.....	47
4.5.	Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta	48
4.6.	Ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais	48
4.6.1.	Cultivo celular	48
4.6.2.	Manutenção da cultura de células.....	49
4.6.3.	Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	50

4.7.	Ensaio antimicrobiano	51
4.8.	Purificação dos peptídeos	52
4.9.	Espectrometria de massas	53
4.10.	Ensaio hemolítico	53
4.10.1.	<i>Screening</i>	54
4.10.2.	Determinação da HC ₅₀	54
4.11.	Avaliação de atividade no potencial de ação de neurônios DRGs	54
4.11.1.	Animais.....	54
4.11.2.	Dissociação de neurônios DRG.....	54
4.11.3.	Dissecação	55
4.11.4.	Dissociação.....	55
4.11.5.	Manutenção dos neurônios	56
4.11.6.	Registro eletrofisiológico	56
4.12.	Sequenciamento químico dos peptídeos isolados.....	57
4.13.	Análises computacionais	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1.	Dosagem de proteínas.....	59
5.2.	Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta	59
5.3.	Varredura de massas moleculares dos componentes presentes na peçonha de <i>C. margaritatus</i>	61
5.4.	Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	65
5.5.	Purificação dos peptídeos	68
5.5.1.	Peptídeos antitumorais.....	69
5.5.2.	Peptídeos antibacterianos	81
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	93
7.	REFERÊNCIAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de incidência e escorpionismo no mundo.....	1
Figura 2. Espécime de <i>Centruroides margaritatus</i> . Indivíduo coletado no vale do Patía (fêmea adulta).....	4
Figura 3. Anormalidade histopatológica do epitélio de órgãos durante um processo carcinogênico.....	8
Figura 4. Estrutura primária da Clorotoxina isolada da peçonha do escorpião <i>Leiurus quinquestriatus</i>	12
Figura 5. Arquitetura básica do envelope celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	20
Figura 6. Representação dos modelos propostos para os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos sobre membranas biológicas. 6.1. Modelo do barril; 6.2. Modelo do agregado micelar; 6.3 Modelo do poro toroidal e 6.4. Modelo do tapete.....	23
Figura 7. Representação simples da topologia transmembranal das subunidades α e β nos Na_vCh	29
Figura 8. Representação esquemática de um Na_vCh e suas unidades funcionais.....	30
Figura 9. Esquema da estratégia experimental empregada.....	46
Figura 10. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	60
Figura 11. Porcentagem de distribuição de massas moleculares dos componentes presentes na peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	63
Figura 12. Perfil cromatográfico do fracionamento da fração Cm1.F1 eluída da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i> em coluna de fase reversa C_{18}	70
Figura 13. Perfil cromatográfico típico da purificação da fração F24 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i> em coluna de fase reversa C_{18}	71
Figura 14. Espectro de massas da fração bioativa F24 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	72

Figura 15. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F24 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST.	73
Figura 16. Perfil cromatográfico típico da purificação da fração F30 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i> em coluna de fase reversa C ₁₈	74
Figura 17. Espectro de massas da fração bioativa F30 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	75
Figura 18. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F30 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST.	76
Figura 19. Perfil cromatográfico típico da purificação da F31 em coluna de fase reversa C ₁₈	77
Figura 20. Espectrograma da fração bioativa F31 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	77
Figura 21. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F31 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST.	78
Figura 22. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos das toxinas F24, F30 e F31.	78
Figura 23. Perfil cromatográfico típico da purificação da F34 em coluna de fase reversa C ₁₈	81
Figura 24. Espectro de massas da fração bioativa F34 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	82
Figura 25. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F31 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST.	82
Figura 26. Atividade inibitória da toxina F34 sobre a proliferação da bactéria patogênica Gram-negativa <i>K. pneumoniae</i>	83
Figura 27. Efeitos da fração F34 sobre o potencial de ação de neurônios de gânglios dorsais de rato. Painel 1, cinco registros eletrofisiológicos de potenciais de ação obtidos em cinco condições experimentais: a) controle (ausência da fração F34); b) presença da fração F34, c) presença da fração F34 acompanhada de pulso de corrente hiperpolarizante d) presença da fração F34 após suprimir a administração de pulso de corrente hiperpolarizante; e) remoção da fração F34	

(lavagem). Pannel 2, potencial de ação gerado no início da estimulação é mostrado em maior detalhe. Nota-se a despolarização causada pela fração F34 (linha azul), e a diminuição na hiperpolarização comparada ao controle. Pannel 3, o potencial de repouso da membrana foi representada graficamente em função do tempo ao longo de todo o experimento. Note-se que a aplicação da fração F34 (indicado pela barra contínua) causou uma clara despolarização da membrana. A aplicação de um pulso de corrente hiperpolarizante (indicado pela linha a discontínua) restaurou o potencial de membrana para os seus valores de controle.	85
Figura 28. Perfil cromatográfico típico da purificação da F38 em coluna de fase reversa C ₁₈	88
Figura 29. Espectro de massas da fração bioativa F38 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	88
Figura 30. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F34 e F38.....	89
Figura 31. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F38 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST.	89
Figura 32. Perfil cromatográfico típico da purificação da F39 em coluna de fase reversa C ₁₈	90
Figura 33. Espectro de massas da fração bioativa F39 isolada da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i>	90
Figura 34. Atividade inibitória da toxina F39 sobre a proliferação da bactéria patogênica Gram-negativa <i>K. pneumoniae</i>	91
Figura 35. Atividade inibitória da toxina F39 sobre a proliferação da bactéria patogênica Gram-positiva <i>S.aureus</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura primária do peptídeo IsCT isolado da peçonha do escorpião <i>Opisthacanthus madagascariensis</i> e dos seus análogos produzidos por síntese química. Imagem modificada de Lee <i>et al.</i> , 2004.	25
Tabela 2. Sítios de ligação de neurotoxinas nos canais para sódio voltagem-dependentes.	31
Tabela 3. Exemplos de alfa-toxinas escorpiônicas.	33
Tabela 4. Exemplos de beta-toxinas escorpiônicas.	35
Tabela 5. Relação das massas moleculares dos componentes isolados da peçonha do escorpião <i>Centruroides margaritatus</i> detectados por MALDI-TOF MS com emprego de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico.	62
Tabela 6. Relação das massas moleculares dos componentes isolados da peçonha do escorpião <i>Centruroides margaritatus</i> detectados por MALDI-TOF MS com emprego de matriz de ácido sinapínico.	63
Tabela 7. Efeito inibitório sobre a proliferação de células cancerígenas após incubação com as diferentes frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha do escorpião <i>C. margaritatus</i> por RP-HPLC.	66
Tabela 8. Taxas de inibição do crescimento celular das bactérias Gram-negativas <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i> e da bactéria Gram-positiva <i>S. aureus</i> promovidas por frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta do escorpião <i>Centruroides margaritatus</i>	68
Tabela 9. Porcentagem de inibição celular promovida pela adição de 0,0055 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da fração Cm1.F1 em células tumorais (B16F10 e MCF-7) e células normais (NIH3T3) após 24 horas de tratamento.	70
Tabela 10. Porcentagem de inibição celular promovida pela adição de 0,0115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da fração F24 em células tumorais (B16F10 e MCF-7) e células normais (NIH3T3) após 24 horas de tratamento.	72
Tabela 11. Porcentagem de inibição celular promovida pela adição 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da fração F30 em células tumorais (B16F10 e MCF-7) e células normais (NIH3T3) analisados pelo teste do MTT após 24 horas de tratamento.	75

ABREVIATURAS

AS	Ácido sinapínico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATs	Ácidos teicóicos
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementar
Da	Daltons
DL ₅₀	Dose Letal 50% (dose capaz de inviabilizar 50% das células utilizadas)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Ganglios da raiz dorsal (Dorsal Root Ganglia)
HC ₅₀	Concentração Hemolítica 50% (dose capaz de lisar 50% dos eritrócitos presentes na suspensão empregada)
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
KTx	Toxinas ativas sobre canais para potássio
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI	Desorção e ionização a laser assistida por matriz (<i>Matrix assisted laser desorption and ionization</i>)
ME	Membrana Externa
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NaScTxS	Toxina escorpiônica ativa sobre canais para sódio
Na _v	Canais para sódio voltagem-dependentes
NO	Óxido de nitrogênio
OMV	Vesícula da membrana externa (<i>Outer Membrane Vesicle</i>)
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP	Fase Reversa (<i>Reversed-Phase</i>)
rpm	Revoluções por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Fator</i>)
TOF	Tempo de vôo (<i>Time of Flight</i>)
VGSCs	Canais para sódio voltagem-dependentes (<i>Voltage Gated Sodium Channels</i>)

RESUMO

Algumas toxinas isoladas da peçonha de escorpiões têm a capacidade de se ligar especificamente à superfície de células malignas, bactérias ou células excitáveis. Estes componentes, em alguns casos, têm se revelado capazes de inibir a progressão do câncer e da proliferação bacteriana, ou então de modificar a conformação de canais iônicos dependentes de voltagem presentes nas células excitáveis. Câncer, infecções microbianas e problemas neurológicos são objetos de preocupação em todo mundo, estimulando muitos cientistas a identificar e caracterizar novos agentes terapêuticos derivados de venenos e peçonhas animais. O objetivo do presente estudo foi realizar o isolamento e a caracterização preliminar de componentes citotóxicos, citolíticos e neurotóxicos presentes na peçonha do escorpião colombiano *Centruroides margaritatus*. Indivíduos adultos da espécie *C. margaritatus* foram coletados na Colômbia, na região do Vale do Patia. A peçonha, obtida por estimulação elétrica, foi liofilizada e armazenada a -20 °C, tendo sido, em seguida, fracionada por RP-HPLC em coluna C₈. Linhagens de fibroblastos murinos normais (NIH3T3) e de células cancerosas MCF-7 (humana) e B16F10 (murina) foram utilizadas para avaliar os efeitos citotóxicos das diferentes frações cromatográficas empregando-se teste colorimétrico (MTT). Tais frações também foram avaliadas quanto à sua capacidade em inibir a proliferação de bactérias patogênicas. As frações biologicamente ativas foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF e algumas frações, mais homogêneas, foram purificadas por meio de RP-HPLC em coluna C₁₈.

Um novo peptídeo neurotóxico e antimicrobiano foi isolado e parcialmente caracterizado. Tal peptídeo, denominado F34, foi capaz de inibir a proliferação da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 64 µM. Análises da sequência N-terminal da toxina F34 revelaram uma estreita relação estrutural com a toxina Cn11, uma toxina modificadora de canais para sódio previamente isolada da peçonha do escorpião *Centruroides noxius*. Como a toxina F34 apresenta similaridade com outras toxinas moduladoras de canais iônicos, foram avaliados os efeitos dessa toxina sobre o potencial de ação de neurônios do gânglio dorsal de ratos (DRG). A toxina F34 (200 nM) promoveu um aumento na excitabilidade neuronal, causando despolarização da membrana e

aumento na frequência de disparo de potenciais de ação. Durante a aplicação da toxina F34, injeções de pulsos hiperpolarizantes suficientes para repolarizar a membrana para os valores do potencial de repouso foram capazes de restaurar o comportamento normal de disparo dos potenciais de ação. Os efeitos da toxina F34 são reversíveis, assim como o disparo normal de potenciais de ação é recuperado após a retirada da toxina da preparação.

Concluindo, o presente estudo produziu avanços na área de Toxinologia, uma vez que permitiu a identificação e caracterização parcial de uma série de peptídeos biologicamente ativos (neurotóxicos, citotóxicos e citolíticos) presentes na peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus*, evidenciando a riqueza de componentes moleculares presentes nessa peçonha, bem como o potencial de tais toxinas como agentes terapêuticos.

ABSTRACT

Some toxins, isolated from scorpion venoms, have been reported to bind specifically to the surface of malignant cells, bacteria or excitable cells. These components have the ability to inhibit cancer and bacterial proliferation, or change the conformational arrangement of different subtypes of voltage-gated ion channels on excitable cells. Cancer, bacterial infections and neurological problems cause serious concerns around the world, and stimulate research and development of new therapeutic agents from animal poisons and venoms. The aim of the present study was to perform the isolation and preliminary characterization of neurotoxic, cytotoxic and cytolytic components presents in *Centruroides margaritatus* scorpion venom. Adult specimens of *C. margaritatus* were collected in Colombia, in the Patia Valley region. The venom, obtained by electrical stimulation, was lyophilized and stored at -20°C. Their components were purified using RP-HPLC in a C₈ column. Normal fibroblasts (NH3T3) and cancer cells lineages (MCF-7 and B16F10) were used to evaluate the cytotoxic effects of the different chromatographic fractions using a colorimetric assay (MTT). These fractions were also tested against pathogenic bacteria to evaluate their capacity to inhibit cellular proliferation. The biologically active fractions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and some fractions, which exhibited a more homogenous profile, were submitted to RP-HPLC using a C₁₈ column.

One new neurotoxic and antimicrobial peptide was purified and partially characterized. This peptide, named F34, was able to completely inhibit the proliferation of *K. pneumoniae* with a MIC of 64 µM. Since F34 shares a significant similarity to Cn11, a Na⁺-channel blocking toxin previously isolated from the venom of the scorpion *C. noxius*, in their N-terminal sequence, the effects of F34 on the action potential in DRG neurons was tested. Bath application of F34 (200 nM) depolarized the neuron and induced multiple action potential firing. Application of the toxin also reduced the after-hyperpolarization which may explain the repetitive firing. At present we do not know if the decreased after-hyperpolarization is a direct action of the toxin or a consequence of the depolarization. During application of F34, injection of hyperpolarizing current sufficient to repolarize the membrane to its control resting potential restored normal firing. The effects of F34 were reversible as normal firing returned after washout of F34 from the bath.

In conclusion, this study yielded advances in the Toxinology field, since it allowed the identification and partial characterization of a series of biologically active peptides (with neurotoxic, cytotoxic and cytolytic activities) present in the venom of the scorpion *Centruroides margaritatus*, showing the richness of molecular components present in this venom, and the potential of such toxins as therapeutic agents.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESCORPIÕES

Apesar do medo comum aos escorpiões, apenas 30 espécies das cerca de 1500 espécies de escorpião no mundo são potencialmente letais para os seres humanos (Prendini and Wheeler, 2005; Chippaux and Goyffon, 2008), com exceção de uma espécie da família Scorpionidae, todas as outras pertencem à família Buthidae, que inclui cerca de 80 gêneros, distribuídos no antigo e no novo mundo (Chippaux and Goyffon, 2008).

Os escorpiões pertencem ao filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones. As espécies de escorpiões atualmente descritas prevalecem em regiões de climas tropicais e sub-tropicais (Figura 1). Estes artrópodes têm hábitos furtivos e noturnos, ocultam-se embaixo de troncos, assim como, em fendas e buracos em zonas áridas ou úmidas. Também é comum encontrá-los nas proximidades de residências ou mesmo dentro delas (Barnes, 1995).

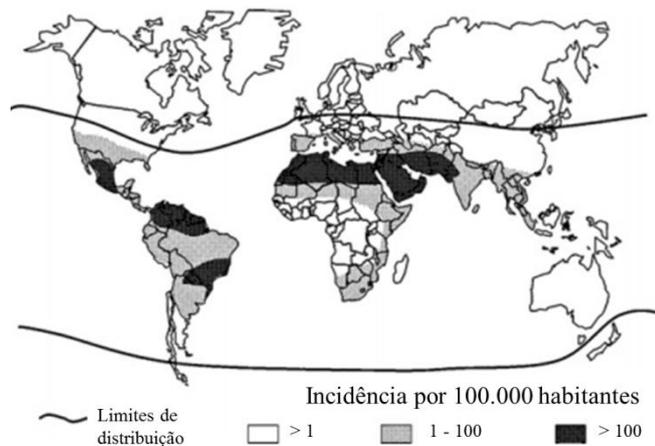


Figura 1. Áreas de incidência e escorpionismo no mundo. Imagem modificada de Chippaux and Goyffon (2008).

O corpo dos escorpiões está dividido em prossoma e opistossoma, sendo que este último subdivide-se em mesossoma e metassoma. A parte anterior do prossoma não apresenta divisões, neste local estão localizados dois olhos na linha mediana e até cinco olhos de cada lado. Existem seis pares de apêndices ligados a essa região: um par de quelíceras em forma de pinça, um par de palpos e quatro pares de pernas, que apresentam duas garras na extremidade.

O mesossoma é formado por sete segmentos e o metassoma por cinco, sendo encontrado na extremidade do metassoma um artículo denominado télson o qual contém um par de glândulas produtoras de peçonha, que desembocam no aguilhão ou ferrão. O orifício anal fica localizado entre o quinto segmento do metassoma e o télson (González-Sponga, 1996).

1.1.1. Toxinas escorpiônicas

As toxinas de invertebrados, principalmente quelicerados, têm suscitado interesse investigativo crescente, isso em virtude de seus efeitos nocivos ao homem. O estudo das peçonhas escorpiônicas teve seu marco na década de 50 quando foi descoberto que os agentes causadores das intoxicações eram componentes protéicos; esses componentes, chamados de neurotoxinas, foram isolados e caracterizados quimicamente de diferentes espécies de escorpiões com maior frequência a partir dos anos 60 (Zlotkin and Shulov, 1969). Atualmente, conhece-se com mais detalhes as características estruturais e funcionais de várias dessas toxinas, o que tem auxiliado enormemente no tratamento oferecido às vítimas de envenenamento, além de garantir importantes avanços nas pesquisas em biotecnologia e farmacologia (Bahloul *et al.*, 2011; Chippaux, 2012; Joseph and George, 2012). Mesmo que os efeitos do envenenamento possam ter uma reputação negativa frente à população, esses animais também são vistos, por muitos cientistas, como uma fonte rica de princípios farmacologicamente ativos e muitas de suas toxinas têm sido objeto de pesquisas visando o desenvolvimento de novas alternativas para o diagnóstico, tratamento e cura de várias doenças (Berger *et al.*, 2010).

De maneira geral, as peçonhas dos escorpiões são misturas complexas de origem apócrina (sintetizadas em glândulas exócrinas especiais) e caracterizadas por apresentarem componentes farmacologicamente ativos. Tais componentes podem apresentar toxicidade para um grande número de organismos, tais como mamíferos, insetos e crustáceos (Loret and Hammock, 2001; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2010; He *et al.*, 2013).

Entre os elementos identificados nas peçonhas escorpiônicas encontramos os peptídeos de cadeia longa, relacionados com a função dos canais para Na⁺ (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005; Chugunov *et al.*, 2013), e os de cadeia curta, que atuam principalmente sobre canais para K⁺ ou Cl⁻ (Lippens *et al.*, 1995a; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Rjeibi *et al.*, 2011; Bergeron and Bingham, 2012), mas a peçonha contém

também peptídeos sem pontes dissulfeto que exibem atividade variada, por exemplo: antimicrobiana, potenciadora de bradiquinina, hemolítica e moduladora do sistema imune (Zeng *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005) e peptídeos que modulam especificamente os canais para Ca^{2+} sensíveis a rianodina (Valdivia *et al.*, 1991; Valdivia *et al.*, 1992; Olamendi-Portugal *et al.*, 2002; Shahbazzadeh *et al.*, 2007), Assim como enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas e outros componentes ainda não identificados (Batista *et al.*, 2004b).

1.1.2. Escorpiões de interesse médico na Colômbia

Na Colômbia, já foram catalogadas cerca de 50 espécies de escorpiões, distribuídas em quatro famílias: Buthidae, com representantes de quatro gêneros: *Ananteris*, *Centruroides*, *Rhopalurus* e *Tityus*; Chactidae, também com quatro gêneros: *Brotheas*, *Broteochactas*, *Chactas* e *Teuthastes*; Diplocentridae representada apenas por um único gênero, *Tarsoporusus* e a família Liochelidae, com representantes de uma única espécie, *Opisthacanthus elatus* (Flórez, 2001; Flórez, 2007).

Os gêneros e espécies de interesse médico pertencem principalmente à família Buthidae. Tal família é bastante diversificada e apresenta uma ampla distribuição geográfica sobre o planeta. É a única família que contém espécies consideradas potencialmente perigosas para humanos. A família Buthidae encontra-se dividida em 73 gêneros, 6 subgêneros, 529 espécies e 165 subespécies. Nas Américas, são largamente encontrados representantes do gênero *Tityus*, o qual é bastante numeroso, com cerca de 130 espécies. Na Colômbia, são encontrados representantes de quatro gêneros da família Buthidae: *Ananteris* com quatro espécies, *Centruroides* com quatro espécies (*C. gracilis*, *C. danieli*, *C. edwardsiie* *C. margaritatus*) (de Armas *et al.*, 2012), *Rhopalurus* com uma espécie (*R. laticauda*) e *Tityus* com 29 espécies. Os representantes do gênero *Centruroides* são encontrados na costa Atlântica e nos vales interandinos, enquanto o gênero *Tityus* está distribuído em todo o território colombiano (Flórez, 2001; Guerrero-Vargas *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2004).

O vale do Patía encontra-se localizado no departamento do Cauca, na Colômbia, entre a cordilheira central e ocidental a 910 metros sob o nível do mar, com uma temperatura média de 23°C, e nele encontra-se um dos habitats com maior concentração no país da espécie de escorpião *C. margaritatus* (Buthidae) (Gervais, 1984) (Figura 2). O acidente escorpiônico

nesta zona é muito comum, mas o tratamento médico nem sempre é o mais adequado. Esta espécie de escorpião tem uma peçonha altamente tóxica para suas presas, assim como para os seres humanos. Já foram determinadas algumas características toxicológicas desta peçonha, entre as quais estão a DL_{50} (46,54 $\mu\text{g/g}$) determinada para camundongos, e os sintomas do envenenamento, que incluem sialoréia, piloereção, sudorese, sonolência, taquipnéia, ataxia e convulsões (Dueñas-Cuellar, 2009).



Figura 2. Espécime de *Centruroides margaritatus*. Indivíduo coletado no vale do Patía (fêmea adulta).

1.1.3. Estudos que envolvem a peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus*

Até o momento, existem poucos trabalhos descrevendo o isolamento e a caracterização de toxinas do escorpião *C. margaritatus* coletado em território Colombiano. O primeiro trabalho feito envolveu o fracionamento da peçonha mediante HPLC com o uso de coluna de filtração em gel Protein Pack, obtendo-se nove frações cromatográficas (Guerrero-Vargas *et al.*, 2003). Estes dados coincidem com os relatados por Escobar e colaboradores (2003), os quais separaram as proteínas da peçonha de *C. margaritatus* por cromatografia de troca catiônica em CM-Sephadex C-25 a partir de exemplares adultos capturados no norte do Peru, obtendo um perfil cromatográfico que indicou a presença de nove picos e detectou a ausência de atividade fosfolipásica e proteolítica na peçonha bruta e nas frações isoladas.

Já em 2008, foi realizado o fracionamento cromatográfico da peçonha do escorpião *C. margaritatus* por RP-HPLC em coluna C_8 , onde se obtiveram um total de 43 frações que foram analisados por MALDI-TOF/MS, sendo identificados 91 compostos com massas

moleculares distintas, sendo 54% destes dentro da faixa de massa molecular entre 2,5 e 6 kDa, 13% entre 6,5 e 8 kDa e 33% são peptídeos menores que 2 kDa. Neste mesmo estudo peptidômico foi possível o isolamento e a caracterização química de dois novos peptídeos, denominados Margatoxina 2 (MgTx2), com 24 resíduos de aminoácidos (MM = 2,6 kDa) e três pontes dissulfeto, e a Margatoxina 3 (MgTx3) com 30 resíduos de aminoácidos (MM = 3,38 kDa) e três pontes dissulfeto (Guerrero-Vargas, 2008).

Em 2009, a fim de se compreender melhor as consequências dos acidentes escorpiônicos em humanos, foi feita a avaliação citotóxica e genotóxica da peçonha bruta de *C. margaritatus* pelo teste de micronúcleos *in-vivo* (biomarcador de efeito) (Fenech *et al.*, 1999). Os resultados evidenciaram uma alta citotoxicidade nas doses administradas, determinada pela diminuição no número de células avaliadas com respeito ao controle (Dueñas-Cuellar, 2009).

Existem poucos estudos sobre atividades biológicas de componentes isolados da peçonha de *C. margaritatus*. Entre os principais trabalhos disponíveis na literatura encontra-se o que descreve a margatoxina (MgTx), um peptídeo com 39 resíduos de aminoácidos, cuja principal característica é a capacidade para inativar canal para potássio (Garcia-Calvo *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Knaus *et al.*, 1995; Erdogan *et al.*, 2005). Em outro artigo, Rivera e colaboradores (2010) isolaram e caracterizaram um peptídeo bacteriostático (7,3 kDa) presente na peçonha de *C. margaritatus*, com ação sobre as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, e *Serratia marcescens*.

As peçonhas e os venenos animais têm evoluído juntamente com os mecanismos de defesa apresentados pelos seus inimigos e presas de forma rápida e eficiente, proporcionando tanto defesa contra predadores como maior capacidade na captura das presas, o que resultou em um grande repertório de moléculas que se ligam a alvos específicos. Tais materiais biológicos representam uma das mais promissoras fontes naturais de compostos bioativos atualmente disponíveis. A possibilidade de utilização em processos biotecnológicos destas toxinas tem suscitado bastante interesse em pesquisadores vinculados às universidades e também em diversos setores da indústria farmacêutica, principalmente em abordagens voltadas para a bioprospecção de novos componentes com características terapêuticas para diversas doenças.

1.2. CÂNCER

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer em 2008 e que 84 milhões de pessoas morrerão na década seguinte se não forem adotadas medidas de controle. Mais de 70% das mortes por câncer em 2005 ocorreram em países de baixa e média renda e, de acordo com um relatório do *Institute of Medicine* (IOM) dos Estados Unidos, a incidência do câncer está crescendo em muitos países pobres (Frank *et al.*, 2007; Coughlin and Ekwueme, 2009).

Entre os diferentes tipos de câncer, o câncer de mama é o tipo de maior incidência entre as mulheres. Mundialmente, estima-se que mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama a cada ano, sendo que mais de 410.000 morrerão da doença, representando 14% das mortes por câncer do sexo feminino anual (Parkin *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, a taxa de incidência do câncer de mama tem se mantido estável desde 2005 até hoje, enquanto as taxas de outros tipos de câncer vêm diminuindo (Siegel *et al.*, 2013).

Por outro lado, o melanoma maligno de pele é responsável por 160.000 novos casos de câncer anualmente, com maior ocorrência em mulheres que em homens. É um tumor bastante comum em populações brancas que vivem em climas quentes. As maiores taxas de incidência são encontradas na Austrália/Nova Zelândia, América do Norte e no norte da Europa. A sobrevivência em pacientes acometidos por melanoma é muito favorável em regiões desenvolvidas (91% nos registros dos EUA e 81% na Europa) e é documentado que as mulheres têm melhores probabilidades de sobrevivência do que os homens, mas na estatística apresentada em 2013 pela Sociedade Americana do Câncer, (*American Cancer Society*), a incidência deste tipo de câncer aumenta a cada dia entre homens e mulheres (Siegel *et al.*, 2013). A sobrevivência nos países em desenvolvimento é menor (cerca de 40%), em parte devido ao diagnóstico tardio e também pelo pouco acesso à terapia (Parkin *et al.*, 2005).

Por definição o câncer é o resultado de lesões genéticas que dão origem a um fenótipo alterado numa célula afetada. Depois de superar o crescimento normal e controles reguladores de morte, uma célula cancerosa pode continuar a evoluir, adquirindo mutações adicionais para sustentar a sua sobrevivência em meio das muitas tentativas do organismo hospedeiro para combater seus efeitos deletérios e restabelecer a ordem no tecido afetado (Holcik, 2005). O

termo câncer se define também como um grupo de doenças que são caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais e uma vez que a propagação não é controlada, uma série de eventos desfavoráveis para o organismo pode advir resultando, em muitos casos, em morte. O câncer é causado por fatores externos (organismos infecciosos, agentes químicos e radiações) e fatores internos (mutações herdadas e espontâneas, hormônios, fatores epigenético e condições imunológicas, entre outros). Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese (Jemal *et al.*, 2010).

A carcinogênese é um processo que ocorre em várias etapas. A patogênese do câncer envolve muitos eventos individuais, como: a ativação do metabolismo (biotransformação) de uma substância química para um composto pró-carcinogênico que seja reativo com o DNA (no caso de compostos cancerígenos indiretamente genotóxicos), a ligação covalente ao DNA, a indução de mutações hereditárias, a expressão fenotípica das mutações, resultando na alteração da função celular, transformação celular e crescimento neoplásico e, finalmente, a disseminação das células transformadas para outras partes do corpo (Choudhuri *et al.*, 2007). Estes eventos na patogênese do câncer foram resumidos em três etapas distintas que são: iniciação, promoção e progressão. A iniciação do tumor envolve a introdução de alterações genéticas hereditárias em uma célula normal; a promoção do tumor envolve a expansão clonal da célula iniciada resultando na formação de um tumor benigno; e a progressão do tumor envolve a conversão de um tumor benigno para um maligno (Foulds, 1954), (Figura 3).

Outra forma do câncer se desenvolver é através da ocorrência de eventos epigenéticos, sendo tais fatores cada vez mais estudados, pois existem evidências crescentes de que estes tipos de anormalidades adquiridas podem participar na desregulação na função do gene e alterar os padrões de expressão gênica. A epigenética é definida como o conjunto de alterações hereditárias na expressão de genes que não são acompanhadas por alterações na sequência de DNA, além disso, os processos de silenciamento epigenéticos podem ser hereditários, por tanto, podem desempenhar as mesmas funções e sofrer os mesmos processos seletivos que as alterações genéticas no desenvolvimento de um câncer. As anormalidades epigenéticas em câncer compreendem uma multiplicidade de aberrações em praticamente todos os componentes da cromatina envolvidos no empacotamento do genoma humano (Jones and Baylin, 2007). Nas células animais, o DNA pode ser modificado por metilação dos

resíduos de citosina nos dinucleotídeos CpG e as caudas N-terminais das proteínas histonas estão sujeitas a uma grande variedade de diferentes modificações, incluindo acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. Todas estas mudanças químicas parecem ter uma influência substancial na estrutura da cromatina e na função do gene, o qual difere de acordo com o tipo e localização da modificação (Cedar and Bergman, 2009). Padrões de metilação do DNA são frequentemente associados ao silenciamento de genes supressores de tumores. BRCA1, por exemplo, é um gene de susceptibilidade para câncer de mama e ovário. Como é um gene supressor de tumor envolvido na manutenção da integridade do genoma, a hipermetilação de BRCA1 tem um papel determinante no silenciamento da sua função supressora de tumor e, possivelmente na tumorigênese (Catteau and Morris, 2002).

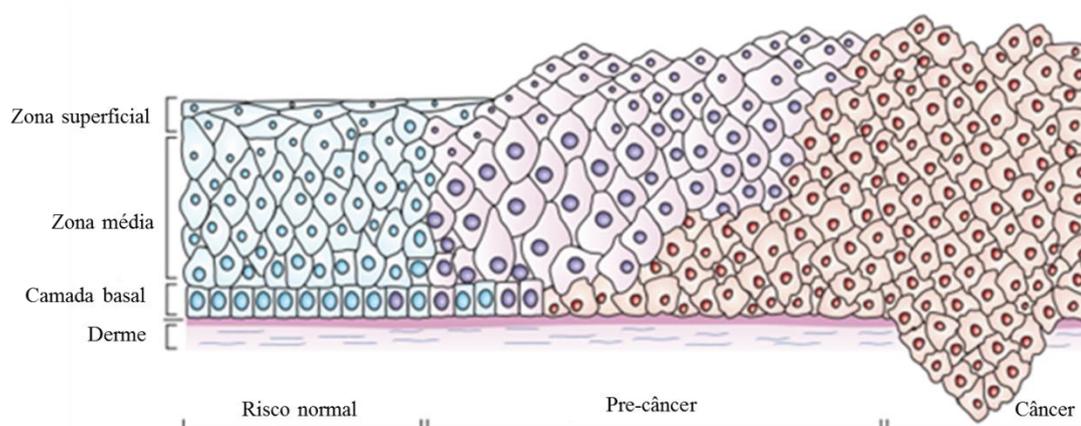


Figura 3. Anormalidade histopatológica do epitélio de órgãos durante um processo carcinogênico. O tecido é caracterizado por mudanças no tamanho e na forma dos núcleos celulares, além de ocorrer um aumento no número de células em virtude da mitose celular desregulada. Na maioria dos tecidos epiteliais, quando as mutações são acumuladas (progressão genética), existe perda das funções de controle celular e isto é observado nas mudanças precoces do fenótipo histológico normal do tecido (displasia ou pré-câncer), enquanto nos casos mais graves, o câncer vai mudando de superficial até finalmente tornar-se invasivo. Tais mudanças podem ser observadas na membrana basal. Imagem modificada de Kelloff and Sigman (2007).

1.2.1. Apoptose

A apoptose é um processo normal, é uma forma de morte celular distinta da necrose que ocorre através da ativação de um programa de suicídio celular intrínseco que pode ser realizado por meio de sinalização interna, bem como por sinais externos (Tapia-Vieyra and Mas-Oliva, 2001). É um mecanismo que tem como finalidade a destruição das células com dano exagerado no material genético e depende tanto de proteínas pré-existentes como da síntese *de novo* de algumas delas (Williams and Smith, 1993; Steller, 1995). A apoptose é

caracterizada morfológicamente pelo encolhimento celular, condensação e marginação da cromatina, enrugamento da membrana plasmática e conformação de corpos apoptóticos (Häcker, 2000; Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).

Os defeitos no processo normal da apoptose desempenham papéis importantes na patogênese do tumor, permitindo às células neoplásicas, bem como às células geneticamente instáveis sobreviver (Fleischer *et al.*, 2006).

A resposta celular a danos no DNA constitui um dos campos mais importantes na biologia do câncer. Primeiro, o dano ao DNA celular pode causar câncer, isso é comprovado por diferentes estudos epidemiológicos, a partir de modelos animais e da observação de muitas síndromes de susceptibilidade humana ao câncer. Em segundo lugar, o dano ao DNA é usado para curar o câncer, a maioria das modalidades terapêuticas que são usadas atualmente para o tratamento de neoplasias tem como alvo o DNA, incluindo a terapia de radiação e muitos agentes quimio-terapêuticos. Em terceiro lugar, o dano ao DNA é responsável pela maioria dos efeitos adversos da terapia. A supressão da medula óssea, toxicidade gastrointestinal e perda dos cabelos são imputáveis à indução de dano ao DNA e morte celular das células progenitoras nestes tecidos (Kastan and Bartek, 2004).

A maioria dos agentes anticancerígenos não tem sido concebidos para um alvo celular ou molecular específico, mas, têm sido identificados como agentes apoptóticos em ensaios baseados na sua capacidade para inibir a proliferação e clonagem de linhas celulares tumorais (Hannun, 1997; Debatin, 2000). Os processos efetores responsáveis pela apoptose envolvem a ativação de caspases e membros da família BCL2 em resposta a uma vasta variedade de sinais fisiológicos (Wyllie, 2010).

A morte celular programada é levada a finalidade pelas caspases, que são um grupo de cisteíno-aspártico proteases. Este processo leva as células para uma de duas vias distintas, mas convergentes: a) via “receptor de morte” (*death receptor pathway*) e b) via mitocondrial. Os fatores que determinam qual via de morte será ativada incluem características como a fase do ciclo celular, o tipo e magnitude do estímulo apoptótico, e, para as células imunitárias, a fase de ativação celular (Hotchkiss *et al.*, 2009).

A via do receptor de morte é ativada quando os membros do fator de necrose tumoral (superfamília TNF) se ligam aos receptores de morte da superfície celular (receptores-TNF). A ligação destes receptores inicia a formação do complexo multiprotéico de sinalização indutor de morte. A agregação do complexo faz com que as alterações conformacionais nos seus componentes desencadeiem a atividade catalítica da caspase 8, um mediador importante da apoptose. Já na via mitocondrial é a caspase 9 quem regula o processo, após os sensores intracelulares indicarem o dano celular extremo. O processo todo inclui o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares, danos ao DNA, resposta à proteínas desdobradas e a insuficiência de fatores de crescimento. Estes iniciadores levam a um aumento da permeabilidade mitocondrial, promovendo, assim, a liberação de proteínas pró-apoptóticas, por exemplo, o citocromo c, a partir do espaço da membrana intermitocondrial para o citosol. A partir daí se mobilizam as caspases 3, 6 e 7 e as proteases que levam à destruição da célula pela clivagem de várias proteínas e pela ativação de DNAses (Gupta, 2001; Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002; Gupta, 2003).

Finalmente, os macrófagos reconhecem os fragmentos de células apoptóticas por meio de sua expressão de fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática, e as células são fagocitadas (Savill *et al.*, 1993).

1.2.2. As toxinas escorpiônicas e o câncer

A terapia anti-câncer é uma das principais áreas para o uso de proteínas e peptídeos originários de animais. Algumas destas toxinas, quando purificadas, podem se ligar especificamente nas membranas de células cancerígenas, afetando a migração e a proliferação dessas células (Heinen and da Veiga, 2011). Alguns peptídeos também podem se ligar a alvos específicos nas membranas das células cancerosas, como é o caso da clorotoxina da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* que se liga a metaloproteinase 2 (Deshane *et al.*, 2003).

Estudos envolvendo os mecanismos pelos quais tais toxinas agem são muito recentes e ainda há muito a ser descoberto sobre essas moléculas. Os primeiros ensaios clínicos contra o câncer utilizando peptídeos sintéticos derivados de peçonhas e venenos animais estão começando a mostrar resultados positivos. Considerando a riqueza das peçonhas de escorpiões, o emprego de toxinas escorpiônicas no combate ao câncer é uma abordagem

promissora, uma vez que têm sido demonstrados efeitos tóxicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sobre as células cancerosas nas fases I e II de ensaios clínicos. (Heinen and da Veiga, 2011).

A seguir serão apresentadas algumas das toxinas escorpiônicas com atividade tumoricida identificadas até o momento.

1.2.2.1. Clorotoxina (Cltx) (de *Leiurus quinquestriatus*)

Um dos princípios ativos mais notáveis encontrado na peçonha de escorpiões é a *Clorotoxina*, um peptídeo isolado da espécie *Leiurus quinquestriatus*. A Cltx tem 36 resíduos de aminoácidos (Figura 4) e quatro pontes dissulfeto: 2Cys-19Cys, 5Cys-28Cys, 16Cys-33Cys, e 20Cys-35Cys (Lippens *et al.*, 1995b).

Esta toxina inibe o influxo de cloreto na membrana das células, ligando-se apenas às células de glioma e apresentando pouca ou nenhuma atividade em células normais. A clorotoxina parece se ligar à metaloproteinase 2 (MMP-2), uma enzima da matriz extracelular com atividade gelatinase. A MMP-2 é uma proteinase envolvida na invasão tumoral, sendo especificamente superexpressa em gliomas e cânceres relacionados, mas não em células normais do cérebro. A Cltx se liga eficazmente na MMP-2 e tal interação leva à perda da atividade gelatinase por parte da MMP-2, alterações nas correntes dos canais para cloreto e interiorização desses canais (Deshane *et al.*, 2003; Veiseh *et al.*, 2007).

Existe uma versão sintética desse peptídeo (TM601) acoplado ao iodo 131 (¹³¹I-TM601) desenvolvido para direcionar a radiação até as células tumorais. Os estudos pré-clínicos e clínicos de fase I foram concluídos em pacientes com glioma recorrente. Esses estudos demonstraram que a dose intracavitária utilizada de ¹³¹I-TM601 é segura, com toxicidade mínima e com interação específica e eficaz aos gliomas malignos (Mamelak and Jacoby, 2007). A fase II dos ensaios clínicos empregando doses maiores de radioatividade e administração locais de doses repetidas já foi realizada (Heinen and da Veiga, 2011), e no decorrer de vários outros estudos, a Clorotoxina, com o nome comercial de ¹³¹I-TM601, foi designada como medicamento órfão para o tratamento de gliomas malignos e melanomas pela FDA, Associação Americana de Drogas e Alimentos, e é cada vez mais estudada e utilizada, em esta e outras apresentações, para o tratamento dessas doenças *in vivo* e *in vitro* (Fu *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013; Zang *et al.*, 2013).

Figura 4. Estrutura primária da Clorotoxina isolada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*. Imagem retirada de Lippens et al., (1995).

1.2.2.2. BmKCT (de *Buthus martensii* Karsch)

Mesobuthus martensii Karsch (*Buthus martensii* Karsch) é uma espécie de escorpião que tem uma ampla distribuição, sendo encontrado do norte do rio Yangtze na China, na Mongólia até a península Coreana. Na sua peçonha foi identificada uma sequência peptídica, com similaridade com a clorotoxina, a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha (Wu *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2000). Aproximadamente 68% dos seus aminoácidos têm sequência idêntica à Cltx. Resultados experimentais anteriores demonstraram que a peçonha bruta de *B. martensii* induz apoptose em células de glioma (Wang and Ji, 2005) e outras pesquisas confirmaram que a toxina similar à Cltx (BmKCT) se liga especificamente às células de glioma inibindo o seu crescimento, proliferação e metástases, sem afetar as células normais de forma significativa (Fu *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2010).

Interessantemente, a peçonha de *B. martensii* apresenta efeitos em outras linhagens celulares de câncer. Muitos autores têm mostrado os efeitos anti-proliferativos dessa peçonha sobre células de linfoma humano e carcinoma de Ehrlich (Liu *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2008).

1.2.2.3. Bengalina (de *Heterometrus bengalensis* Koch)

Em 2007, a peçonha do escorpião *Heterometrus bengalensis* Koch foi estudada para avaliar suas características citotóxicas sobre células de leucemia humana e os resultados demonstraram que a peçonha bruta deste escorpião inibe a proliferação das linhagens U937 (linfoma histiocítico) e K562 (leucemia mielóide crônica) com valores de IC₅₀ iguais a 41,5 µg/mL para células U937 e 88,3 µg/mL para K562. A peçonha desse escorpião induz apoptose nestas células quando comparado com células tratadas normais ou não-cancerígenas (Das Gupta *et al.*, 2007). Dois anos depois, uma proteína chamada Bengalina foi isolada da peçonha do escorpião indiano *H. bengalensis* Koch. A Bengalina induz apoptose pela via mitocondrial em células da linhagem U937 e da linhagem K562, não afetando linfócitos humanos normais. As células tratadas apresentaram uma interrupção no ciclo celular na etapa

G1, com fragmentação do DNA, diminuição da atividade da telomerase e danos ao nível nuclear. Molecularmente, verificou-se diminuição na expressão de proteínas de choque térmico 70 e 90, perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c no citosol e ativação das caspases 9 e 3. A sequência N-terminal da proteína não apresentou nenhuma similaridade com qualquer proteína incluída nas bases de dados para toxinas de escorpião, representando então mais um novo composto com potencial ação anti-tumoral contra células leucêmicas (Gupta *et al.*, 2010).

1.2.2.4. Neopladina1 e 2 (de *Tityus discrepans*)

Neopladinas 1 e 2, são peptídeos isolados da espécie *Tityus discrepans*. Atuam sobre células SKBR3 de câncer de mama humano e discretamente sobre a linhagem celular não-maligna MA104 de rim de macaco. Induzem fragmentação nuclear, perda de confluência celular e apoptose em células SKBR3 através da via de ativação de sinalização Fas (proteína transmembrânica tipo II) pela indução da expressão de FasL na faixa de $\pm 33 \mu\text{M}$. A massa molecular da Neopladina 1 é igual a 29.918 Da e 30.388 Da para Neopladina 2 (D'Suze *et al.*, 2010)

1.2.2.5. AaCtx (de *Androctonus australis*)

A AaCtx é o primeiro peptídeo do tipo “Clorotoxina-like” isolado da peçonha do escorpião *Androctonus australis*. Sua sequência de aminoácidos tem similaridade de 70% com a Clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus*, diferindo em doze aminoácidos. O peptídeo sintético da AaCtx, assim como sua forma natural, foram impediram a invasão e migração de células de glioma humano. No entanto, a sua atividade foi menor do que a apresentada pela Clorotoxina. O modelo molecular proposto para a AaCtx apresenta a maioria dos aminoácidos distintos entre as duas toxinas localizados na porção N-terminal da α -hélice (Rjeibi *et al.*, 2011).

1.2.2.6. Mauriporina (de *Androctonus mauritanicus*)

Este peptídeo foi identificado a partir de biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *Androctonus mauritanicus*. A Mauriporina é composta por 48 resíduos de aminoácidos (5.398,1 Da), com carga catiônica e estrutura em α -hélice. Tal peptídeo foi

isolado da peçonha do escorpião por meio de técnicas cromatográficas, o peptídeo sintético da Mauriporina exibe atividade contra linhas celulares de câncer de próstata e se mostrou seletivamente citotóxico, uma vez que não mostrou-se ativo frente às células não-tumorais. A Mauriporina não induz morte celular por meio de uma via apoptótica, mas possivelmente por meio da indução de necrose. A Mauriporina também não apresentou atividade hemolítica significativa contra eritrócitos de sangue de ovelha (Almaaytah *et al.*, 2013).

1.2.2.7. Atividade anti-tumoral de peçonhas brutas escorpiônicas

Odontobuthus doriae é um escorpião da província de Teerã, no Irã e sua peçonha foi testada sobre células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, tendo como resultado a agregação, inchaço, ruptura da membrana e liberação de conteúdo citoplasmático. O teste de viabilidade celular com emprego do MTT mostrou uma diminuição da viabilidade celular de uma forma dependente da dose, da mesma forma que os níveis de nitrito (produção de NO) no sobrenadante (Zargan *et al.*, 2011b).

Outros casos de estudos com a peçonha bruta de escorpiões que apresentaram citotoxicidade são os feitos com *Buthus martensii* Karch contra células de glioma humano U251-MG, inibindo eficazmente o crescimento do tumor *in vivo* (Wang and Ji, 2005) e o realizado com a peçonha de *Androctonus crassicauda* que provoca supressão da proliferação ao prender as células na fase S e levar à indução de apoptose por meio do aumento na produção de óxido nítrico, ativação da caspase-3 e despolarização da membrana mitocondrial. O valor da IC₅₀ para a linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y humano foi calculada como 207,7 µg/mL e para a linhagem celular de câncer da mama MCF-7 como 269 µg/mL (Zargan *et al.*, 2011a).

1.3. DOENÇAS INFECCIOSAS

Grandes mudanças estão ocorrendo no campo da pesquisa em saúde. As perspectivas científicas e tecnológicas para a intervenção nas doenças infecciosas e parasitárias nunca foram tão promissoras. É amplamente reconhecido que os peptídeos antimicrobianos podem desempenhar um papel importante no controle de infecções por microorganismos multirresistentes (Rotem and Mor, 2009). A descoberta e desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos são processos críticos, assim como o melhoramento da eficácia dos compostos anti-infecciosos atualmente empregados (Finch and Hunter, 2006).

As infecções bacterianas têm um grande impacto na saúde pública (Giuliani *et al.*, 2007). As doenças causadas por patógenos podem ocorrer em qualquer local do corpo como resposta do organismo à sua presença. Estas podem ser transmitidas aos seres humanos através do ar, água, alimentos, ou vetores vivos, razão pela qual as medidas preventivas têm um impacto dramático sobre a morbidade e mortalidade. A sobrevivência desses organismos num ambiente favorável depende de uma rede de mecanismos de defesa do hospedeiro que envolve vários processos (Bals, 2000). Na invasão patogênica, a primeira linha de defesa contra os insultos patogênicos é chamada de sistema imunitário inato, que é seguida pela resposta da imunidade adquirida que se encontra associada com a ativação de células T e B que são dirigidas contra antígenos específicos (Medzhitov and Janeway, 1997).

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra a colonização e infecção bacteriana e tem uma função crítica nos estágios iniciais da infecção. A imunidade inata envolve fatores que impedem a adesão bacteriana nas membranas mucosas limitando a multiplicação bacteriana e direcionando o reconhecimento específico de moléculas bacterianas por células do sistema imunológico, a fim de eliminar os microrganismos invasores e, se for necessário, ativar a resposta imune adaptativa (Janeway Jr and Medzhitov, 2002).

Os patógenos bacterianos utilizam estratégias muito eficientes para driblar o sistema de defesa do hospedeiro a fim de invadir e colonizar diferentes tecidos (Hornef *et al.*, 2002). Entre esses mecanismos, a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos que atrai maior preocupação (Cohen, 1992). A resistência bacteriana aos antibióticos é causada pela rápida

evolução do genoma bacteriano sob pressão seletiva de antibióticos e do ambiente (Kolár *et al.*, 2001)

Os peptídeos endógenos, que são expressos constitutivamente ou, algumas vezes induzidos, fornecem um meio rápido e eficaz de defesa contra o patógeno. Este grupo de moléculas denominado "Peptídeos Antimicrobianos" (PAMs) é representado por polipeptídeos codificados geneticamente e sintetizados pela via ribossomal (Li *et al.*, 2012). Constituem um mecanismo imunológico de defesa primitivo encontrado numa ampla gama de organismos procariontes (p. ex: bacteriocinas) (Hassan *et al.*, 2012) e eucariontes, desde os seres humanos até plantas e insetos (Lehrer and Ganz, 1999). Os PAMs são obtidos das mais diversas fontes e apresentam atividade de amplo espectro contra uma vasta gama de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, leveduras, fungos, além de vírus. Estes peptídeos são mobilizados logo após a infecção e agem rapidamente para neutralizar os microrganismos. Os PAMs compartilham várias propriedades como, por exemplo, massa molecular inferior a 10 kDa, carga líquida positiva e a presença de grande número de resíduos hidrofóbicos em suas estruturas (Zasloff, 2002).

Os PAMs descobertos até agora têm sido divididos em vários grupos com base na extensão de suas cadeias polipeptídicas, estrutura secundária e terciária e presença ou ausência de pontes dissulfeto. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), que auxilia na classificação deste tipo de peptídeos, uma vez que permite a determinação de suas estruturas tridimensionais em solução (Wuthrich, 1986). Tendo como base suas características estruturais, os PAMs têm sido divididos em cinco grandes grupos, a saber: 1) peptídeos que formam estruturas em α -hélice; 2) peptídeos ricos em cisteínas; 3) peptídeos que formam folha- β ; 4) peptídeos ricos em aminoácidos regulares (histidina, arginina e prolina) e 5) peptídeos compostos por aminoácidos raros e/ou modificados (Boman, 1995; Bals, 2000).

1.3.1. Resistência bacteriana

Um dos principais objetivos das pesquisas na procura por novos agentes antimicrobianos é combater os mecanismos de resistência das bactérias às drogas conhecidas e comercializadas atualmente. A incidência clínica de microrganismos resistentes a medicamentos aumentou dramaticamente nas últimas décadas, levando a centenas de milhares de internações e dezenas de milhares de mortes por ano só nos Estados Unidos (Klein *et al.*,

2007; Pittet *et al.*, 2008; Arias and Murray, 2009). O entendimento dos mecanismos relacionados ao fenômeno de resistência a drogas é uma questão essencial na busca por novas alternativas terapêuticas (Andreu and Rivas, 1998). Bactérias podem apresentar diferentes mecanismos bioquímicos que conferem resistência para peptídeos antimicrobianos, por exemplo:

- 1. Inativação por meio de incubação:** através do soro e os seus componentes têm sido descritos processos de inibição de diferentes peptídeos antimicrobianos. Ex: inibição das defensas pela albumina de soro bovino (Daher *et al.*, 1986).
- 2. Inativação por barreiras de oligossacarídeos:** Antes de atingir os seus alvos finais, os peptídeos antimicrobianos devem atravessar barreiras tais como a camada de peptidoglicano em bactérias; a matriz extracelular em células eucarióticas ou oligossacarídeos aniônicos ligados a diferentes componentes de membrana. Estes componentes da matriz extracelular podem inibir a atividade dos peptídeos, o que proporciona uma resistência parcial na bactéria. Ex: A heparina, um dos principais componentes da matriz extracelular, inibe a atividade de permeabilização da membrana celular promovida pela cecropina (Daher *et al.*, 1986)
- 3. Inativação pela membrana externa bacteriana:** Nas bactérias Gram-negativas, os principais componentes da membrana exterior são os lipopolissacarídeos (LPS). Qualquer peptídeo ativo que não é reconhecido pelos transportadores de peptídeos próprios da membrana deve atravessá-la por autopromoção. Como o reconhecimento de peptídeo pelos LPS ocorre principalmente por interação eletrostática, um tipo de inativação de membrana externa pode ser originado por qualquer ausência de LPS ou por diminuição da carga global negativa, como resultado da esterificação de grupos fosfato. Ex: bactérias naturalmente resistentes como *Proteus* (Sidorczyk *et al.*, 1983).
- 4. Inativação por proteólise do peptídeo:** O elevado teor em resíduos básicos favorece a degradação por proteases semelhantes à tripsina. Ex: enzimas que degradam especificamente cecropinas são produzidas por agentes patogênicos, como *Bacillus larvae* em abelhas (Jarosz and Gliński, 1990).

5. Resistência por componentes da membrana plasmática: Vários elementos de membrana, tanto passivos quanto ativos, têm sido descritos como contribuintes para a resistência como, por exemplo, a composição lipídica; o potencial de Membrana; a redução de pontes dissulfeto; o sistema de entrada e saída de peptídeos (Andreu and Rivas, 1998).

1.3.2. Características das membranas bacterianas

Além de proporcionar à célula uma barreira protetora e funcional (quanto à permeabilidade), as membranas e paredes celulares conferem especificidade à superfície, uma propriedade de considerável importância na determinação da resposta da célula ao seu ambiente. Pode, assim, desempenhar um papel nos processos como a adesão celular, o reconhecimento celular, perda de inibição de contato e diferenciação em sistemas celulares animais. Para sobreviver, as bactérias apresentam um envelope celular sofisticado e complexo que as protege, mas também permite a passagem seletiva de nutrientes a partir do exterior e resíduos de produtos do interior. Nas bactérias, a especificidade da superfície celular atrai muita atenção por causa da sua utilidade no diagnóstico de diferentes cepas de organismos patogênicos (Silhavy et al., 2010).

Existe uma marcada diferença entre a parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, o que confere também diversidade na interação com o ambiente e sua reação ante ele (Figura 5).

1.3.2.1. Parede celular de bactérias Gram-negativas

Força, resistência e elasticidade são as características que tem fornecido às bactérias o seu sucesso evolutivo ao longo do tempo. As bactérias Gram-negativas têm uma membrana exterior (ME) que possui proteínas, fosfolípidios e lipopolissacarídeos (LPS). Como as bactérias dependem de processos de difusão para a nutrição e a disseminação de resíduos, a membrana externa deve ser porosa para certas substâncias, mas capaz de manter um equilíbrio no transporte das mesmas, tendo como finalidade proteger as camadas mais internas (Plesiat and Nikaido, 1992).

Uma das características mais importantes da membrana externa é a distribuição assimétrica de lipídeos nas suas faces externa e interna. A face externa contém (praticamente) todos os LPSs, enquanto que a face interior apresenta mais fosfolipídios. Os LPSs contêm mais carga por unidade de área de superfície do que qualquer fosfolipídio, por tanto a face externa da membrana externa é altamente carregada negativamente sendo capaz de interagir facilmente com cátions do meio circundante (Fortin *et al.*, 1997).

Logo após a membrana externa vem a matriz intermediária chamada de periplasma, uma região que está em fluxo dinâmico, possui uma variedade de macromoléculas que mudam constantemente, refletindo o estado metabólico da célula e a sua interação ambiental (Beveridge, 1999). Inserida nela encontra-se uma fina camada de peptidoglicano, cujas funções principais são manter a forma da célula e contrapor a elevada pressão osmótica do protoplasto bacteriano. Sem peptidoglicano ou quando a integridade dele fica comprometida, as bactérias sofrem lise osmótica de imediato. Por esta razão, o peptidoglicano é um alvo bem conhecido para quase todos os antibióticos clinicamente úteis que inibem a síntese da parede celular bacteriana. O peptidoglicano também regula a difusão de moléculas na célula, participa na regulação da divisão celular e constitui uma estrutura de ancoragem da parede celular para o ácido teicóico, proteínas e polissacáridos, que estão ligados covalentemente ao peptidoglicano. As bactérias também podem libertar fragmentos de peptidoglicano, que funcionariam como sinais de comunicação célula-célula (Cloud-Hansen *et al.*, 2006; Royet and Dziarski, 2007).

Outra característica única das bactérias Gram-negativas é a produção de vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles*, OMVs), que são pequenas estruturas esféricas de 20-250 nm de diâmetro produzidas quando pequenas porções de ME se prolongam pra fora da célula e são liberadas. As OMVs segregadas podem se disseminar para longe da célula e tendo papel na patogênese, sinalização, a aquisição de nutrientes, e também na transferência horizontal de genes (Beveridge, 1999; Kulp and Kuehn, 2010). Por ultimo encontra-se a membrana interna que é composta por uma bicamada simétrica de fosfolipídios, em contraste com a membrana externa bacteriana que é assimétrica (Facey and Kuhn, 2010).

1.3.2.2. Parede celular de bactérias Gram-positivas

As bactérias Gram-positivas não possuem a estrutura da membrana externa, mas a camada de peptidoglicano, a qual contém uma série de polímeros aniônicos ligados covalentemente, é muito mais espessa do que a apresentada pelas bactérias Gram-negativas. Devido à ausência da barreira de permeabilidade da membrana externa, o envelope de bactérias Gram-positivas não fornece ao protoplasto uma proteção tão eficaz contra os agentes inibitórios, embora seja importante lembrar que a proteção proporcionada ao protoplasto não é exclusivamente mecânica e que a troca de íons e as propriedades de clivagem da parede podem modular o efeito de diferentes agentes ambientais (Archibald, 1989).

A parede das bactérias Gram-positivas constitui uma estrutura mista que é essencial para a sobrevivência, a forma e a integridade da célula. Montagens macromoleculares de peptidoglicano (mureína), ácidos teicóicos polianiônicos (TAs) e proteínas de superfície formam em conjunto o envelope deste tipo de bactéria (Neuhaus and Baddiley, 2003), além da matriz polianiônica que fornece funções relacionadas com a elasticidade, porosidade, resistência à tração e direção eletrostática da cobertura celular (Dijkstra and Keck, 1996).

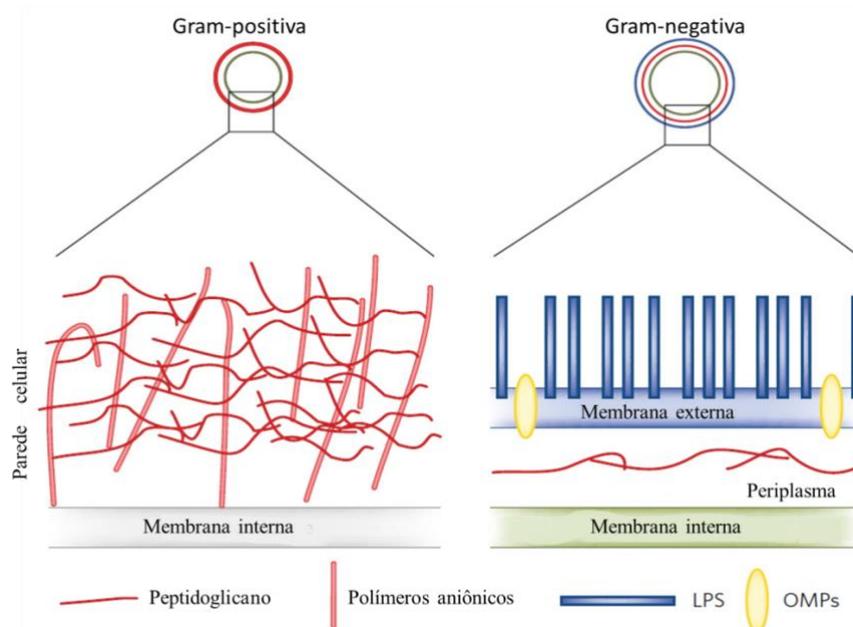


Figura 5. Arquitetura básica do envelope celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Imagem modificada de Vollmer (2011).

1.3.3. Mecanismos de ação dos PAMs

Estudos indicam que todos os peptídeos antimicrobianos interagem com as membranas bacterianas e dependendo do seu mecanismo de ação podem se agrupar como disruptores de membrana ou não disruptores de membrana (Powers and Hancock, 2003). Análises em nível microscópico mostram que diferentes peptídeos antimicrobianos têm diferentes efeitos sobre as células microbianas, que indicam que diferentes peptídeos têm diferentes sítios-alvo ou mecanismos de ação (Brogden, 2005).

Nas bactérias Gram-negativas, a associação inicial dos peptídeos com a membrana ocorre por meio de interações eletrostáticas entre o peptídeo catiônico e os LPSs aniônicos da membrana externa, o que conduz à sua perturbação. Tem-se demonstrado que os peptídeos catiônicos têm uma maior afinidade para LPS na monocamada externa da membrana exterior de bactérias Gram-negativas, do que cátions bivalentes nativos tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} (Hancock, 1997), por tanto os peptídeos substituem estes nos LPS carregados negativamente, levando a um distúrbio local na membrana externa, o que facilita a formação de zonas instáveis, chamadas de fendas transitórias, por meio das quais o peptídeo transpassa a membrana externa num processo designado absorção autopromovida (Hancock and Chapple, 1999) onde aumenta a permeabilidade da membrana permitindo um dobramento da molécula em estruturas que se associam a ela mais facilmente. Já no periplasma, o peptídeo pode interagir com a membrana citoplasmática desestabilizando-a estruturalmente, ou pode se translocar para o citoplasma (Powers and Hancock, 2003).

Os peptídeos disruptores de membrana podem agir de diferentes maneiras. Até o momento vários mecanismos de ação foram propostos para explicar o efeito dos PAMs sobre as membranas biológicas (Figura 6):

- 1. Modelo do barril (*barrel-stave model*):** Esse modelo propõe que os peptídeos anfipáticos orientem-se perpendicularmente à membrana. Estes se alinham de tal maneira que as cadeias laterais hidrofóbicas ficam viradas para o exterior (meio lipídico), enquanto que as cadeias laterais polares se alinham para o interior, formando assim poros transmembrânicos. Esses poros permitem a fuga de componentes citoplasmáticos e também alteram o potencial de membrana. (Wu *et al.*, 1999). Ex: Alameticina (Pieta *et al.*, 2012) (Figura 6.1).

2. Modelo do agregado micelar (*micellar aggregate model*): Neste caso é proposto que os peptídeos se organizam na membrana como um agregado, formando complexos de peptídeos e lipídeos simulando micelas, mas sem uma orientação em particular (Powers and Hancock, 2003). Ex: Dermaseptina (Amiche and Galanth, 2011) (Figura 6.2).

3. Modelo do poro toroidal (*toroidal pore model*): Agregados de peptídeos inserem-se numa orientação perpendicular à membrana para formar um poro, sendo que a membrana fica curvada para dentro formando um orifício onde a cabeça dos grupos permanece voltada em direção ao centro do poro, por onde os peptídeos percorrem (Jenssen *et al.*, 2006). Ex: magaininas, protegrinas and melittina (Matsuzaki *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001) (Figura 6.3).

4. Modelo do tapete (*Carpet model*): Neste modelo os peptídeos não se inserem na membrana, mas alinham-se paralelamente à bicamada, permanecendo em contato com a cabeça dos grupos lipídicos e revestindo eficazmente a área circundante. Esta orientação leva a uma perturbação local na estabilidade da membrana, provocando a formação de grandes fissuras. Em concentrações elevadas, os peptídeos orientados na superfície rompem a bicamada como se fosse um detergente, o que leva à formação de micelas (Ladokhin and White, 2001) e o conseqüente vazamento de componentes citoplasmáticos, perturbação do potencial de membrana e finalmente a desintegração da membrana (Oren and Shai, 1998). Ex: Ovispirina (Yamaguchi *et al.*, 2001) (Figura 6.4).

O resultado final da interação de componentes antibacterianos com a membrana celular, independentemente do mecanismo usado pela mesma, é a ruptura da membrana e a despolarização rápida da célula bacteriana o que conduz à morte da célula (Friedrich *et al.*, 1999).

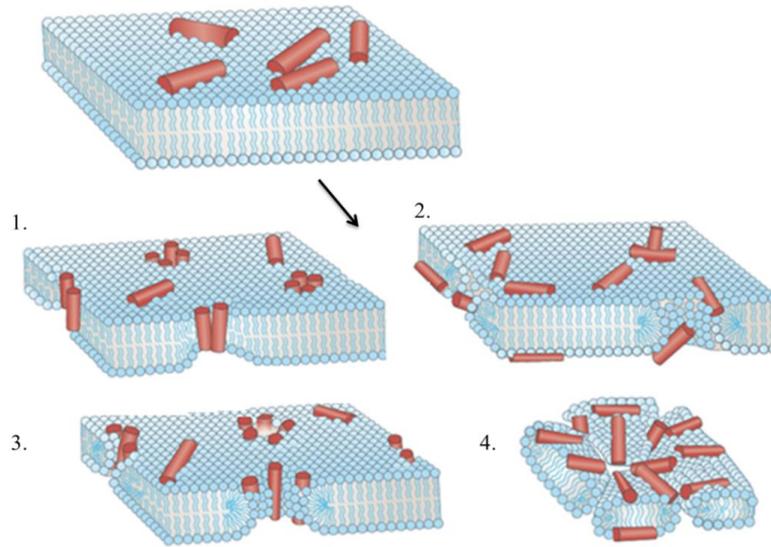


Figura 6. Representação dos modelos propostos para os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos sobre membranas biológicas. 6.1. Modelo do barril; 6.2. Modelo do agregado micelar; 6.3 Modelo do poro toroidal e 6.4. Modelo do tapete. Imagem modificada de Melo *et al.* (2009).

No caso das bactérias Gram-positivas, a atração eletrostática se dá entre os peptídeos carregados positivamente e os ácidos lipoteicóicos presentes nas superfícies das bactérias. Existem outras vertentes investigativas que propõem mecanismos de ação alheios à permeabilidade e posterior desintegração da membrana, indicando novos alvos intracelulares para os PAMs (Brogden, 2005), entre eles estão: **a.** Inibição da síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Lehrer *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1998; Patrzykat *et al.*, 2002); **b.** Interferência na síntese de proteínas (Subbalakshmi and Sitaram, 1998; Patrzykat *et al.*, 2002); **c.** Inibição da atividade enzimática (Otvos *et al.*, 2000; Kragol *et al.*, 2001) e **d.** Intervenção na formação de componentes estruturais tais como a parede da celular (Brötz *et al.*, 1998).

Enquanto a maioria dos peptídeos com caráter citolítico descritos na literatura são fortemente catiônicos, também têm sido relatados alguns exemplos de peptídeos aniônicos (Brogden *et al.*, 1996; Brogden *et al.*, 1997). Nestes casos, as concentrações mínimas inibitórias (MICs) contra cepas bacterianas comuns são muito mais elevadas do que as apresentadas por peptídeos catiônicos típicos. Resultados de microscopia eletrônica de bactérias expostas a este tipo de peptídeo não mostram as alterações típicas observadas para peptídeos catiônicos, sugerindo um modo de ação diferente (Andreu and Rivas, 1998).

1.3.4. PAMs isolados de escorpiões

Os escorpiões, como outros artrópodes, desenvolveram durante a sua evolução peptídeos com atividade antimicrobiana em suas glândulas de peçonha, juntamente com uma complexa mistura de enzimas, neurotoxinas e outros compostos de baixa massa molecular, como já foi descrito anteriormente. A maioria dos peptídeos citolíticos até agora identificados na peçonha de artrópodes são peptídeos lineares, altamente catiônicos e anfipáticos, sem resíduos de cisteína e com pontos isoelétricos acima de pH 8,57. Eles adotam uma estrutura helicoidal na presença de membranas. (Kuhn-Nentwig, 2003).

1.3.4.1. Androctonina (*Androctonus australis*)

Isolado da hemolinfa do escorpião *Androctonus australis*, este peptídeo altamente catiônico tem 25 resíduos de aminoácidos e quatro resíduos de cisteína que estão envolvidos na formação de duas pontes dissulfeto intramoleculares. A Androctonina é ativa contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. No ensaio de inibição em crescimento líquido, a Androctonina teve uma atividade alta (MIC < 3 µM) contra as bactérias Gram-positivas *Aerococcus viridans*, *M. luteus* e *Bacillus subtilis*; contra *Staphylococcus aureus* e *C. michiganensis* foi moderadamente ativa (MIC < 30 µM), e foi inativa contra *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*. Entre as bactérias Gram-negativas que foram testadas, as cepas mais sensíveis foram *P. syringae*, *P. phaseoli syringae* e *X. vesicatoria* 687,3 e B229RI (MIC < 3 µM), enquanto que *E. coli*D31 e 1106, *Salmonella typhimurium*, *P. pisi*, *P. maculicola* e *X. campestris*pv. *campestris* foram menos sensíveis (MIC < 15 µM). *P. syringae* pv. *syringae*, *P. valerianella* e *E. coli* D22 tiveram uma baixa sensibilidade (MIC > 15 µM) e *Enterobacter cloacae* β12, *Erwinia carotovora carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas cepacia*, e *X. campestris* pv. *oryzae* não foram afetados até uma concentração de 30 mM (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996).

1.3.4.2. IsCT (*Opisthacanthus madagascariensis*)

IsCT é um peptídeo antimicrobiano α-helicoidal de origem natural isolado do escorpião *O. madagascariensis*. É um dos PAMs mais curtos conhecidos sendo constituído por apenas 13 resíduos de aminoácidos e não possui nenhum resíduo de cisteína. O peptídeo IsCT apresenta atividade citolítica potente contra células de mamíferos e bactérias. Como o

peptídeo IsCT possui baixa seletividade, novos análogos baseados em sua estrutura primária foram produzidos com o intuito de se obter agentes antimicrobianos mais potentes e com seletividade contra bactérias aumentada (Dai et al., 2001; Lee et al., 2004) (Tabela 1).

Tabela 1. Estrutura primária do peptídeo IsCT isolado da peçonha do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis* e dos seus análogos produzidos por síntese química. Imagem modificada de Lee *et al.*, 2004.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Massa molecular (Da)	
		Calculada	Observada
IsCT	ILGKIWEGIKSLF-NH ₂	1502.9	1503.5
[A ⁶]-IsCT	ILGKIAEGIKSLF-NH ₂	1387.7	1389.0
[L ⁶]-IsCT	ILGKILEGIKSLF-NH ₂	1429.8	1430.6
[K ⁷]-IsCT	ILGKIWKGIKSLF-NH ₂	1501.9	1502.1
[L ⁶ , K ¹¹]-IsCT	ILGKILKGIKSLF-NH ₂	1469.9	1470.2
[K ⁷ , P ⁸ , K ¹¹]-IsCT	ILGKIWKIKSLF-NH ₂	1583.1	1583.5

A atividade antimicrobiana dos análogos foi testada contra espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados demonstraram uma diminuição dramática na atividade antimicrobiana com exceção do [A⁶]-IsCT, enquanto a ordem da atividade hemolítica foi IsCT > [k⁷]-ISCT > [L⁶]-IsCT = [L⁶, K¹¹]-IsCT > [A⁶] - IsCT = [K⁷, P⁸, K¹¹]-IsCT. Em particular, [K⁷, P⁸, K¹¹]-IsCT exibiu maior atividade antibacteriana do que a IsCT nativa, mas nenhuma atividade hemolítica, mesmo em concentrações tão altas quanto 100 µM (Lee *et al.*, 2004).

1.3.4.3. Parabutoporin PP (*Parabuthus schlechteri*) e Opistoporin OP1 (*Opisthophthalmus carinatus*)

Parabutoporin (PP) e Opistoporin 1 (OP1) são peptídeos antimicrobianos anfipáticos α -helicoidais que foram isolados das peçonhas dos escorpiões *Parabuthus schlechteri* e *Opisthophthalmus carinatus* respectivamente e estudados ao mesmo tempo, Os peptídeos foram capazes de induzir um aumento nos níveis de Ca²⁺ pela liberação reversível de Ca²⁺ no nível intracelular ao tempo que aumentou o influxo de Ca²⁺ a partir do espaço extracelular (Moerman *et al.*, 2003). A ordem da potência na indução no aumento de Ca²⁺ foi PP >

Melitina > Mastoparan > OP1, esta ordem de potência é diferente de sua atividade antibacteriana onde PP e OP1 exercem uma atividade significativamente maior em bactérias Gram-negativas, enquanto que a Melitina e o Mastoparan são mais potentes contra bactérias Gram-positivas (Moerman *et al.*, 2002). Além disso, em outros estudos, a Parabutoporina mostrou-se hemolítica com uma HC₅₀ de 38 µM em glóbulos vermelhos (Remijsen *et al.*, 2010), e é ainda mais lítica para outras células eucarióticas como neutrófilos humanos com uma LC₅₀ de 1,3 µM (Elgar *et al.*, 2006). No entanto, em concentrações submicromolares, a Parabutoporina não produz lise contra qualquer linhagem celular humana conhecida (Remijsen *et al.*, 2010).

1.3.4.4. StCT1 (*Scorpiops tibetanus*)

StCT1 é um novo peptídeo antimicrobiano isolado a partir da biblioteca de cDNA de glândulas de peçonha do escorpião *S. tibetanus*. O peptídeo maduro é composto por 14 resíduos de aminoácidos com um C-terminal amidado que tem alta similaridade com o peptídeo IsCTs isolado de *Opisthacanthus madagascariensis*, sendo formador de α -helice. O peptídeo sintético de StCT1 apresenta uma potente atividade inibitória sobre a proliferação de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *M. luteus*), mas não sobre bactérias Gram-negativas. Além disso, o peptídeo sintético StCT1 inibiu o crescimento de patógenos clínicos isolados resistentes a antibióticos. Estes resultados mostraram que StCT1 é um peptídeo interessante para futuros estudos (Yuan *et al.*, 2010).

1.3.4.5. Pandininas 1 e 2 (*Parabuthus imperator*)

As Pandininas 1 e 2 são dois novos peptídeos com atividade inibitória para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas da peçonha do escorpião *P. imperator*. Os dois são altamente hidrofóbicos, sendo que a Pandinina 2 é mais hidrofóbica, possuem atividade citolítica (formadora de poro) mais baixa sobre as bactérias Gram-negativas testadas (*B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* e *S. aureus*), em comparação com as bactérias Gram-positivas (*P. aeruginosa* e *E. coli*). A Pandinina 2 apresentou maior atividade hemolítica com taxa de hemólise de 51% na concentração de 22,2 µM, enquanto a Pandinina 1 induziu uma hemólise de apenas 1,4% na maior concentração utilizada no ensaio (Corzo *et al.*, 2001).

1.3.4.6. Hadrurin (*Adrurus aztecus*)

A Hadrurina foi isolada da peçonha do escorpião mexicano *Hadrurus aztecus*. É um peptídeo básico composto de 41 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 4.436 Da e não contém resíduos de cisteína. Este peptídeo apresenta atividade antimicrobiana em concentrações micromolares baixas, inibindo a proliferação de bactérias como *E. coli*, *E. cloacae* e *S. marscences* (MIC < 10 µM), *S. thyphi* e *K. pneumoniae* (MIC < 40 µM), e *P. aeruginosa* (MIC = 50 µM). Ele também exibe atividade citolítica sobre eritrócitos humanos (HC₅₀ ≥ 30 µM) (Torres Larios *et al.*, 2000).

1.4. CANAIS IÔNICOS

Os canais iônicos são proteínas de membrana integrais que formam um poro para permitir a passagem de íons específicos por difusão passiva. A maioria, se não todos os canais iônicos sofrem alterações conformacionais passando de um estado fechado para aberto o que permite a passagem de milhares de íons pelo canal. A abertura e fechamento dos canais podem ser controlados por diferentes formas, incluindo variações no potencial elétrico da membrana plasmática, a união a ligantes tais como Ca^{2+} extracelular ou neurotransmissores, e também por modificações pós-traducionais tais como fosforilação. Muitos canais iônicos são complexos protéicos formados por várias subunidades que participam na formação dos poros e muitas vezes estão associadas com outras subunidades específicas do canal que são estruturalmente independentes e podem regulá-los (Jentsch *et al.*, 2004).

Existem diferentes tipos de canais que permitem a passagem de um dado tipo de íon. Entre os principais temos: os canais iônicos para Potássio (K^+), Cálcio (Ca^+), Cloreto (Cl^-) e Sódio (Na^+).

1.4.1. Canais iônicos para sódio

Os canais para sódio têm um papel central nos processos fisiológicos, transmitem impulsos de despolarização rápida ao longo das células e das redes celulares, permitindo assim a coordenação dos processos superiores como a locomoção e a cognição (Marban *et al.*, 1998).

Os canais para sódio são um conjunto de proteínas transmembranais responsáveis pelo aumento, dependente de voltagem, da permeabilidade aos íons sódio através da membrana e que iniciam e propagam o potencial de ação nas células excitáveis (Catterall, 2000b; Frank and Catterall, 2003; Bosmans and Tytgat, 2007). Os canais para sódio são formados por uma subunidade α de 260 kDa formadora do poro associada às subunidades auxiliares: $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$ (Yu *et al.*, 2003) (Figura 7).

A subunidade α consiste de quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo seis segmentos transmembranais (S1-S6) e um segmento reentrante (SS1/SS2) ligado por *loops* polipeptídicos internos e externos. Os segmentos S4 são carregados positivamente e servem como sensores de voltagem para iniciar a ativação dependente de voltagem dos canais,

movendo-se para fora sob a influência do campo elétrico. Quatro dos seis segmentos α -helicoidais em cada domínio tem uma orientação transmembranal, enquanto que o *hairpin* S3-S4 se projeta para o citoplasma devido ao seu caráter hidrófilo (Sato *et al.*, 2001).

O segmento S4 em cada domínio contém 4-7 repetições de três resíduos de aminoácidos de carga positiva (geralmente arginina), seguido por dois resíduos de aminoácidos hidrófobos, ficando acessíveis fora da célula durante a abertura do canal (Noda *et al.*, 1984; Catterall, 2000b).

A inativação do canal é mediada por um *loop* curto intracelular que liga os domínios III e IV. Os *loops* reentrantes na membrana entre S5 e S6 (SS1, SS2) formam o filtro seletor de íons na região exterior do poro. Os quatro domínios dobram-se em conjunto criando um poro central cujos constituintes estruturais determinam as propriedades de seletividade e condutância do canal (Marban *et al.*, 1998; Yu and Catterall, 2004; Payandeh *et al.*, 2011) (Figura 8).

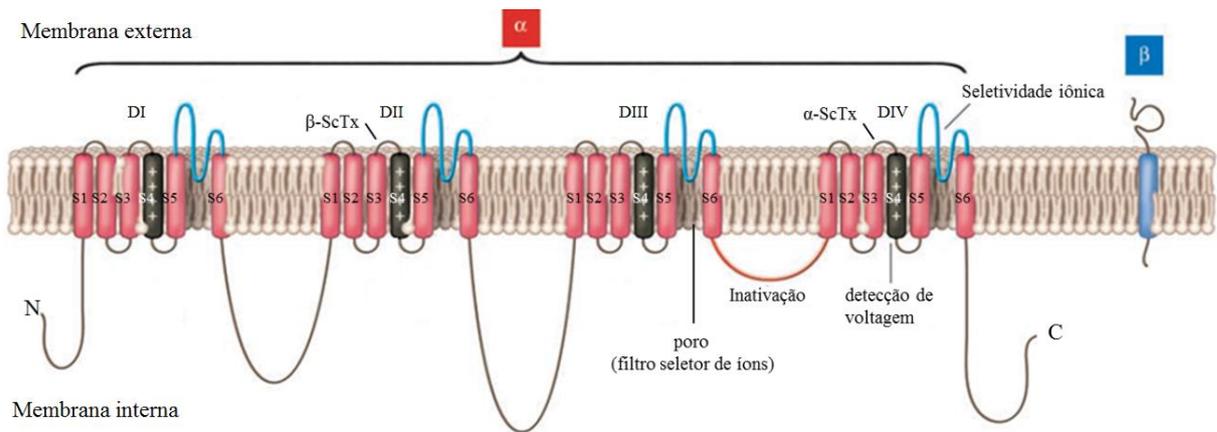


Figura 7. Representação simples da topologia transmembranal das subunidades α e β nos Na_vCh . Imagem modificada de George Jr. (2005).

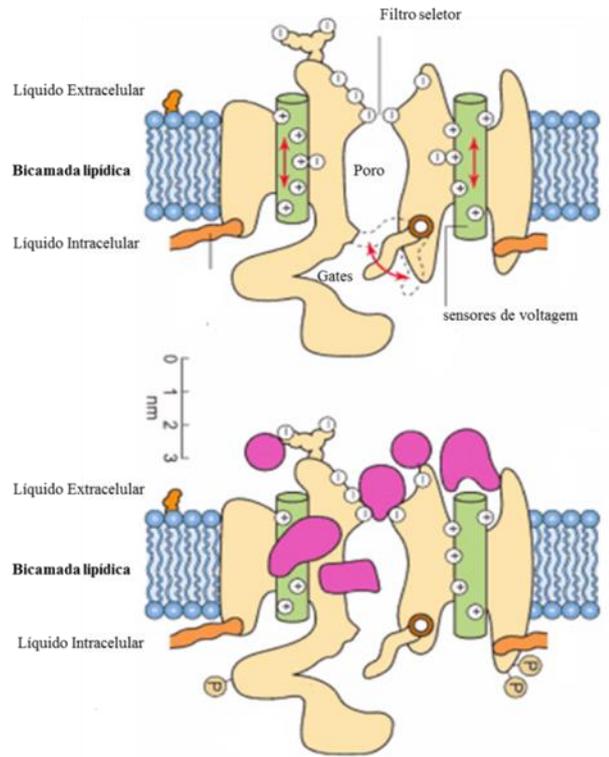


Figura 8. Representação esquemática de um Na_vCh e suas unidades funcionais. Em roxo observa-se os sítios hipotéticos de ligação de drogas e toxinas ativas para canais para sódio, como sintetizado na tabela 2. Imagem modificada de Hille and Catterall (2011).

1.4.2. Toxinas que agem em canais para sódio

Os escorpiões produzem toxinas, as α -toxinas e β -toxinas, capazes de interagir seletivamente com diferentes subtipos de canais para sódio voltagem-dependentes (*voltage gated sodium channels*, VGSCs) (Liu *et al.*, 2011; Chugunov *et al.*, 2013). As toxinas escorpiônicas mais estudadas são representadas por peptídeos de cadeia longa compostos por 61 a 76 resíduos de aminoácidos, estabilizada por quatro pontes dissulfeto, que atuam interferindo com o fluxo do íon sódio (Na^+) através das membranas biológicas. Os mecanismos por meio do qual tais toxinas exercem seus efeitos podem se dar pela inativação lenta ou ativação precipitada do canal para sódio (Possani *et al.*, 1999; Goudet *et al.*, 2002). As toxinas do tipo α interferem com a inativação dos canais para sódio voltagem-dependentes e as toxinas do tipo β alteram o mecanismo normal de abertura dos canais para sódio, tornando-o mais responsivo (Possani *et al.*, 2000; de la Vega and Possani, 2007; Weinberger *et al.*, 2010).

Os canais para sódio são alvos moleculares para diferentes toxinas que podem agir em seis ou mais receptores distintos localizados nas proteínas que formam o canal. Tanto as toxinas hidrofílicas, de baixa massa molecular, como as toxinas polipeptídicas, podem bloquear os poros e prevenir a condutância do íon sódio.

As toxinas polipeptídicas alteram a abertura do canal por *voltage-sensor trapping* por meio de ligações a receptores extracelulares. Este mecanismo pode ser um modo de ação comum para toxinas polipeptídicas modificadoras da abertura do canal iônico (*gating*) que atuam em todos os canais iônicos dependentes de voltagem (Catterall *et al.*, 2007). Até hoje já foram identificados seis receptores para neurotoxinas nos VGSCs (Tabela 2).

Tabela 2. Sítios de ligação de neurotoxinas nos canais para sódio voltagem-dependentes.

Sítio de ligação	Neurotoxina	Efeito funcional
Sítio 1	Tetradotoxina Saxitoxina μ -Conotoxina	Bloqueadora de poro
Sítio 2	Batracotoxina Veratridina Grayanotoxina Aconitina	Aumenta, mantém ou bloqueia a ativação
Sítio 3	α -Toxinas escorpiônicas Toxinas de anêmona do mar Atracotoxinas	Retarda a inativação.
Sítio 4	β -Toxinas escorpiônicas	Facilita a ativação.
Sítio 5	Brevetoxinas Ciguatoxinas	Facilita a ativação e bloqueia a inativação.
Sítio 6	δ -Conotoxinas	Retarda a inativação.

*Tabela retirada e modificada de Catterall *et al.*, 2007.

1.4.2.1. α -NaScTxS (Alfa-toxinas escorpiônicas)

São toxinas que se ligam ao sítio 3 do canal para sódio e são dependentes de voltagem, causando uma desaceleração no processo de inativação das correntes de sódio e um prolongamento do potencial de ação. As α -NaScTxS podem ser divididas em três subgrupos: 1. Toxinas α clássicas, que são muito ativas no cérebro dos mamíferos; 2. As α -inseto toxinas e 3. As “ α -like” toxinas, que atuam no sistema nervoso central, tanto de mamíferos como de insetos (Gordon *et al.*, 1998) (Tabela 3).

Estudos sobre a localização do sítio 3 desenvolvidos por Rogers *et al.*(1996) identificaram resíduos de aminoácidos individuais no *loop* extracelular que liga os segmentos S3 e S4 no domínio IV, e também no domínio I, no *loop* extracelular que liga os segmentos S5-S6 de canais NA_V (Catterall, 2000a), os quais são essenciais para a ligação e ação destas toxinas. Outra característica importante da interação das α -NaScTxS no canal é a fato dos seus resíduos de aminoácido básicos estarem implicados na interação com os canais. Assim, os segmentos S4 de canais para sódio servem como sensores de voltagem. Estes se deslocam para o exterior sob a influência do campo elétrico quando a membrana é despolarizada. Por isso, as α -NaScTxS e as toxinas de anêmonas do mar retardam a inativação do canal para sódio, porque evitam o movimento para o exterior do segmento transmembranal IVS4, impedindo assim alterações conformacionais, que são necessárias para a inativação rápida do canal (Rogers *et al.*, 1996). Depois de um tempo a despolarização prolongada força o movimento para o exterior do segmento IVS4 e causa a dissociação das α -NaScTxS e o canal para sódio (Catterall, 1977; Bezanilla, 2000; Campos *et al.*, 2008).

Tabela 3. Exemplos de alfa-toxinas escorpiônicas.

Toxina	Espécie	MM (KDa)
Toxin Tpa4 (T-alpha* NaTx3.7)	<i>Tityus pachyurus</i>	86
Toxin TdNa8 (P*T-alpha* NaTx3.6)	<i>Tityus discrepans</i>	85
Toxin TdNa9 (PT-alpha* NaTx7.1)	<i>Tityus discrepans</i>	85
Toxin TdNa10 (T-alpha* NaTx7.2)	<i>Tityus discrepans</i>	81
Alpha-Toxin To1 (PT-not alpha NaTx12.1)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	86
Alpha-Toxin To2 (PT-alpha' NaTx11.1)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	87
Alpha-Toxin To3 (PT-alpha' NaTx14.2) (Toxin Tc48b/Tc49a)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	86
Alpha-Toxin To9 (T-alpha* NaTx3.8)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	85
Alpha-Toxin To10 (T-alpha* NaTx3.9)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	84
Alpha-mammal toxin Ts3 (PT-Mice-alpha NaTx3.1))	<i>Tityus serrulatus</i>	80
Alpha-toxin Ts5 (P-alpha* NaTx3.2) (Tityustoxin V)	<i>Tityus serrulatus</i>	64
Toxin Tb3 (P-Mice-alpha* NaTx3.3) (TbTx IV-5)	<i>Tityus bahiensis</i>	62
Toxin TbTx5 (T-alpha* NaTx3.4)	<i>Tityus bahiensis</i>	86
Toxin Tst3 (P-alpha* NaTx3.5)	<i>Tityus stigmurus</i>	64
Alpha-toxin Tf4 (Neurotoxin 4) (P-Frog-alpha NaTx4.4)	<i>Tityus fasciolatus</i>	62
Alpha-toxin Bot1	<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	65
Alpha-toxin PgKL1 (Kurt toxin-like 1) (KLI)	<i>Parabuthus granulatus</i>	62
Alpha-toxin PgKL2 (Kurt toxin-like 2) (KLII)	<i>Parabuthus granulatus</i>	63
Alpha-like toxin BmK-M1 (BmK I)	<i>Mesobuthus martensii(Buthus martensii)</i>	84
Toxin BmKabT (BmK BT)	<i>Mesobuthus martensii(Buthus martensii)</i>	83
Alpha-toxin OD1	<i>Odontobuthus doriae</i>	65
Alpha-toxin Bu1	<i>Buthacus macrocentrus</i>	67
Alpha-mammal toxin Lqq5 (Lqq V) (Neurotoxin V)	<i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>	64

*Toxinas registradas na base de dados UniprotKB <http://www.uniprot.org/>.

1.4.2.2. β -NaScTxS (Beta-toxinas escorpiônicas)

São toxinas que se ligam ao sítio 4 independentemente do potencial elétrico da membrana plasmática, afetando a ativação dos canais para sódio em células excitáveis. Provocam o deslocamento do potencial de membrana para valores mais eletronegativos e provocam uma redução na amplitude do pico de corrente gerado (Gordon *et al.*, 1998; Cestèle *et al.*, 2006). Também pode levar a disparos repetitivos nos potenciais de ação tanto em músculos quanto em nervos (Cestèle and Catterall, 2000).

Estudos realizados por Marcotte e colaboradores (1997), usando canais para sódio quiméricos nos quais diferentes combinações de domínios se alternavam, demonstraram a importância do domínio II para a ligação de β -NaScTxS no canal. Em estudos posteriores, Cestèle *et al.* (1998) demonstraram que resíduos de aminoácidos específicos presentes nos *loops* extracelulares que ligam os segmentos S1-S2 e S3-S4 são responsáveis pela ação sobre o canal para sódio.

O mecanismo de ação proposto para as β -NaScTxS envolve a interação com a terminação extracelular do segmento IIS4 em canais para sódio ativados através da ligação ao *loop* S3-S4. Uma vez que o segmento IIS4 se move para fora durante a despolarização, a toxina se liga aos resíduos acessíveis no *loop* IIS3-S4 e ao final do segmento extracelular IIS4 durante o condicionamento pré-pulso. Ao se ligar à extremidade do segmento extracelular IIS4, as β -NaScTxS aprisionam e estabilizam o segmento IIS4 na sua posição exterior (ativado), aumentando assim a ativação dos canais em resposta à despolarização e subsequente deslocamento negativo dependente de voltagem (Cestèle *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2011). Na Tabela 4 são citadas algumas das β -toxinas isoladas de diferentes espécies de escorpião que tem atividade para canais para sódio segundo a base de dados UniprotKB.

Tabela 4. Exemplos de beta-toxinas escorpiônicas.

Toxina	Espécie	MM (kDa)
Beta-mammal toxin C _{ss} 4	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	66
Beta-toxin C _{ss} 6	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	66
Toxin C _{II} 2b	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	87
Toxin C _{II} 3	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	87
Toxin C _{II} 4	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	87
Toxin C _{II} 5b	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	87
Toxin C _{II} 5c	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	87
Toxin C _{II} 5c*	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	85
Toxin C _{II} 6	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	85
Toxin C _{II} 7	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	85
Toxin C _{II} 8 (Fragment)	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	72
Beta-toxin C _s E3 (Neurotoxin E3)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	87
Toxin C _s Ev1 (Neurotoxin 1)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	87
Toxin C _s Ev2 (Neurotoxin 2)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	87
Toxin C _s Ev3 (Neurotoxin 3)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	87
Toxin C _s E9 (Neurotoxin 9)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	84
Beta-toxin C _s EI (Neurotoxin I)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	86
Neurotoxin E1x (C _s E1x)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	86
Toxin C _s E8 (Neurotoxin 8)	<i>Centruroides sculpturatus</i>	85
Toxin C _n 1 (Toxin II.14) (Toxin 1)	<i>Centruroides noxius</i>	86
Beta-mammal toxin C _n 2 (Toxin 2) (Toxin II.9.2.2) (Fragment)	<i>Centruroides noxius</i>	84
Beta-toxin C _n 4 (Toxin 4) (Toxin CngtV) (Toxin II-10)	<i>Centruroides noxius</i>	87
Beta-toxin C _n 5 (CngtII)	<i>Centruroides noxius</i>	87
Beta-toxin C _n 7 (Toxin-7) (Toxin II-13.3) (Fragment)	<i>Centruroides noxius</i>	55
Beta-toxin C _n 8 (Toxin-8) (Toxin II-13.4)	<i>Centruroides noxius</i>	67
Beta-toxin C _n 9 (Toxin-9) (Toxin II-14.4) (Fragment)	<i>Centruroides noxius</i>	14
Toxin CngtIII	<i>Centruroides noxius</i>	87

Toxina	Espécie	MM (kDa)
Toxin CngtIV	<i>Centruroides noxius</i>	86
Beta-toxin CeII8	<i>Centruroides elegans</i>	64
Beta-mammal toxin CeII9	<i>Centruroides elegans</i>	67
Beta-toxin Cii1	<i>Centruroides infamatus infamatus</i>	66
Birtoxin	<i>Parabuthus transvaalicus</i>	58
Ikitoxin	<i>Parabuthus transvaalicus</i>	58
Beta-toxin BmKAS (BmK-PL)	<i>Mesobuthus martensii(Buthus martensii)</i>	85
Beta-toxin BmKAs1	<i>Mesobuthus martensii (Buthus martensii)</i>	85
Toxin BmKabT (BmK abT)	<i>Mesobuthus martensii (Buthus martensii)</i>	83
Neurotoxin BmP08 (Short-chain peptide BmKX)	<i>Mesobuthus martensii (Buthus martensii)</i>	55
Alpha-like toxin BmK-M1	<i>Mesobuthus martensii(Buthus martensii)</i>	84
Toxin TdNa6 (PT-Arthr*-beta* NaTx1.2)	<i>Tityus discrepans</i>	82
Toxin TdNa7 (PT-beta* NaTx13.8)	<i>Tityus discrepans</i>	86
Toxin TdNa9 (PT-alpha* NaTx7.1)	<i>Tityus discrepans</i>	85
Toxin TdNa10 (T-alpha* NaTx7.2)	<i>Tityus discrepans</i>	81
Toxin Td1 (PT-beta* NaTx13.1)	<i>Tityus discrepans</i>	86
Toxin Td2 (P*T-beta* NaTx13.2)	<i>Tityus discrepans</i>	86
Toxin Td3 (P*T-beta NaTx13.3) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td4 (P*T-beta* NaTx14.3) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td5 (P*T-beta* NaTx14.4) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td6 (T-beta* NaTx13.4) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	74
Toxin Td7 (T-beta* NaTx14.4) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td8 (PT-beta* NaTx14.6)	<i>Tityus discrepans</i>	86
Toxin Td9 (T-beta* NaTx14.7) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td10 (T-beta* NaTx13.5) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td11 (T-beta* NaTx13.6) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Td12 (T-beta* NaTx13.7) (Fragment)	<i>Tityus discrepans</i>	73
Toxin Tb1 (PT-Mice-beta* NaTx6.2) (Tb-gamma)	<i>Tityus bahiensis</i>	84
Toxin Tb2 (P-beta* NaTx5.3) (Toxin III-8)	<i>Tityus bahiensis</i>	62

Toxina	Espécie	MM (kDa)
Insect toxin TbIT-1 (P-Ins-beta* NaTx4.3) (TbIT-I)	<i>Tityus bahiensis</i>	63
Toxin Tb2-II (P-Mice-Ins-beta* NaTx5.4)	<i>Tityus bahiensis</i>	62
Toxin Ts2 (P-Mice-beta* NaTx5.1) (Tityustoxin II)	<i>Tityus serrulatus</i>	62
Toxin Tst2 (P-Mice-beta* NaTx5.2) (Tityustoxin II)	<i>Tityus stigmurus</i>	62
Toxin Tst1 (PT-Mice-beta* NaTx6.3) (Tst-gamma)	<i>Tityus stigmurus</i>	84
Beta-mammal/insect toxin Ts11) (Tityustoxin VII)	<i>Tityus serrulatus</i>	84
Toxin Tz2 (P*T-beta* NaTx1.1) (Fragment)	<i>Tityus zulianus</i>	69
Beta-toxin Tz1 (PT-beta NaTx14.1)	<i>Tityus zulianus</i>	86
Toxin To5 (PT-Arthr*-beta* NaTx2.7) (Toxin To66)	<i>Tityus obscurus(Tityus cambridgei)</i>	84
Toxin To4 (PT-beta* NaTx13.9) (Toxin Tc54) (Toxin To54)	<i>Tityus obscurus(Tityus cambridgei)</i>	86
Toxin To6 (PT-alpha* NaTx7.5) (Toxin Tc43) (Toxin To43)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	85
Toxin To12 (T-beta* NaTx5.5)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	83
Toxin To15 (T-beta* NaTx1.4)	<i>Tityus obscurus(Tityus cambridgei)</i>	83
Toxin To8 (PT-beta* NaTx10.1)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	86
Toxin To3 (PT-alpha' NaTx14.2) (Toxin Tc48b/Tc49a)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	86
Toxin To11 (T NaTx14.9)	<i>Tityus obscurus (Tityus cambridgei)</i>	86
Toxin Tpa5 (T-alpha* NaTx7.2)	<i>Tityus pachyurus</i>	86
Beta-mammal toxin Tpa2 (TpNNX)	<i>Tityus pachyurus</i>	65
Toxin Tpa8 (T NaTx9.1)	<i>Tityus pachyurus</i>	101
Toxin Tpa6 (T-alpha* NaTx7.4)	<i>Tityus pachyurus</i>	86
Toxin Tpa7 (T-beta* NaTx1.3)	<i>Tityus pachyurus</i>	82
Toxin Tco-gamma (T-beta* NaTx6.4) (Toxin gamma-like)	<i>Tityus costatus</i>	64
Beta-insect depressant toxin BmKIT2	<i>Mesobuthus martensii (Buthus martensii)</i>	61
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3a	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3b	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3c	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3d	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3e	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3f	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85

Toxina	Espécie	MM (kDa)
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3g	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin Lqh-dprIT3h	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect depressant toxin LqhIT2 (Insect toxin 2)	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	85
Beta-insect excitatory toxin Bj-xtrIT (Bjxtr-IT)	<i>Buthus judaicus</i>	94
Beta-toxin BotIT2 (Bot IT2) (Insect toxin 2)	<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	60
Beta-toxin KAaH2 (Peptide AaF1CA22)	<i>Androctonus australis</i>	80
Beta-toxin KAaH1 (Peptide AaF1CA8)	<i>Androctonus australis</i>	80

*Toxinas registradas na base de dados UniprotKB <http://www.uniprot.org/>.

O estudo das toxinas de escorpião que afetam canais para Na^+ (NaScTx) recebe grande atenção devido à importância médica e ao interesse em caracterizar os seus efeitos farmacológicos no nível molecular por serem responsáveis pelos sintomas neurotóxicos desenvolvidos durante o escorpionismo e estão relacionadas à alterações na função deste tipo de canal iônico (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005).

1.4.3. Doenças ligadas aos canais para sódio (“Canalopatias”)

Os canais iônicos voltagem-dependentes são alvos para um grande número de anomalias, como as provocadas por mutações que causam doenças hereditárias ou problemas relacionados ao mau funcionamento dos canais. As mutações em vários genes de canais para sódio, expressas em diferentes tecidos, podem causar distintas doenças herdadas, conhecidas como canalopatias (George Jr, 2005). Em geral, tais doenças neurológicas têm herança dominante e são causadas por mutações de ganho de função, o que significa que os efeitos funcionais surgem principalmente como um aumento na ativação ou uma inativação diminuída dos canais iônicos, que podem causar diversas doenças provocadas por mutações em um mesmo gene. Entre os exemplos de doenças ligadas aos canais para sódio podemos enumerar: as mutações que prejudicam a inativação rápida e/ou lenta de canais NaV1.4 e que causam paramiotonia congênita ou paralisia periódica hipocalêmica (Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2006; Venance *et al.*, 2006); as mutações que aumentam a ativação dos canais Nav1.7 podem causar eritromelalgia ou prejudicar a inativação rápida do canal causando desordem paroxística de dor extrema (Dib-Hajj *et al.*, 2007), entre outras.

A pesquisa sobre a estrutura e função dos sensores de voltagem tem implicações importantes na patofisiologia, na descoberta de drogas e na pesquisa translacional. O entendimento da estrutura e função dos sensores de voltagem também irá abrir novas oportunidades na farmacologia dos canais iônicos. As drogas bloqueadoras dos canais iônicos mais usadas na terapia atual se ligam, quase todas, aos módulos formadores do canal e não são altamente seletivas entre os vários membros da mesma família de um dado canal iônico. Em contraste, a variação da sequência de aminoácidos entre os módulos de detecção de voltagem é maior e muitas toxinas naturais ligam-se a sensores de voltagem

individuais de uma forma altamente específica, como exemplificado pelas toxinas escorpiônicas. Estas toxinas são altamente dependentes do estado de ligação, o que poderia ser aproveitado com grande vantagem em pequenas moléculas dirigidas a sensores de voltagem. Tais candidatos à drogas poderiam conservar as ligações voltagem-dependente como um mecanismo de especificidade, juntamente com a seletividade adicionada a partir do reconhecimento de sequências únicas de aminoácidos em seus alvos sensores de voltagem (Catterall, 2010).

Existem drogas com funções moduladoras de VGSCs que têm demonstrado valor clínico como anestésico local ou no tratamento de arritmia cardíaca, dor e epilepsia e que estão atualmente sob investigação como alternativa na terapia para acidente vascular cerebral, transtorno bipolar e outras desordens (Clare *et al.*, 2000). Os papéis indispensáveis dos VGSCs são bem ilustrados pelos efeitos letais da sua inibição por uma variedade de neurotoxinas altamente potentes e seletivas como citadas nas tabelas 3 e 4. Por tanto, o estudo das toxinas escorpiônicas que afetam canais para sódio recebe atenção crescente devido à sua importância médica e ao interesse em se caracterizar os seus efeitos farmacológicos ao nível molecular (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005).

1.4.4. O potencial de ação e a técnica DRG (*Dorsal Root Ganglia*)

Os neurônios DRG expressam vários tipos de receptores e de canais iônicos. Estes canais e receptores têm pelo menos três funções: 1) Transdução (por exemplo, canais de potencial transitório do receptor, os canais para sódio, canais iônicos sensíveis a ácidos e receptores sensíveis a ATP), que são expressos nos terminais periféricos dos neurônios DRG e fazem a transdução do *noxious stimuli* (estímulo externo) em impulsos elétricos; 2) Condução (por exemplo, canais para sódio e para potássio estão envolvidos na propagação dos potenciais de ação) e 3) Modulação da transmissão sináptica (por exemplo, os canais para cálcio dependentes de voltagem e receptores de glutamato que são expressos em terminais pré-sinápticos dos neurônios primários aferentes, regulando a liberação de neurotransmissores) (Wang *et al.*, 2011).

Os canais para sódio voltagem-dependentes (Nav) iniciam os potenciais de ação no nervo e músculo, propagando rapidamente sinais elétricos, muitas vezes por longas distâncias. Tal canal iônico sofre ativação e inativação em uma escala de tempo de milissegundos para gerar um pulso de corrente de sódio para dentro da célula, que tem por consequência o estabelecimento da fase ascendente do potencial de ação (Hille, 2001). Já em neurónios periféricos especializados, especificamente nos gânglios da raiz dorsal (DRG), os canais para sódio voltagem-dependentes são cruciais para a transmissão de informação sensorial nociceptiva ao sistema nervoso central (Dib-Hajj *et al.*, 2007). Existem pelo menos nove subtipos de canais para sódio voltagem-dependentes. Os neurónios sensoriais achados em DRG de organismos maduros expressam combinações de Nav1.1, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9; o subtipo Nav1.3 é expresso predominantemente nos neurónios neonatais e em níveis muito baixos nas células neuronais adultas. Embora Nav1.2 seja uma das isoformas de VGSC predominantes no SNC, ele também é detectado em neurónios DRG de adultos, mas apenas em níveis baixos (Beckh *et al.*, 1989; Rush *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que 50% dos neurónios DRG disparam vários potenciais de ação repetitivamente em resposta a estímulos despolarizantes contínuos. Esta hiperexcitabilidade é produto da diminuição do limiar nos neurónios. Em comparação com outros canais para sódio, o subtipo Nav1.8 permite aos neurónios DRG gerar potenciais de ação e sustentar um disparo repetitivo quando despolarizados. Esta descoberta leva a prever que quando Nav1.7 estiver mutado, os neurónios ainda podem produzir hiperexcitabilidade dos DRG porque essas células também expressam canais Nav1.8 que estão ainda disponíveis para ativação (por causa da sua inativação por despolarização dependente de voltagem) (Rush *et al.*, 2006).

Dib-Hajj *et al.* (2005) demonstraram pela primeira vez que uma mutação nos canais para sódio pode produzir diminuição no limiar para potenciais de ação individuais e aumentar a frequência de disparo de potenciais nos neurónios DRG (Dib-Hajj *et al.*, 2005). Sabe-se que uma vez que o canal Nav1.7 tenha sido ativado, é produzida uma cascata

de reações que leva, por exemplo a abertura do canal Nav.1.8, que tem um limiar de ativação mais depolarizado, produzindo potencial de ação (Renganathan et al., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Diante o exposto, as peçonhas e suas toxinas, além de serem responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade no redor do mundo, são também ferramentas muito úteis na elucidação de processos biológicos complexos. Como discutido anteriormente, as toxinas escorpiônicas tem funções variadas com ações distintas sobre alvos específicos. Assim sendo, esses compostos tem suscitado interesse como possíveis fontes de compostos com aplicação terapêutica.

Cada vez mais são descobertos agentes físicos, químicos e/ou biológicos que transcendem os nossos sistemas de reparação e desencadeiam processos cancerígenos em diferentes tipos celulares. Da mesma forma, a incidência de microrganismos multirresistentes tem aumentado vertiginosamente nos últimos anos, levando muitos pacientes a óbito por ausência de antibióticos eficazes.

Estudos com toxinas animais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento das ciências biomédicas, uma vez que várias das moléculas bioativas encontrados nessas peçonhas podem exercer importantes efeitos sobre a fisiologia humana, vindo a servir no diagnóstico, tratamento e cura de alguns tipos de doenças.

No caso do câncer, tais moléculas farmacologicamente ativas podem agir na inibição da angiogênese, inibir a síntese de proteínas, induzir apoptose, entre outros. Sendo assim relevante focalizar nesses componentes como complemento ou talvez uma alternativa ao tratamento com os agentes quimioterapêuticos disponíveis, por serem menos invasivos e causarem efeitos adversos mínimos. No caso das doenças infecciosas, muitos peptídeos são capazes de interagir com componentes da membrana celular, levando à citólise das bactérias, interrompendo o processo infeccioso.

3. OBJETIVOS E METAS

3.1. Objetivo geral

Identificar, purificar e caracterizar componentes presentes na peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* com potencial terapêutico representado por suas atividades citotóxica, antimicrobiana e neurotóxica.

3.2. Metas estabelecidas

- ✓ Fracionar a peçonha do escorpião *C. margaritatus* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC) em coluna de fase reversa C₈.
- ✓ Identificar as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da peçonha de *C. margaritatus* por RP-HPLC com atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais com o emprego do ensaio de viabilidade celular com MTT.
- ✓ Identificar as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da peçonha de *C. margaritatus* por RP-HPLC com atividade antibacteriana sobre diferentes bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.
- ✓ Purificar os componentes bioativos identificados (com atividades tumoricida e/ou antibacteriana) mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C₁₈.
- ✓ Caracterizar quimicamente os componentes bioativos isolados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF e por sequenciamento químico empregando-se a degradação de Edman.
- ✓ Caracterizar biologicamente os componentes bioativos isolados por meio da determinação dos MICs frente às bactérias empregadas e dos IC₅₀s frente às linhagens tumorais utilizadas no presente estudo.

- ✓ Caracterizar a atividade neurotóxica dos componentes biologicamente ativos identificados no presente projeto avaliando seus efeitos sobre o potencial de ação em células de mamíferos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho a peçonha do escorpião *C. margaritatus* foi submetida a fracionamento por RP-HPLC com o intuito de se obter frações cromatográficas com atividade citotóxica (antitumoral e antimicrobiana). A estratégia experimental empregada a fim de se atingir tais objetivos está representada na Figura 9, e concerne ao processo de identificação, separação e caracterização bioquímica e biológica dos componentes que apresentaram atividade.

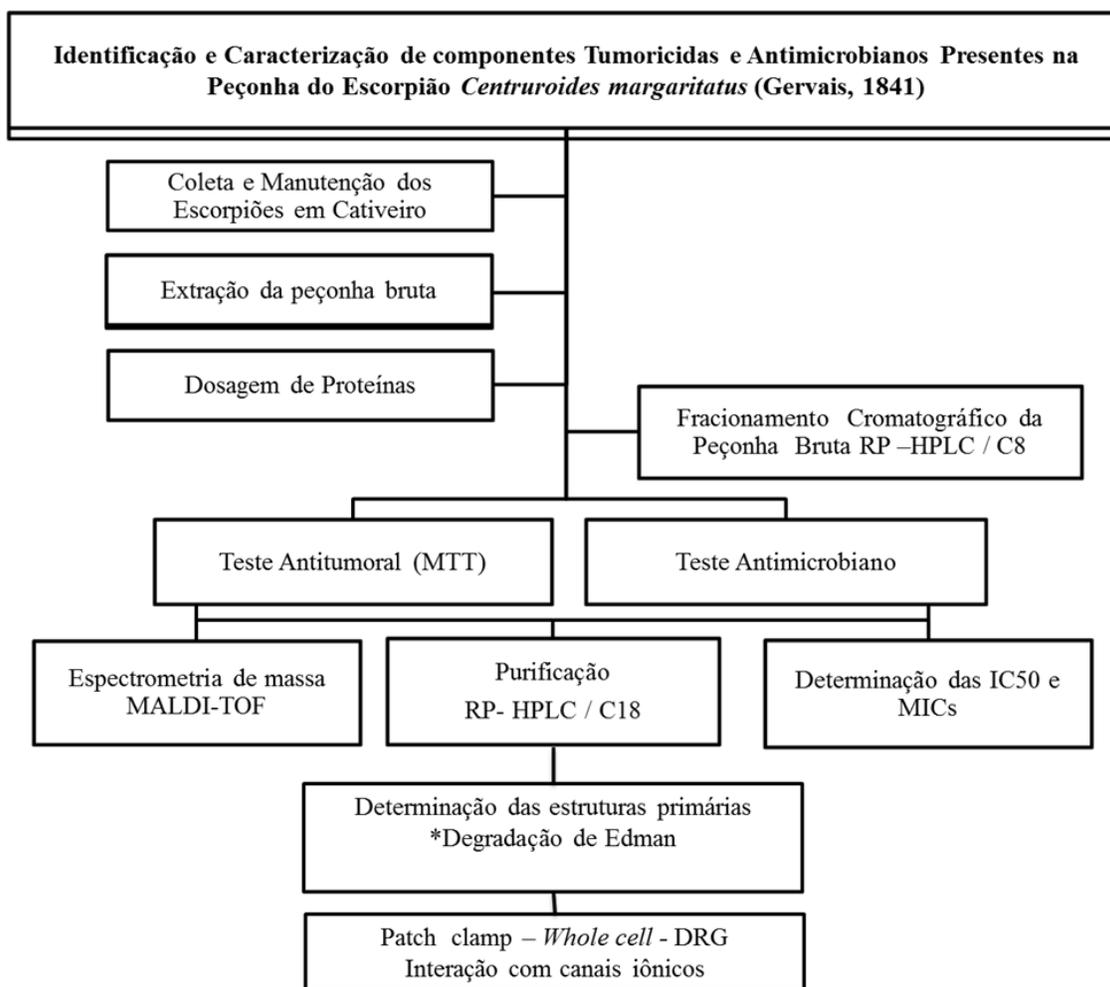


Figura 9. Esquema da estratégia experimental empregada.

4.1. Reagentes químicos

Foram utilizados apenas reagentes de grau analítico ou superior provenientes de diferentes fornecedores comerciais. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore Reagent Water System, USA).

4.2. Coleta e manutenção dos escorpiões em cativeiro

Os escorpiões da espécie *C. margaritatus* foram coletados na região do Vale do rio Patía no Estado do Cauca, Colômbia. Os escorpiões foram mantidos em cativeiro no Centro de Investigações Biomédicas (CIBUC) da Universidade do Cauca em terrários de plástico individuais, com água *ad libitum* e alimentação a cada duas semanas com outros aracnídeos e insetos.

4.3. Extração da peçonha bruta

A peçonha bruta foi obtida nas instalações do CIBUC (Colômbia) a partir de um grupo de escorpiões da espécie *C. margaritatus* (fêmeas e machos). A peçonha foi liberada após estímulo elétrico (50 V) aplicado na região entre o quarto e o quinto segmento da zona metassomal dos músculos que ficam perto da glândula secretora. Cada escorpião foi submetido à estimulação com cinco pulsos elétricos para garantir a liberação da peçonha aliada ao bem-estar dos animais. Após cada extração, a peçonha foi armazenada a -80 °C até posterior utilização.

4.4. Dosagem de proteínas e peptídeos

O *pool* de peçonha bruta obtido foi centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos a uma temperatura de 8 °C. Em seguida, o sobrenadante foi recuperado e submetido à determinação da concentração de proteínas utilizando o método de Lowry, utilizando BSA para confecção da curva de calibração.

Para a dosagem da concentração dos peptídeos foi empregada a fórmula apresentada abaixo (Aitken and Learmonth, 1996):

$$\text{Concentração de proteínas } (\mu\text{g/mL}) = 144 (A_{215} - A_{225}) / l,$$

onde l é a distância ótica de 0.1 mm.

4.5. Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta

Alíquotas da peçonha bruta (2,5 mg) foram dissolvidas em 200 μL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,12% (v/v) em água Milli-Q (solvente A), centrifugadas por 15 min a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna C_8 (Vydac 208TP54, 4,6 x 250 mm) previamente equilibrada com solvente A. A eluição foi realizada empregando-se uma lavagem por 5 min com 100% de solvente A, seguida de gradiente linear até 50% de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila (solvente B) por 50 min, de 50 a 100% de solvente B em 1 min e, finalmente, lavagem por 5 min com 100% de solvente B. A eluição foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min e detecção simultânea em 216 e 280 nm. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente, secas em Speed-Vac e armazenadas a -20°C até posterior utilização.

4.6. Ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais

4.6.1. Cultivo celular

As células das linhagens MCF-7 (humano) e B16F10 (murino) foram cultivadas em meio de cultura DMEM e suplementadas com L-glutamina (2 mM), soro fetal bovino (10%) e estreptomicina (50 mg/mL). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Ambas foram obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC). Devido ao conhecimento bem estabelecido de suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, essas linhagens têm servido como os modelos celulares mais utilizados na pesquisa de câncer, tanto no estudo de efeitos de compostos antitumorais quanto na elucidação dos mecanismos de ação dos mesmos.

A linhagem de fibroblastos normais murinos (NIH3T3) que foi utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rui Curi do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

4.6.2. Manutenção da cultura de células

Todos os procedimentos foram realizados com materiais esterilizados em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 20 minutos antes do uso. Alíquotas de células de câncer e fibroblastos foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente a 37°C. Alíquotas de 500 µL foram lentamente adicionadas em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico). Esse meio de cultura foi utilizado em todos os demais procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, e ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para assegurar a qualidade das células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes.

Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área), as células foram removidas do frasco de cultura e re-cultivadas em uma densidade menor. O meio de cultura foi descartado e foram adicionados 2 mL de solução de tripsina-EDTA ao frasco de cultura para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37°C, a correta remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente 10% das células foram re-cultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sendo o restante descartado após 24 horas não sem antes ter sido adicionado hipoclorito de sódio e detergente.

Após o término dos experimentos, as células de câncer e fibroblastos foram congeladas de acordo com o procedimento descrito a seguir. No estágio de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 5% de DMSO). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a -80°C por 24 horas. Depois os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

4.6.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para identificar a presença de compostos com atividade citotóxica na peçonha do escorpião *C. margaritatus* foram realizados ensaios de viabilidade celular com o emprego do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Existem diferentes métodos para avaliar a capacidade de um composto interagir com a célula e causar morte celular. A redução do MTT é um indicador do estado redox da célula. A quantidade de *formazan* produzido indica o potencial redutor do citoplasma e a viabilidade celular. O teste de MTT é um dos métodos mais utilizados para medir a proliferação celular e citotoxicidade. Atualmente é também utilizado para analisar as alterações metabólicas em células normais ou neoplásicas. O MTT é absorvido pelas células por endocitose, sendo em seguida reduzido no compartimento endolisossômico (vesículas), para depois ser transportado para o espaço extracelular, através de exocitose, na forma de cristais de formazan (Liu *et al.*, 1997). Esta técnica mede a atividade metabólica das células vivas pela sua capacidade de reduzir o sal tetrazólio a formazan usando a enzima succinato deshidrogenase mitocondrial (Mosmann, 1983) e as coenzimas (NADH e NADPH) (Berridge and Tan, 1993), sendo estabelecida então uma relação linear entre o número de células vivas e a quantidade de formazan produzida.

As células de câncer (MCF-7 e B16F10) e fibroblasto normal (NIH3T3) foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a

determinação do número de células, 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 40 µL de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS). Uma alíquota de 8 µL dessa mistura foi depositada gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado com o emprego da fórmula apresentada abaixo:

$$\text{Número de células /mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contadas}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

As células contadas foram transferidas para placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 12 a 16 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. As células (5 × 10³ células) foram inicialmente incubadas por 24 h. Após 24 h, o meio antigo foi descartado e substituído por 200 µL das frações da peçonha de

C. margaritatus, previamente preparadas em meio de cultura, e incubadas novamente durante 24 h junto com o seu respectivo controle negativo. Às 24 h, o meio de cultura em cada poço foi substituída por 200 µL de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT, seguido de uma incubação por 3 h. Por último foi adicionado 200 µL DMSO em todos os poços e realizada leitura espectrofotométrica a 590 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA). Cada experimento foi realizado em triplicata.

4.7. Ensaio antimicrobiano

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), foram cultivadas em 7 mL de meio Muller-Hinton, sob agitação a 37 °C. Quando a densidade óptica em 590 nm atingiu o valor de 1,0, cada suspensão bacteriana foi diluída em meio Muller-Hinton fresco, nas proporções de 1:50 para bactérias Gram-negativas e 1:100 para bactérias Gram –positivas. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a 5 × 10⁵ CFUs dependendo da linhagem bacteriana empregada) foi incubada por 22 horas a 37 °C com 50 µL de amostra (frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta

de *C. margaritatus* por RP-HPLC) ressuspensa em água Milli-Q estéril, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato).

Como controle representativo da ausência de proliferação bacteriana, foi realizada a incubação de formaldeído 0,4% (v/v) com a suspensão bacteriana e como controle representativo da proliferação máxima foi feita a incubação da suspensão bacteriana com água Milli-Q estéril. Após a incubação por um período de 24 horas, a 37 °C, as placas foram analisadas a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA).

Para verificar a presença de frações peptídicas ativas contra microorganismos na peçonha do escorpião *C. margaritatus*, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial em placa multipoços com as bactérias patogênicas Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13884) e *Proteus mirabilis* (ATCC 25933). Cada fração cromatográfica (resultante da reunião de três corridas cromatográficas) foi solubilizada em água Milli-Q e incubada com a respectiva suspensão bacteriana, de acordo com o método descrito anteriormente. Após 22 horas de incubação a 37°C, as placas foram analisadas em 595 nm por meio da leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA).

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi utilizado nos ensaios para a identificação da concentração mínima inibitória (MIC) dos peptídeos purificados, mas, nesse caso, os experimentos foram realizados com a diluição seriada do peptídeo partindo-se da concentração inicial de 128 µM. Os experimentos foram feitos em triplicata ou duplicata, dependendo da disponibilidade de material puro.

4.8. Purificação dos peptídeos

Os peptídeos bioativos de interesse foram acumulados e recromatografados por meio de RP HPLC em coluna C₁₈ (Shimadzu VP-ODS 4,6 x 150 mm). A coluna foi previamente equilibrada em solvente A. O gradiente utilizado foi estabelecido de acordo com o tempo de retenção de cada um dos peptídeos de interesse na etapa cromatográfica

prévia realizada em coluna C₈. A eluição foi feita com fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 216 e 230 nm. Os peptídeos purificados foram coletados, secos a vácuo e empregados nos ensaios de caracterização química e biológica.

4.9. Espectrometria de massas

As frações peptídicas obtidas foram caracterizadas por meio da determinação de suas massas moleculares em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Alemanha).

As frações foram dissolvidas em 0,1% (v/v) de TFA em água Milli-Q e 1 µL de cada fração foi aplicado numa placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz reconstituída de HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) (20 µg/µL) e matriz de ácido sinapínico (20 µg/µL) ressuspendidas em 0,1% (v/v) TFA em 50% (v/v) acetonitrila. As análises foram realizadas no modo refletor de íons positivos. O equipamento foi previamente calibrado na faixa de 1000 – 10.000 Da com o uso da solução PepMix e ProtMix (da Bruker Daltonics) para a identificação das massas correspondentes aos compostos biologicamente ativos.

4.10. Ensaio hemolítico

O ensaio hemolítico utilizado foi modificado do protocolo descrito por Onuma *et al.* (1999). Eritrócitos de sangue humano O⁺, obtidos no Hemocentro de Brasília, foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com tampão Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. Utilizou-se o mesmo tampão para solubilizar as amostras e preparar uma solução 1% (v/v) de hemáceas. As amostras ressuspendidas em 100 µL de tampão foram incubadas por 60 min a temperatura ambiente com 100 µL da suspensão de eritrócitos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min. Uma alíquota de 100 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo chato (Nunc, Denmark) e a leitura da absorbância realizada a 405 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA). Para as amostras de referência utilizaram-se 100 µL da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton

X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e 100 μ L da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) com tampão salino como referência de 0% de hemólise.

4.10.1. Screening

A fim de verificar quais componentes da peçonha de *C. margaritatus* apresentariam atividade hemolítica, cada fração cromatográfica de uma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em tampão e incubada com a suspensão de hemáceas de acordo com o método descrito acima.

4.10.2. Determinação da HC₅₀

Para a determinação da concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC₅₀), os peptídeos de interesse purificados foram diluídos serialmente a partir de uma solução estoque de 64 μ M e incubados com a solução de eritrócitos como descrito anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.11. Avaliação de atividade no potencial de ação de neurônios DRGs

4.11.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com peso entre 220 e 280 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os procedimentos de utilização dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais com o protocolo número 43/2005.

4.11.2. Dissociação de neurônios DRG

Os métodos utilizados para dissociação de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRG) foram baseados no protocolo estabelecido por Eckert et al. (1997).

4.11.3. Dissecação

Os ratos foram decapitados por guilhotinamento. A pele do dorso foi removida, assim como a parte anterior do gradil costal e vísceras torácicas. Também foram removidos os corpos vertebrais, deixando expostos a medula e os nervos que chegam a ela. Nos nervos posteriores (que conduzem informações aferentes) estão localizados os gânglios da raiz dorsal. Dos DRG obtidos foram removidos o excesso de tecido conjuntivo e as meninges e foram seccionados para expor seu interior durante o tratamento enzimático. Para o tratamento enzimático foram utilizadas a solução 1 constituída por papaína (1 mg/mL), ativada pela adição de cisteína (0,03 mg/mL), diluídas em solução de Ringer filtrada e a solução 2 contendo colagenase (2,5 mg/mL), diluída em solução de Ringer filtrada.

4.11.4. Dissociação

Na dissociação e cultura de neurônios DRG foram utilizadas as soluções Ringer mamífero, sem adição de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

Os DRG foram incubados a 37°C em tubos de centrifugação de 15 mL contendo 3 mL de solução enzimática 1 por 20 min, e foram gentilmente agitados a cada 5 min. Foram centrifugados por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. A solução enzimática 2 foi adicionada e o procedimento de incubação e centrifugação foi repetido.

Quando o tratamento enzimático estava completo, o meio de cultura F12 contendo 10% soro fetal bovino foi adicionado para interromper a ação enzimática. O processo de centrifugação foi realizado e o sobrenadante descartado. Um mL de F12 foi acrescentado e os DRG foram submetidos à trituração mecânica realizada com pipetas de vidro com as pontas polidas em fogo com diâmetro interno final em torno de 2 mm.

Após a trituração mecânica, o meio de cultura encontrava-se repleto de corpos celulares neuronais em suspensão. Esses neurônios foram transferidos para as placas de vidro previamente cobertas com poli-L-lisina e posteriormente com laminina. Para permitir a adesão dos neurônios aos discos de vidro, estes foram colocados em estufa (37°C, 5%

CO₂, 100% de umidade) por no mínimo 2 horas. Após o período de repouso para adesão celular, foi adicionado meio de cultura L15 para nutrir os neurônios.

4.11.5. Manutenção dos neurônios

Os neurônios foram mantidos com meio de cultura L15, permanecendo em temperatura ambiente por 24 horas, para que se tornassem viáveis para os registros eletrofisiológicos. Os neurônios foram utilizados dentro de 72 horas após o seu isolamento.

4.11.6. Registro eletrofisiológico

O potencial de ação foi registrado através da técnica de *patch clamp*, na modalidade *whole-cell* (Hamill et al., 1981). Os experimentos foram realizados em uma mesa antivibratória produzida com o auxílio da serralheria do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com visualização em microscópio invertido modelo CK2 Olympus (Japan) com oculares de 20x e objetiva de 40x de aumento. O posicionamento da micropipeta era realizado através de dois sistemas de micromanipulação independentes: um mecânico Mitutoyo (Japan) e outro piezoelétrico (Newport M-42- Irvine, CA, USA) com controle remoto triaxial (PCS-201 – Burleigh Instruments Inc., Fishers, NY, USA). As correntes foram registradas através de um amplificador (Axonpatch 200B - Axon Instruments, USA), ligado a um conversor analógico-digital (Digidata série 1200, Axon Instruments, USA), gerenciado pelo aplicativo pClamp 7 (Axon Instruments, USA). As pipetas eram acopladas ao sistema através do pipete holder, que mantinha um eletrodo de Ag/AgCl mergulhado na solução de pipeta. O circuito elétrico foi fechado pelo eletrodo de referência de Ag/AgCl, que se encontrava mergulhado na solução de banho.

Pipetas com resistência entre 1,0 e 1,5 MΩ foram fabricadas a partir de capilares de vidro (Patch Glass, PG150T-7.5, Warner Instrument) usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP 830 Narishige, Tokyo, Japan), tendo as pontas polidas em uma micro forja (MF 830 Narishige, Tokyo, Japan). As pipetas foram cobertas com cera dental até aproximadamente 0,1 mm da ponta a fim de reduzir a sua capacitância elétrica.

O potencial de ação foi gravado utilizando o amplificador axopatch 200b (Molecular Devices). A solução de banho continha (KCl 5,0; CaCl₂ 2,0; NaCl 115; HEPES 10,0; MgCl₂ 1,0; TEA-CL 20,0; CdCl₂ 0,2; NiCl₂ 0,2; Glicose 5,0; e o pH ajustado a 7,4 com NaOH), a solução da pipeta continha (KCl 30,0; K-gluconato 110; NaCl 4,0; HEPES 10,0; EGTA 11,0; MgCl₂ 5,0; MgATP 2,0; NaGTP 0,3). (concentrações dadas em mM).

Para a medida das correntes, um selo de alta resistência, com valores superiores a 1 GΩ, chamado de giga-selo, era formado entre a membrana celular e a parede interna da pipeta, aplicando-se uma pequena pressão negativa. Posteriormente, uma sucção adicional permitia a ruptura da membrana da celular, ocorrendo a difusão da solução da pipeta para dentro da célula e a obtenção da configuração *whole-cell*, quando a capacitância da membrana e a resistência de acesso eram compensadas.

Foi determinado o limiar do potencial de ação pela injeção de correntes aumentadas sucessivamente em passos de 20 pA e de duração de 200 ms até que um potencial de ação foi gerado. Posteriormente, as células foram estimuladas a 1.5 vezes esse limiar a cada 10 s. Depois de gravar pelo menos 10 potenciais de ação para obter uma linha de base estável (controle), cada uma das frações da peçonha a serem avaliadas foram adicionadas individualmente ao banho. Os potenciais de ação foram registrados por pelo menos 200 s (20 potenciais de ação) e imediatamente após, o limiar do potencial de ação foi medido novamente para testar alterações.

Depois de conseguir o registro para cada componente avaliado, o banho foi lavado até eliminar totalmente o rastro destes e obter novamente o registro base ou controle, no caso das vezes que as frações exerceram atividade sobre os neurônios.

4.12. Sequenciamento químico dos peptídeos isolados

As estruturas primárias parciais dos peptídeos F24, F30, F31, F34 e F38 foram determinadas por degradação de Edman, em seqüenciador automático em seqüenciador automático de peptídeos modelo PPSQ-21 (Shimadzu Co., Japão), de acordo com as orientações do fabricante. PTH-aminoácidos foram identificados utilizando-se coluna de

fase reversa PTH-C₁₈ acoplada a equipamento de HPLC modelo LC20 (Shimadzu Co., Japão). O sistema cromatográfico foi calibrado com padrões de PTH-aminoácidos antes de cada análise.

4.13. Análises computacionais

A partir das seqüências obtidas, procedeu-se análises computacionais objetivando-se determinar o grau de similaridade com famílias de toxinas já descritas na literatura. Para o cumprimento deste objetivo foi utilizado o programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) disponível no sítio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. A busca foi feita no banco de dados “nr” (não-redundante) e o parâmetro utilizado foi o próprio *default* (padrão) do BLAST. O programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) foi empregado para produzir os alinhamentos múltiplos entre as seqüências analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Dosagem de proteínas

Após a coleta e extração da peçonha bruta, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Lowry, procedimento amplamente utilizado na quantificação de proteínas. A curva de calibração foi realizada empregando-se albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 0 a 150 μg (em triplicata). Este procedimento foi repetido várias vezes no decorrer dos quatro anos do doutorado, tendo utilizado cerca de 80 mg de peçonha, a qual foi sempre dividida em alíquotas de 5,0 mg, secada a vácuo e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua utilização.

5.2. Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta

A Figura 10 apresenta o perfil cromatográfico típico resultante do fracionamento da peçonha bruta do escorpião *C. margaritatus* empregando coluna de fase reversa C_8 . O fracionamento cromatográfico de alíquotas de 2,5 mg resultou em uma série de picos bem resolvidos e com alta reprodutibilidade, fornecendo, em média cerca 50 frações cromatográficas. Observamos que durante os primeiros 30 minutos de cromatografia são escassos os componentes eluídos, enquanto que dos 30 até 45 minutos, o que corresponde ao gradiente de 25 a 40% de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, é eluída a maioria dos componentes presentes nessa peçonha. Já no final da corrida cromatográfica observa-se a eluição de alguns poucos componentes, de caráter mais hidrofóbico (40 a 100% TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila) com perda evidente na resolução.

As cromatografias realizadas foram feitas com o emprego de um gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 1,0 mL/min durante 65 minutos. Após a identificação das frações bioativas de interesse, foi observado que a maioria dessas frações eluíam ao final do gradiente aplicado, entre 25–40% do gradiente de acetonitrila, demonstrando o caráter hidrofóbico dessas frações.

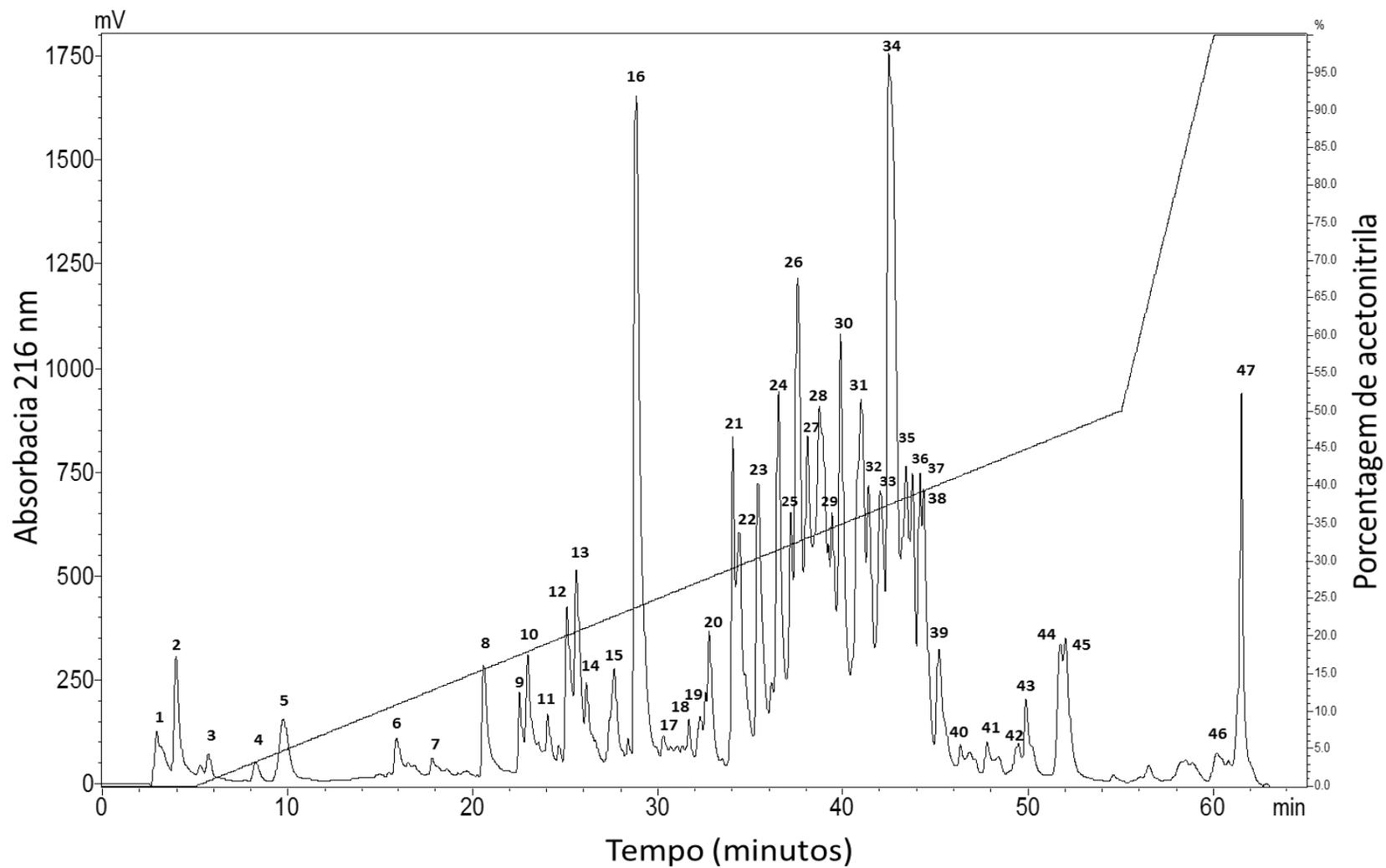


Figura 10. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha do escorpião *C. margaritatus*. As frações cromatográficas foram eluídas com o emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 1,0 mL/min, durante 65 minutos, detecção em 216. As frações eluídas foram coletadas manualmente, secas a vácuo e armazenadas a -20 °C.

5.3. Varredura de massas moleculares dos componentes presentes na peçonha de *C. margaritatus*

Cada uma das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta de *C. margaritatus* em coluna C₈ foi analisada de forma independente por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, empregando como matrizes, ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) e ácido sinapínico (SA). As frações resultantes de uma única cromatografia foram ressuspensas em 10 μ L de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e aplicadas na proporção 1:1 (1,0 μ L) na placa de aço inoxidável juntamente com cada tipo de matriz.

Como observado nas tabelas 5 e 6, poucos dos componentes eluem totalmente puros do primeiro passo cromatográfico, mas esta varredura ajudou no processo de reconhecimento da distribuição de massas moleculares no decorrer do gradiente, assim como na identificação dos componentes que apresentaram atividade biológica (nos ensaios de atividade antitumoral e antimicrobiano). Na Tabela 5, os adutos de Na⁺ e K⁺ observados foram excluídos da lista de massa moleculares assim como os componentes duplamente carregados para melhor visualização dos dados obtidos.

As massas moleculares das frações cromatográficas F8 até F37 foram identificadas com a matriz de HCCA. A partir dessa fração, a detecção dos peptídeos foi feita com uso da matriz de SA que é empregada na ionização de proteínas. A fração F39 que apresenta baixa massa molecular ionizou melhor na presença de HCCA.

As frações F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7 não geraram íons moleculares detectáveis no sistema de análise utilizado, talvez em virtude de incompatibilidade com o sistema de ionização/desorção empregado. É possível se tratar de polímeros ou compostos de baixa massa molecular como íons, aminoácidos livres, aminas biogênicas, acilpoliamidas, compostos heterocíclicos ou alcaloides.

No total foram observados 99 componentes com massas moleculares distintas. Na Figura 11 pode-se observar a distribuição, em porcentagem, das massas moleculares dos componentes da peçonha do escorpião *C. margaritatus* em intervalos de 1.000 Da. Observa-se que o intervalo com maior número de componentes é o que compreende desde 6.001 até 7.000 Da com 23 componentes, seguido do intervalo entre 7.001 e

8.000 Da com 18. Componentes com massas moleculares maiores do que 10.001 Da foram agrupados num único intervalo (> 10.000 Da) com 12 componentes observados.

Tabela 5. Relação das massas moleculares dos componentes isolados da peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* detectados por MALDI-TOF MS com emprego de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico.

Fração cromatográfica	Massa Molecular (Da) [M+H]⁺
F8	2.291
F9	3.546 - 2.612 - 3.568 - 3.585 - 3.628 - 3.655 - 3.678 - 3.707
F10	2.611 - 1.482 - 3.545
F11	3.544 - 2.241
F12	1.870 - 4.191
F13	1.510 - 4.181 - 4.055
F14	3.228
F15	2.115 - 1.857 - 3.573
F16	4.179 - 2.820
F17	3.982
F18	4.243 - 3.339 - 4.057 - 4.117
F19	4.920 - 2.459 - 4.232
F20	4.795
F21	4.048 - 6.255 - 6.350
F22	4.137 - 3.914 - 4.313
F23	6.601
F24	6.845 - 3.841 - 4.343 - 4.472 - 4.507 - 5.748 - 5.930 - 6.508
F25	5.746
F26	4.469 - 5.746 - 6.715
F27	6.998 - 5.193
F28	7.385 - 6.257 - 6.475
F28.b	2.560 - 7.586
F29	6.871
F30	7.411
F31	7.304
F31.b	7.050 - 6.730 - 6.811 - 7.141 - 7.412
F32	7.389 - 6.751
F33	6.907 - 6.798 - 7.480
F34	6.801 - 6.134 - 7.791
F35	6.528
F36	6.002 - 7.505 - 7.629
F37	6.619 - 6.560
F39	3.375

Tabela 6. Relação das massas moleculares dos componentes isolados da peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* detectados por MALDI-TOF MS com emprego de matriz de ácido sinapínico.

Fração cromatográfica	Massa Molecular (Da) [M+H] ⁺
F38	6.344 - 6.967 - 12.904 - 13.344 - 13.460
F40	5.818 - 7.294 - 7.470 - 7.638
F41	6.342 - 7.692
F42	5.884 - 6.342 - 6.089 - 7.173
F43	7134 - 7.361 - 10.703
F44	48.896
F45	44.527 - 77.810 - 9.483 - 10.890
F46	29.326 - 27.712
F47	13.353 - 26.726

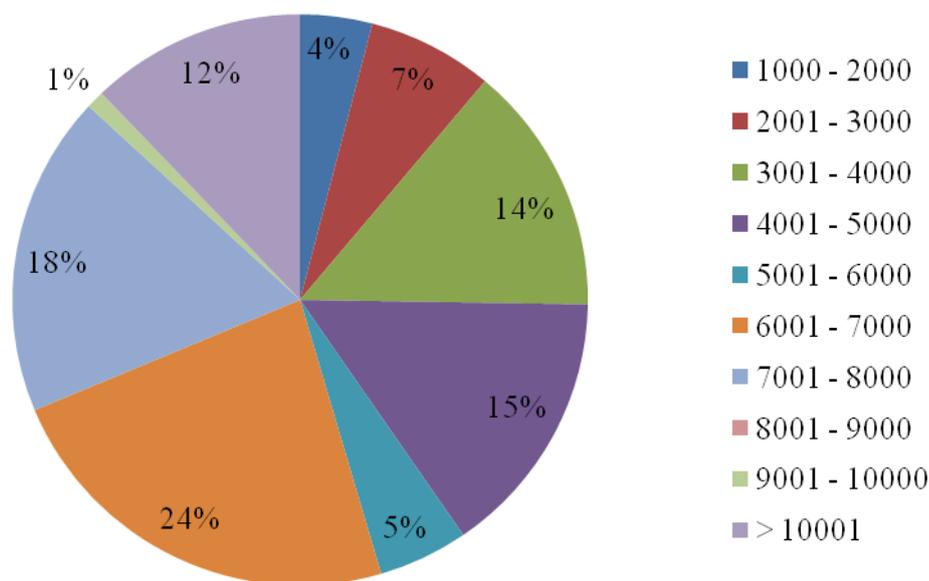


Figura 11. Porcentagem de distribuição de massas moleculares dos componentes presentes na peçonha do escorpião *C. margaritatus*.

É conhecido que neuropeptídios escorpiônicos ativos contra os canais para Na⁺ pertencem à família das neurotoxinas de cadeia longa, que contêm entre 61 e 76 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto em posições similares nas suas sequências (Possani et al., 1999; Gurevitz et al., 2007). Seguindo esta lógica e de acordo com os resultados aqui apresentados, no caso do escorpião *C. margaritatus*, este grupo

de toxinas corresponderia ao grupo com maior número de componentes observados, aproximadamente 42% dos componentes detectados.

Sabe-se que existem toxinas escorpiônicas do tipo α e do tipo β que interagem com os canais para sódio por diferentes mecanismos (Catterall *et al.*, 2007; de la Vega and Possani, 2007; Stevens *et al.*, 2011) e que estão diretamente ligadas à sensação de dor, fazendo que exista perda ou o ganho de função (Catterall and Yu, 2006). Assim, é importante focalizar neste grupo de componentes da peçonha do escorpião *C. margaritatus* como possíveis ferramentas de estudo e análise do comportamento do canal, assim como a própria interação dos peptídeos com a membrana celular e suas possíveis consequências e funções biológicas.

Em contraste, encontramos também prováveis peptídeos que afetam canais para potássio, que são reconhecidos por serem toxinas de cadeia curta, compostas de 22-42 resíduos de aminoácidos e que contem três ou quatro pontes dissulfeto (Tytgat *et al.*, 1999), mas também podem ser encontrados polipeptídios de 50 a 75 resíduos de aminoácidos, como as β -KTx (Zhu *et al.*, 2011; Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

Mudanças na função do canal de K^+ estão associadas com doenças cardíacas, apoptose e com a oncogênese, além de vários distúrbios neuro-degenerativos e neuromusculares (Shieh *et al.*, 2000; Bergeron and Bingham, 2012). As toxinas para potássio se ligam aos canais, bloqueando-os, impedindo assim o fluxo do íon potássio através das membranas celulares, gerando alteração na excitabilidade celular. Na peçonha de *C. margaritus* foi possível observar que cerca de 21% dos componentes detectados apresentam massa molecular entre 2000 e 4000 Da.

Em um estudo recente, Valdez-Velázquez e colaboradores (2013) realizaram o fracionamento cromatográfico da peçonha de *Centruroides tecomanus* seguido da análise do perfil de massas moleculares por *fingerprinting*. Com o emprego dessa abordagem foram obtidos quatro grupos de componentes com massas moleculares distintas: 200-1000 Da (8,7%), 1000-5500 Da (47%), 5.500-8.500 Da (33,7%), e 8.500-44.392 Da (10,6%). Como pode se observar o perfil de distribuição dos grupos de acordo com as massas moleculares detectadas foi semelhante ao nosso, com a maioria dos peptídeos com massas moleculares entre 3000-4000 e 6000-7000 Da, que correspondem provavelmente a peptídeos afetam os canais para K^+ e os canais para Na^+ ,

respectivamente (Valdez-Velázquez *et al.*, 2013). Estes dados também estão de acordo com os obtidos por Batista e colaboradores (2004) com a peçonha do escorpião amazônico *Tityus cambridgei* (Batista *et al.*, 2004a).

5.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Após o fracionamento da peçonha do escorpião *C. margaritatus* em RP-HPLC, cada uma das frações cromatográficas eluídas foram secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C. Após a realização de seis (06) corridas cromatográficas, as frações provenientes das 6 corridas foram reunidas e foi realizado um ensaio do tipo *screening* para avaliação da atividade anti-proliferativa das frações obtidas sob células cancerígenas.

Cada uma das frações foram ressuspensas em meio DMEM e submetida ao teste de viabilidade celular com o emprego do teste de viabilidade celular com MTT (triplicata) para as linhagens MCF-7 e B16F10. Para comprovar a hipótese de que alguns dos componentes da peçonha bruta são os responsáveis pela atividade citotóxica em eritrócitos de camundongo, previamente observada para a peçonha bruta (Dueñas-Cuellar, 2009).

Após 24 horas de incubação, varias frações apresentaram capacidade inibitória com diferentes porcentagens de inibição sobre os tipos celulares tumorais MCF-7 (câncer de mama humano) e B16F10 (câncer de pele murino) ao serem comparadas aos controles empregados (Tabela 7). Em geral, as frações inibitórias mostraram-se mais efetivas sobre as células MCF-7, sendo a fração identificada como F1 a que induz maior porcentagem de morte celular, apresentando atividade anti-proliferativa nos dois tipos de células cancerígenas testadas.

De posse desses resultados, decidiu-se focalizar nas frações que promoveram pelo menos 30% de inibição da proliferação celular (ressaltadas em cinza na Tabela 7). As frações F1, F24 E F30 foram selecionadas para etapas posteriores do projeto e novas corridas cromatográficas foram realizadas com a peçonha bruta de *C. margaritatus* para se obter tais frações com alto grau de pureza e em quantidades suficientes para realização dos ensaios biológicos com concentrações conhecidas.

Tabela 7. Efeito inibitório sobre a proliferação de células cancerígenas após incubação com as diferentes frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha do escorpião *C. margaritatus* por RP-HPLC.

Fração cromatográfica	% Inibição ou Morte celular		Fração cromatográfica	% Inibição ou Morte celular	
	B16F10	MCF-7		B16F10	MCF-7
1	58,2	96,7	25	0	45,6
2	0	17,8	26	0	47,1
3	0	10,9	27	5,1	39,7
4	0	17	28	0,5	34,8
5	0	19,7	29	0	44,9
6	0	11,9	30	9,8	43,8
7	0	13,4	31	0	40,2
8	0	12,4	32	0	23,8
9	0	22,8	33	13	48,5
10	0	18,2	34	10,6	41
11	0	17,2	35	13,4	31,8
12	0	29,7	36	11,1	39,7
13	0	26,3	37	1,7	34,9
14	0	17,3	38	0,5	34,2
15	0	24,5	39	0,1	35,2
16	0	24,4	40	0	30,2
17	0	11,5	41	36,5	32,4
18	39,8	20,8	42	10,7	31
19	0	13,6	43	23	21,3
20	0	27,7	44	11,6	29,5
21	0,3	33,4	45	0	28,4
22	0	40	46	11,1	21,1
23	0	32,1	47	8,9	0
24	0	40			

* Os dados em cinza representam os componentes com porcentagem de inibição da proliferação celular maior ou igual a 30%.

Ensaio antimicrobiano

O ensaio antimicrobiano foi realizado de acordo a metodologia já explicada utilizando as bactérias patogênicas Gram-negativas *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* e a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Algumas das frações eluídas da primeira etapa cromatográfica foram testadas com o intuito de se realizar uma primeira varredura (*screening*) para identificar frações cromatográficas com potencial inibitório sobre a

proliferação das bactérias testadas. Entre as frações que apresentaram atividade foram selecionadas aquelas que inibiram o crescimento bacteriano em pelo menos 25% (ressaltadas em cinza na Tabela 8). Sendo assim, catorze (14) frações cromatográficas apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* (frações **F22, F26, F27, F28, F29, F31, F32, F33, F34, F36, F37, F38, F39 e F42**), nove (9) apresentaram também atividade sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (frações **F26, F29, F31, F32, F33, F34, F37, F38 e F39**) e, finalmente, catorze (14) frações cromatográficas apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *P. mirabilis* (frações **F8, F18, F26, F27, F29, F31, F33, F34, F36, F37, F38 e F39**), sendo que algumas das frações ativas sobre *P. mirabilis* não apresentaram efeitos inibitórios sobre as demais bactérias testadas (frações **F8 e F18**) (Tabela 8).

A fração identificada como **F39** com atividade inibitória sobre o crescimento celular das três bactérias empregadas corresponde à toxina previamente purificada e caracterizada quimicamente por Guerrero-Vargas em 2008, nomeada Margatoxina 3 (MgTx3), isolada do escorpião *Centruroides margaritatus*.

As diferenças observadas nos percentuais de inibição das frações cromatográficas sobre o crescimento celular das três bactérias testadas evidenciam diferenças no potencial inibitório de cada fração cromatográfica eluída da peçonha do escorpião *C. margaritatus* sobre cada uma das bactérias avaliadas, visto que os ensaios foram realizados com o mesmo volume de cada fração cromatográfica nas três linhagens bacterianas utilizadas.

Ao comparar os resultados do *screening* antitumoral e antimicrobiano observamos que, mesmo em diferentes proporções, os componentes com maior caráter hidrofóbico são os que apresentam maior atividade inibitória e encontramos também que algumas frações apresentam atividade inibitória tanto para células tumorais como para bactérias. Na Tabela 8 encontram-se sinalizados com asterisco os componentes antibacterianos que apresentaram também potencial de inibição sobre o crescimento celular maior ou igual a 40% na linhagem de câncer de mama MCF-7.

Tabela 8. Taxas de inibição do crescimento celular das bactérias Gram-negativas *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* e da bactéria Gram-positiva *S. aureus* promovidas por frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta do escorpião *Centruroides margaritatus*.

Inibição da proliferação celular (%)			
Fração cromatografica	<i>P. mirabilis</i> Gram-negativa	<i>K. pneumoniae</i> Gram-negativa	<i>S. aureus</i> Gram-positiva
F8	26,28	0	0
F16/MgTx1	21,69	0	0
F17	19,73	0	0
F18	25,23	0	0
F21	21,17	0	6,98
F22*	22,09	44,99	0,00
F23	20,12	0,00	14,91
F23a	20,38	8,11	16,28
F26*	40,55	62,16	36,80
F27*	53,78	80,92	19,56
F28	11,35	37,04	0
F28a	30,21	1,75	0
F28b	30,60	0	0
F29*	36,62	52,62	28,32
F30*	36,62	71,70	25,85
F32	24,84	69,48	55,95
F33*	31,78	84,42	66,35
F34*	27,19	85,37	79,48
F36*	56,53	66,93	71,82
F37	30,34	85,06	86,05
F38	43,17	86,33	83,58
F39/MgTx3	43,17	82,19	81,40
F42	24,84	51,03	4,24

* Os dados em cinza representam os componentes com porcentagem de inibição bacteriana maior do que 25%, e as frações marcadas com asterisco são aquelas que também apresentam atividade antiproliferativa sobre células tumorais maior de 40%.

5.5. Purificação dos peptídeos

Após identificação das frações cromatográficas biologicamente ativas, foi iniciado o processo de purificação de tais frações com vistas a se avançar na sua caracterização química e biológica. As frações de interesse foram submetidas a recromatografia em sistema de RP-HPLC empregando-se agora uma coluna C₁₈ com maior capacidade de resolução.

5.5.1. Peptídeos antitumorais

Como observado nos resultados do *screening* antitumoral, somente as frações F1, F18 e F41 tiveram atividade inibitória maior do que 30% para a linhagem B16F10. Já para a linhagem MCF-7, vinte e uma (21) frações apresentaram atividade inibitória maior do que 30%. Dentre estas, foram escolhidas algumas, para dar continuidade aos processos de purificação e caracterização, como relatado a seguir.

5.5.1.1. Fração F1

A fração F1 foi submetida a recromatografia em RP-HPLC em coluna C₁₈ resultando na eluição de oito frações distintas (Figura 12) as quais foram avaliadas quanto à sua capacidade citotóxica com o uso do MTT para identificar qual(is) dentre elas era(m) responsável(is) pela atividade antitumoral observada no primeiro ensaio de atividade citotóxica (*screening*). O resultado da prova antitumoral permitiu constatar que apenas a primeira fração cromatográfica (denominada Cm1.F1) obtida nessa segunda etapa cromatográfica apresentou atividade inibitória. As porcentagens de inibição foram iguais a 47,2% e 22,5% para as linhagens cancerígenas B16F10 e MCF-7, respectivamente, resultado significativo quando comparado com o controle realizado com células de fibroblasto normais da linhagem celular NIH3T3 que apresentaram uma porcentagem de inibição de 14,5% (Tabela 9). Neste ensaio foi utilizada uma dose fixa de 1,10 µg/poço (200 µL). O ensaio foi realizado em triplicata para cada tipo celular.

A fração Cm1.F1 possui caráter altamente hidrofílico, é solúvel em água, água acidificada (0,12% (v/v) TFA) e metanol. A fração Cm1.F1 não foi identificada por meio da análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Inferindo tratar-se de um composto que não apresenta composição proteica ou que sua massa molecular seja muito baixa ocultando-se entre as massas moleculares dos componentes das matrizes utilizadas no processo de ionização/dessorção.

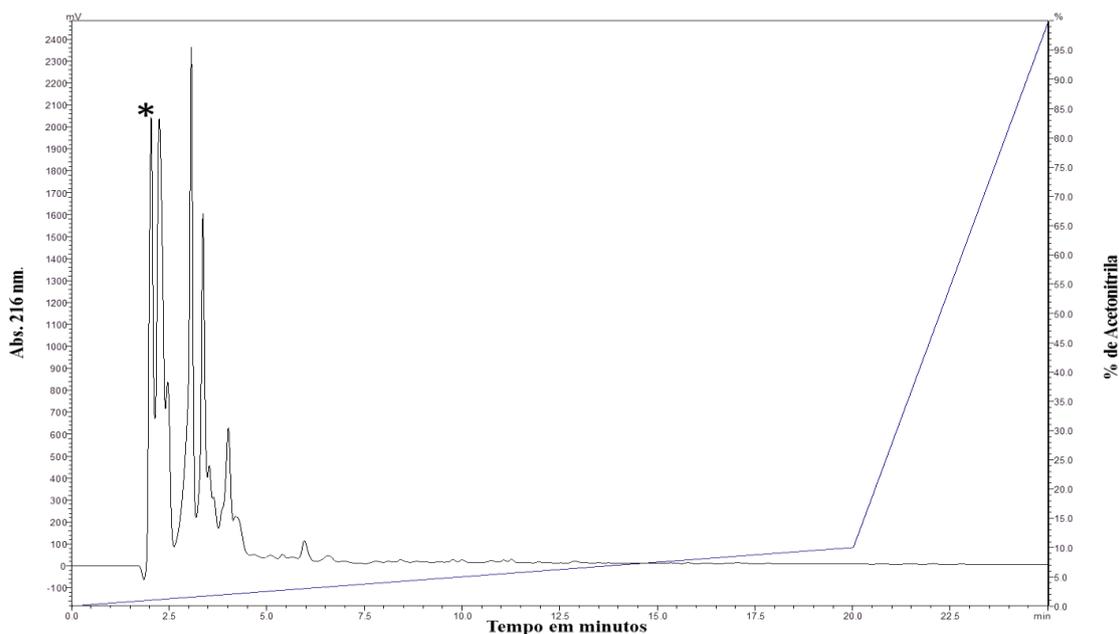


Figura 12. Perfil cromatográfico do fracionamento da fração Cm1.F1 eluída da peçonha do escorpião *C. margaritatus* em coluna de fase reversa C₁₈. O presente cromatograma foi obtido com a recromatografia da fração F1 obtida com a reunião de um total de 16 cromatografias em RP-HPLC em coluna C₈. No momento da recromatografia, a amostra foi dissolvida em 200 µL de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi injetado em em coluna de fase reversa do tipo C₁₈, previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 0,5 mL/min durante 25 minutos. A fração citotóxica Cm1.F1 está identificada por um asterisco (*).

Tabela 9. Porcentagem de inibição celular promovida pela adição de 0,0055 µg/µL da fração Cm1.F1 em células tumorais (B16F10 e MCF-7) e células normais (NIH3T3) após 24 horas de tratamento.

Fração	NIH3T3	B16F10	MCF-7
Fração Cm1.F1	14,5%	47,2%	22,5%

A fração Cm1.F1 também foi avaliada quanto a sua capacidade de promover lise eritrocitária. Nesse caso foi realizada uma diluição seriada da fração Cm1.F1 partindo-se da concentração de 50 µg/µL e não se observou efeito hemolítico significativo.

As frações F24, F30 e F31 com características citotóxicas possuem caráter hidrofóbico e foram recromatografadas nas mesmas condições de eluição empregando-se uma coluna de fase reversa do tipo C₁₈. As frações resultantes dessas recromatografias foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila

durante 55 minutos, com fluxo constante de 0,8 mL/min e, em seguida, foram avaliadas quanto à sua atividade citotóxica sobre as linhagens celulares B16F10, MCF-7 e NIH3T3.

5.5.1.2. F24

A fração F24 pode ser facilmente purificada com apenas um passo recromatográfico nas condições relatadas anteriormente (Figura 13). Esta fração apresenta massa molecular de 6.845 Da (Figura 14).

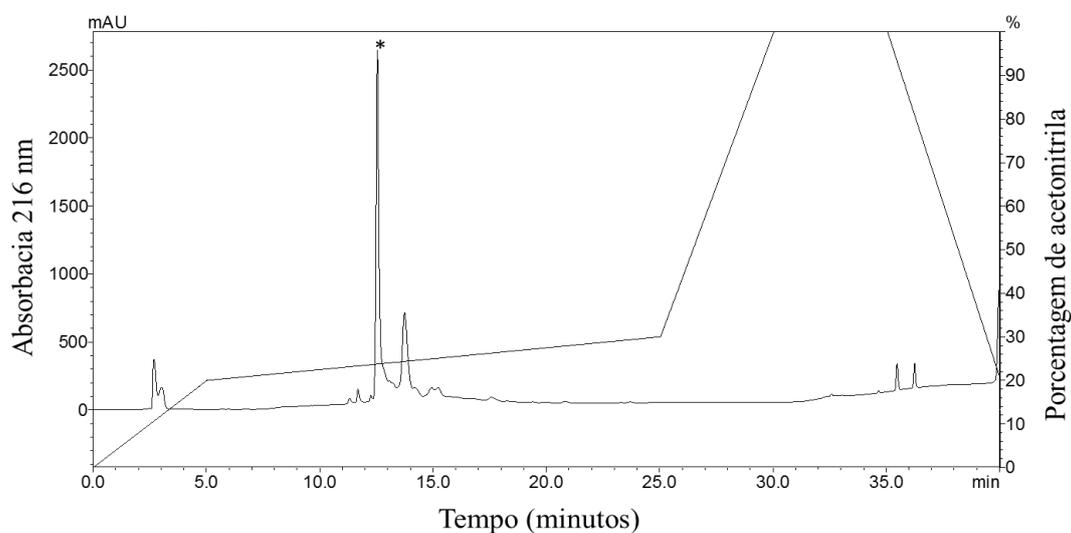


Figura 13. Perfil cromatográfico típico da purificação da fração F24 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* em coluna de fase reversa C₁₈. No momento da recromatografia, a amostra foi dissolvida em 200 µL de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi injetado em coluna de fase reversa do tipo C₁₈, previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 0,8 mL/min durante 40 minutos. A fração F24 está identificada por um asterisco (*).

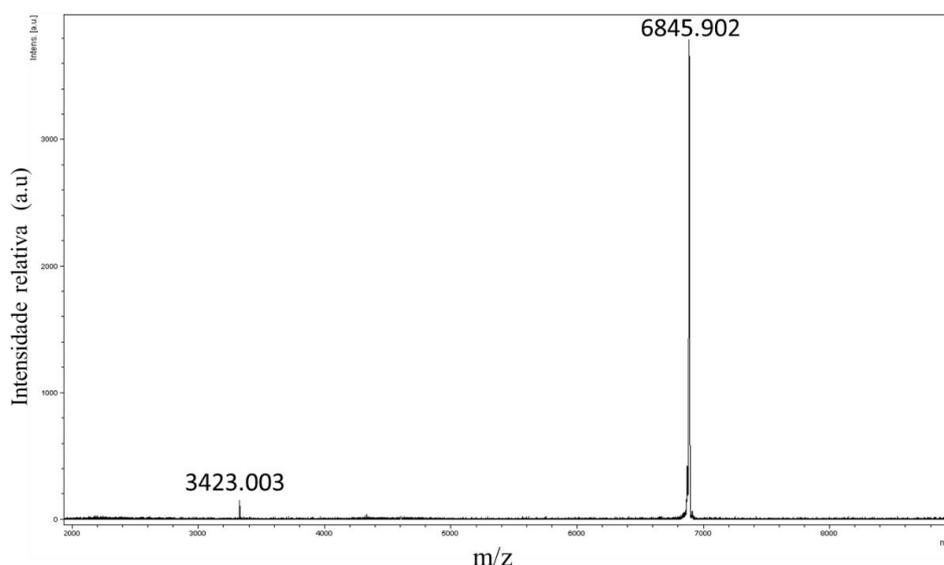


Figura 14. Espectro de massas da fração bioativa F24 (que apresenta atividade citotóxica contra as células tumorais B16F10 e MCF-7) isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* com massa molecular de 6.845 Da $[M+H]^+$ e sua correspondente dupla carga 3.423,003 $[M+H]^+$.

A atividade citotóxica do peptídeo F24 foi avaliada sobre células tumorais (B16F10 e MCF-7) e um tipo de célula normal (NIH3T3). Cada tipo celular foi avaliado em triplicata e cada poço continha 2.3 μg de amostra o que corresponde a 0,0115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabela 10). Observou-se uma inibição diferenciada entre as células normal e tumorais, sugerindo que a F24 atua mais eficientemente inibindo o crescimento de células tumorais do que células normais. A capacidade citolítica da fração F24 foi testada também sobre eritrócitos humanos e não observou-se efeito deletério em nenhuma das concentrações testadas experimentalmente.

Tabela 10. Porcentagem de inibição celular promovida pela adição de 0,0115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da fração F24 em células tumorais (B16F10 e MCF-7) e células normais (NIH3T3) após 24 horas de tratamento.

Fração	NIH3T3	B16F10	MCF-7
Fração F24	7,5%	26%	21,6%

Comprovada a atividade citotóxica da fração F24, procurou-se determinar sua estrutura primária por meio de sequenciamento químico empregando-se degradação de

Edman. Foi possível obter uma sequência N-terminal composta por 24 resíduos de aminoácidos. De posse de tal sequência parcial foi realizada uma busca em bancos de dados de proteínas empregando-se o programa BLAST disponível no sítio http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.

Foram relacionados 72 peptídeos com diferentes graus de similaridade à sequência N-terminal da F24, todos peptídeos isolados de escorpiões da família Buthidae (56 do gênero *Centruroides*, 13 do gênero *Tityus* e dois peptídeos isolados da espécie *Lychas mucronatus* e um da espécie *Mesobuthus tamulus*). A Figura 15 mostra o alinhamento das toxinas reportadas na literatura com similaridade maior que 80% com a sequência parcial da F24.

```

F24  KDG YLVN TKTG CKYSCMT-----ERECHG----- 24
Cex8  KEG YLVN IYTG CKYSCWLLGENEYCIAECKEIGAG--YGYCHGFGCWCEQFPENKPSYPYPEKSCGRK 66
C117  KEG YLVN TYTG CKYICWKLGENKYCIDECKEIGAG--YGYCYGFGCYCEGFPENKPTWPLPNKTCGRK 66
Cex13 KDG YLVIIKTG CKYNCYILGKNKYCNSECKEVGAG--YGYCYAFGCWCEGLPESIPTWPLPDKTCGTK 66
Cex3  KDG YLVNKSTG CKYECFWLGKNEFCDECKAKNQGGSYGYCYSFACWCEGLPESTSTYPLPNKSCGRK 68
C116  KEG YLVN MKTG CKYGCYELGDNGYCDRCKAESGN--YGYCYTVGCWCEGLPNSKPTWPLPGKSCSGK 66
Cg2   KDG YLVN KSTG CKYSCIEININDSHCNEECISSIRKGSYGYCYKFYCYCIGMPDSTQVYPIPGKTCSTE 68
      * : *****      ***** *                : *

```

Figura 15. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F24 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

As toxinas nomeadas como Cex3, Cex8 e Cex13 citadas na figura 16 foram obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *Centruroides exilicuada* (Valdez-Cruz et al., 2004) e as toxinas C116 e C117 foram isoladas da peçonha do escorpião *Centruroides limpidus limpidus* (Corona M. and Possani., 2002). Estas toxinas não foram avaliadas em nenhum ensaio biológico, mas por similaridade estrutural são consideradas como beta-toxinas, toxinas escorpiônicas que se ligam ao sítio 4 dos canais para sódio voltagem-dependentes (Na_v) e alteram o limiar de ativação dos canais para potenciais mais negativos, o que afeta a ativação dos canais para sódio, promovendo o disparo espontâneo e repetitivo de potenciais de ação.

A toxina Cg2 isolada da peçonha do escorpião *Centruroides gracilis* é um peptídeo que atua em canais para Na^+ e está incluída na subfamília 4 de toxinas que

atuam sob canais para Na^+ , segundo classificação feita por Possani (2000). Também ainda não está comprovada a atividade biológica dessa toxina.

5.5.1.3. F30

A fração F30 é um composto hidrofóbico que elui após 40 minutos de corrida cromatográfica (com 35% do gradiente de acetonitrila) (Figura 16). É um composto que se apresenta com um alto grau de pureza desde o primeiro processo de separação em coluna C_8 .

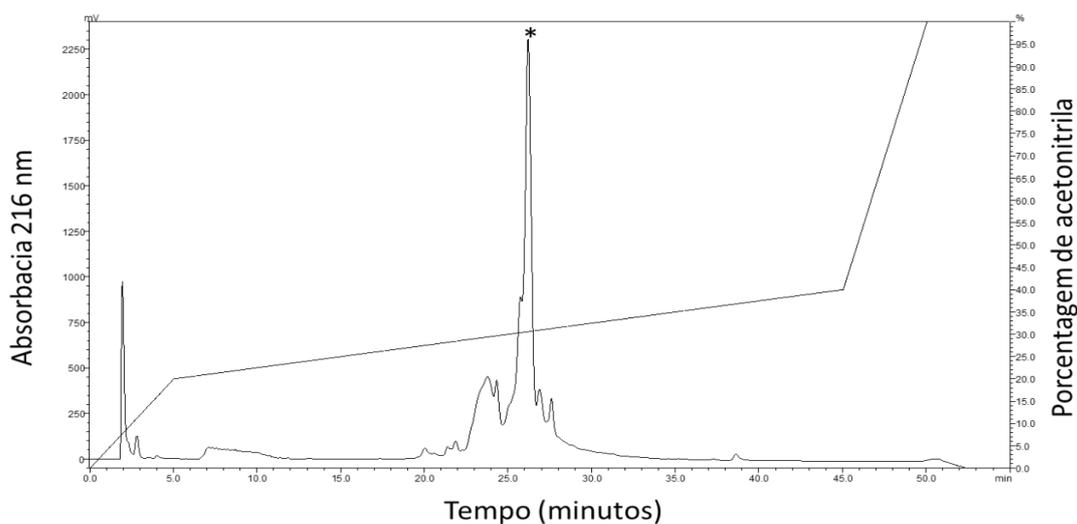


Figura 16. Perfil cromatográfico típico da purificação da fração F30 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* em coluna de fase reversa C_{18} . No momento da recromatografia, a amostra foi dissolvida em 200 μL de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi injetado em RP-HPLC, em coluna de fase reversa do tipo C_{18} , previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 0,8 mL/min durante 55 minutos. A fração F30 está identificada por um asterisco (*).

A análise por espectrometria de massas revelou que a F30 apresenta-se homogênea com massa molecular de 7.410,6 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figura 17). Tal toxina apresenta atividade citotóxica sobre células tumorais das linhagens MCF-7 e B16F10, bem como sobre fibroblastos normais, sendo que a atividade sobre os fibroblastos foi menor (Tabela 11).

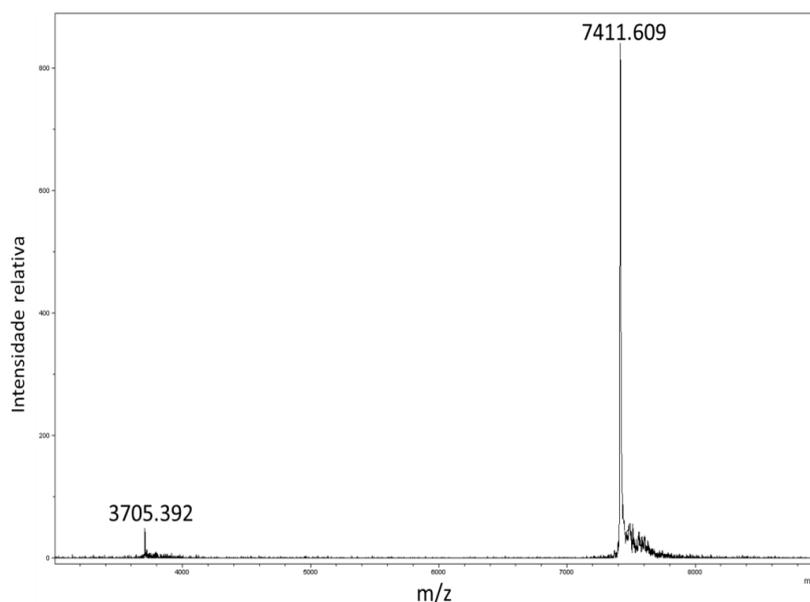


Figura 17. Espectro de massas da fração bioativa F30 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* com massa molecular de 7.411,609 Da $[M+H]^+$ e sua correspondente forma duplamente carregada (3.705,392 Da).

Tabela 11. Porcentagem de inibição celular promovida pela adição 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da fração F30 em células tumorais (B16F10 e MCF-7) e células normais (NIH3T3) analisados pelo teste do MTT após 24 horas de tratamento.

Fração	NIH3T3	B16F10	MCF-7
Fração F30	8,6%	28.7%	20.9%

A sequência N-terminal parcial da fração 30 foi determinada por degradação de Edman, tendo sido obtida uma sequência com 21 resíduos de aminoácidos (Figura 18). Tal sequência parcial foi comparada com outras sequências de proteínas disponíveis nos bancos de sequências de proteínas com o emprego da ferramenta BLAST e apenas a toxina CeII8 isolada do escorpião *Centruroides elegans* teve uma porcentagem de similaridade maior do que 80%. Outras toxinas apresentaram porcentagens menores de similaridade e algumas delas foram incluídas no multi-alinhamento apresentado na Figura 18.

```

F30      KKDGYPVDSEEEERYNCWKNA-Y----- 21
CeII8    KKDGYPVNMEECRYNCWKNA-YCDKLCKEKKGQSGYCYGNLSCWCIGLPDNTNTKMNPFQQTAD- 64
CvIV4    KKDGYPVEHSGCKYTCWKNE-YCDKVCKDLKGGGGYCY-INLTCWCTGLPDNVPLKTNQRCNGKRRK 64
LmNaTx30 KKDGYPYDGNCKYDCWKNQ-YCDDLCKKKKGASGYCYALNLSYCYGLPDKEKTSVKTKCYKGR- 64
Pg8      KKDGYPVDHANCKYECWYDDKYCDDLCKKRRKADSGYCYKLNISYCYGLPDNAAIKDYGRCP- 63
CsE5     KKDGYPVDSGNCKYECLKDD-YCNDLCLERKADKGYCYWGVKVCYCYGLPDNSPTKTSGKCNPA-- 63
          ***** :      : * * :      *

```

Figura 18. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F30 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

CeII8 é uma β -toxina que atua em canais para sódio de células de mamífero, especificamente no canal $Na_v1.7$ (Vandendriessche *et al.*, 2010) a sua porção amino-terminal apresenta alta identidade com a do peptídeo F30. Embora a CeII8 seja uma β -toxina escorpiônica, não é possível se afirmar que o peptídeo F30 pertença também a esse grupo, pois a sequência N-terminal disponível da toxina F30 possui também similaridade significativa com outras toxinas, como a toxina Pg8 do escorpião *Parabuthus granulatus* (Van Der Walt *et al.*, 2009), a LmNaTx30 do escorpião *Lychas mucronatus* (Ruiming *et al.*, 2010), a CsE5 do escorpião *Centruroides sculpturatus* Ewing (Jablonsky *et al.*, 1995) e a CvIV4 do escorpião *Centruroides vittatus* (Rowe *et al.*, 2011) que são descritas como alfa-toxinas ativas sobre canais para sódio.

5.5.1.4. F31

O peptídeo F31 foi obtido puro após recromatografia em coluna C_{18} (Figura 19) e apresenta massa molecular de 7.050 Da $[M+H]^+$ (Figura 20). Este componente é ativo (citotóxico) sobre células tumorais da linhagem MCF-7 (Tabela 7).

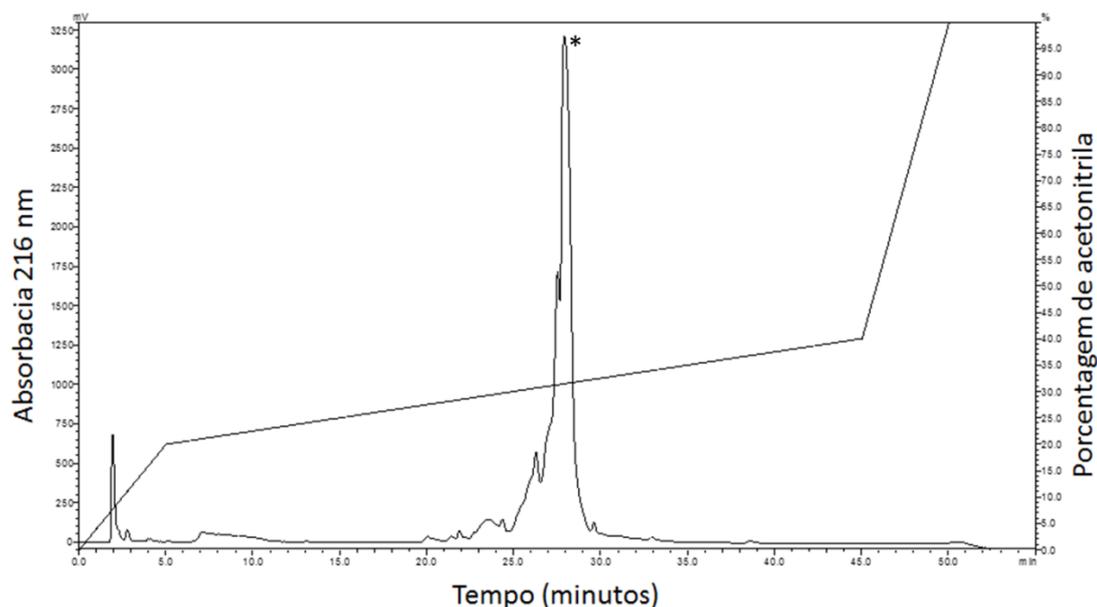


Figura 19. Perfil cromatográfico típico da purificação da F31 em coluna de fase reversa C₁₈. O sobrenadante foi injetado em coluna de fase reversa do tipo C₁₈, previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 0,8 mL/min durante 55 minutos. A fração F31 está identificada por um asterisco (*).

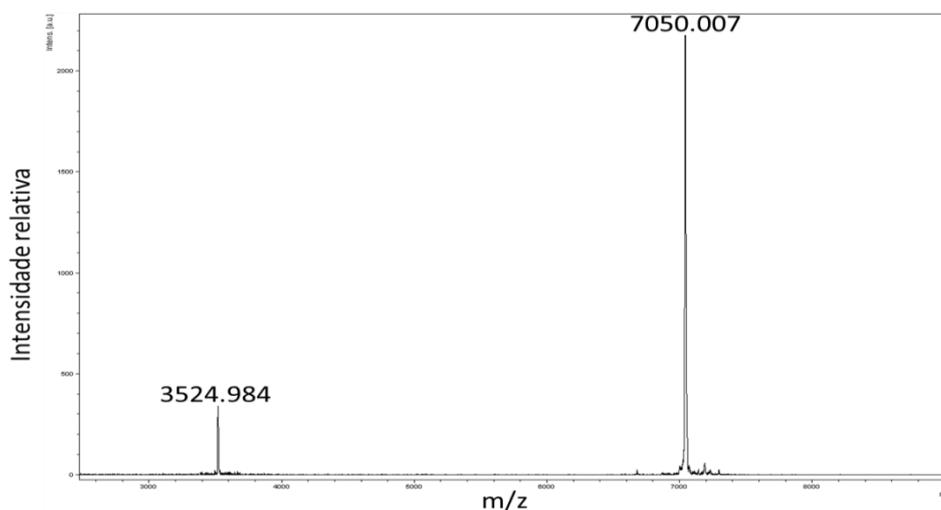


Figura 20. Espectrograma da fração bioativa F31 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* com massa molecular de 7.050,007 Da $[M+H]^+$ e sua correspondente forma duplamente carregada (3.524,984 Da).

A porção N-terminal do peptídeo F31 também foi determinada por meio de sequenciamento químico e a busca nos bancos de sequências de proteínas evidenciou similaridades com três toxinas escorpiônicas como evidenciado pelo alinhamento múltiplo apresentado na Figura 21. Entre elas estão a toxina CsE5 que também

apresenta similaridade significativa com a toxina F30, a toxina BcTx1 isolada do escorpião *Babycurus centrurimorphus* que é ativa em canais para Na⁺ (Khalifa *et al.*, 1997) e a toxina CsxIX do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* classificada como uma β -ScTx que se liga com alta afinidade nas três isoformas de canais para sódio presentes nos sinaptossomas cerebrais de ratos (Na_v 1.1, Na_v 1.2 e Na_v 1.6) (Espino-Solis *et al.*, 2011).

Na Figura 22 foi feito um alinhamento múltiplo entre as três toxinas citotóxicas caracterizadas no presente trabalho, onde pode-se observar que certo grau de similaridade entre elas, principalmente entre as toxinas F30 e F31.

```

F31   -KDGYPIDSKGCAID-CVVN-NYYC----- 22
CxsIX -KDGYPMDHKGCKIS-CVIN-NKYCETECVTVLKGGKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA 65
CsEv5 -KDGYPVDSKGCKLS-CVAN-N-YCDNQCK-MKKASGGHCY--AMSCYCEGLPENAKVSDSATNIC-- 59
BcTx1 LKDGYP TNSKGCKISGCLPGENKFCLNECQ----- 30
      ***** : *** :. * : . * :*

```

Figura 21. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F31 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

```

F30 KKDGY PVDSE-EERYNCWKNAY--- 21
F31 -KDGYPIDSK-GCAIDCVVNNYYC- 22
F24 -KDGYL VNTKTGCKYSCMTERECHG 24
      **** : : : : . * :

```

Figura 22. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos das toxinas F24, F30 e F31. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

Um crescente numero de evidências científicas demonstram haver relação entre a expressão de canais para Na_v em tecidos não-muscular e não-neuronal em associação com vários tipos de câncer. Canais para sódio são conhecidos por serem expressos durante a fase tardia da progressão do tumor, dirigindo a motilidade celular e, potencialmente, regulando a invasão celular e metástase em vários tipos de câncer (Wingerd *et al.*, 2012).

Os canais Na_v 1.4 e Na_v 1.7 são as isoformas predominantemente expressas em diferentes linhas celulares de câncer de próstata (Diss *et al.*, 2005). A expressão de canais para Na⁺ foi registada em células de câncer pulmonar (Blandino *et al.*, 1995; Roger *et al.*, 2007), bem como, em linhas celulares de câncer de mama, com expressão

principalmente do canal $\text{Na}_v1.5$ (Roger *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2005), sugerindo seu envolvimento em processos metastáticos de múltiplas variantes de câncer. Estudos mais aprofundados com foco no papel preciso que as correntes de Na^+ tem na promoção e metástase ainda precisam ser realizados. Devido à correlação positiva entre a expressão e a invasão, alguns bloqueadores de sódio, podem atuar como novas e promissoras terapias (Li and Xiong, 2011; Wingerd *et al.*, 2012).

Estudos usando técnicas de RT-PCR identificaram três VGSCs em dois tipos celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7, no caso, $\text{Na}_v 1.5$ (resistente a tetrodotoxina), $\text{Na}_v 1.6$ e $\text{Na}_v 1.7$ (sensíveis a tetrodotoxina). O nível global de expressão de VGSC tipo alfa mostrou ser muito superior (> 100 vezes) na linhagem MDA-MB-231 em comparação com células MCF-7. Este nível de maior expressão foi devido principalmente à expressão aumentada da isoforma $\text{Na}_v 1.5$ ($\pm 1,800$ vezes maior em células MDA-MB-231), que constituiu cerca de 82% da expressão geral de RNAm para VGSC α em células altamente metastáticas. Os níveis de $\text{Na}_v 1.7$ também são relativamente mais elevados em células MDA-MB-231. O canal $\text{Na}_v 1.6$ é expresso em níveis relativamente baixos, os quais foram semelhantes nas duas linhas celulares (Fraser *et al.*, 2005; Gillet *et al.*, 2010).

A regulação do sódio está intimamente relacionada com a regulação do volume celular, o qual é regulado pela correta atividade da Na^+ , K^+ -ATPase. Após uma lesão, ou quando o canal transportador de sódio é direta ou indiretamente inibido, as células normalmente ficam inchadas porque os valores de Na^+ aumentam acentuadamente. Qualquer condição que reduza ou eleve os níveis de Na^{+2} extracelular, vai favorecer o acúmulo de Ca^{+2} (Benjamin *et al.*, 2001) que por sua vez tem relação com a morte celular por necrose. A sobrecarga ou perturbação intracelular pode causar citotoxicidade e resultar em apoptose, necrose ou autofagia. Assim, a morte celular pode ser provocada por uma perda de controle homeostático do Ca^{2+} (Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Quando uma célula é exposta a compostos ativadores de Na_v causa o influxo de Na^+ e, seguidamente, a morte celular (Mathes, 2006).

Como mencionado anteriormente (Página 10), a peçonha de algumas espécies de escorpiões e compostos isolados delas possuem a capacidade de induzir a apoptose em células cancerígenas, sendo que os peptídeos aqui isolados e parcialmente caracterizados não apresentaram semelhanças com componentes escorpiônicos já

descritos que apresentam tal atividade citotóxica. Obviamente mais estudos precisam ser realizados envolvendo a própria interação das toxinas com os canais para Na^+ , propostos como alvo, e também elucidação dos mecanismos moleculares para a adequada identificação do tipo de morte celular promovida pelas toxinas. Somente assim teremos um panorama geral da ação que esta sendo exercida por estes componentes.

O bloqueio farmacológico ou a regulação positiva dos VGSCs pode ser a resposta para o tratamento de certos tipos de câncer, já que a interação deste tipo de toxinas com os canais para Na^+ geralmente resulta na diminuição de diferentes tipos celulares malignos (Prevarskaya *et al.*, 2010), como exposto nos exemplos citados anteriormente. Os mecanismos responsáveis pela regulação dos VGSC de células cancerígenas por toxinas escorpiônicas ainda são pouco conhecidos, mas os resultados aqui exibidos são sinal da importância em se desenvolver este tipo de pesquisa. Com exceção da toxina Cm1.F1, os componentes aqui citados (F24, F30 e F31) apresentam similaridade com toxinas escorpiônicas anteriormente isoladas e todas elas parecem ter atividade sobre canais para Na^+ , de acordo com a sua estrutura primária, indicando um possível papel da interação de tais toxinas com os canais para Na^+ com os mecanismos de morte celular das linhagens tumorais.

5.5.2. Peptídeos antibacterianos

No total, 22 frações apresentaram atividade inibitória para bactérias patogênicas. Como todos os componentes biologicamente ativos não puderam ser testados no decorrer deste estudo devido à limitação do tempo e à quantidade de material, muitos deles foram reservados para estudos posteriores. Os componentes da peçonha denominados frações F34, F38 e F39 (MgTx3) foram selecionados para serem discutidos mais aprofundadamente no presente trabalho, visto que para tais peptídeos foram realizados estudos mais completos de caracterização química e biológica.

5.5.2.1. Fração F34

A fração F34 proveniente do fracionamento da peçonha bruta por RP-HPLC em coluna C₈ foi submetida a recromatografia em coluna de fase reversa do tipo C₁₈ (

Figura 23) resultando na purificação de um peptídeo com alto grau de homogeneidade e massa molecular 6.800,31 [M+H]⁺ (Figura 24).

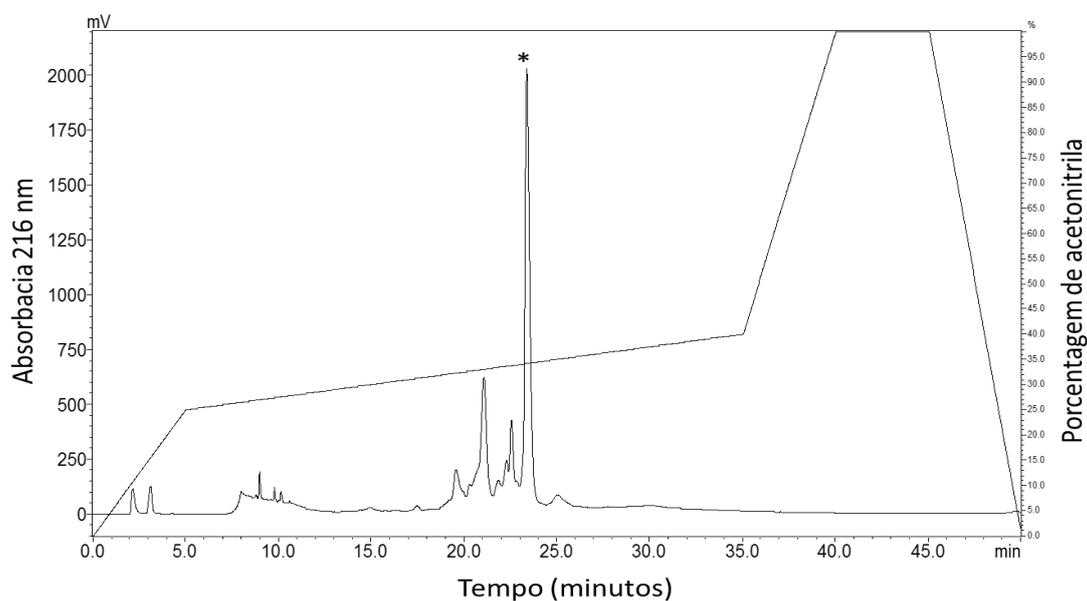


Figura 23. Perfil cromatográfico típico da purificação da F34 em coluna de fase reversa C₁₈. O sobrenadante foi injetado em coluna de fase reversa do tipo C₁₈, previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 0,8 mL/min e aplicação de gradiente linear de acetonitrila de 25 a 40% em 30 min. e detecção em 216 nm. A fração F34 está identificada por um asterisco (*).

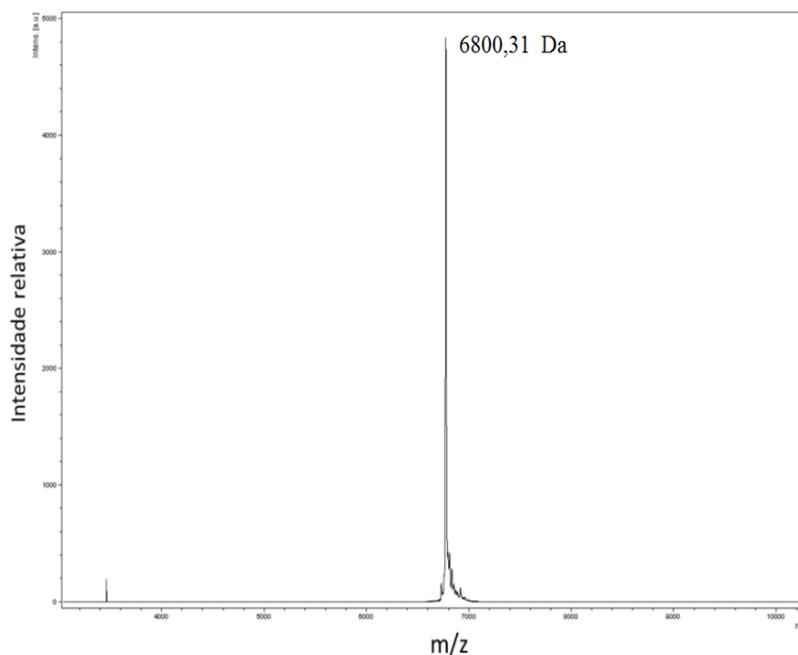


Figura 24. Espectro de massas da fração bioativa F34 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* com massa molecular de 6.800,31 Da [M+H]⁺.

A porção N-terminal do peptídeo F34 foi determinada por meio de sequenciamento químico gerando uma sequência parcial de 19 resíduos de aminoácidos. A busca nos bancos de sequências de proteínas evidenciou similaridades com toxinas escorpiônicas pertencentes à família Buthidae como evidenciado pelo alinhamento múltiplo apresentado na Figura 25.

```

F34  ARDGYIVDEKGCKFACFIN----- 19
Cn11 ARDGYPVDEKGCKLSCLINDKWCNSACHSRGGKYGYCYTGGLACYCEAVPDNVKVVWTYETNTC 63
      ***** : : * : **

F34  ARDGYIVDEKGCKFACFIN----- 19
Cn11 ARDGYPVDEKGCKLSCLINDK--WCNSAC--HSRGGKYGYCYTGGLACYCEAVPDNVKVVWTYETNTC--- 63
Cn1  AKDGYLVDAKGCKKNCYKLGKNDYCNRECRMKHRGGSYGYCY--GFGCYCEGLSDSTPTWPLPNKTCGSK 68
CngtIV AKDGYLVGVKCKKNCYKLGENDYCNRECKMKHRGGSYGYCY--GFGCYCEGLSDSTPTWPLPNKRCGGK 68
      * : *** ** ***** *

```

Figura 25. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F31 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

Existe similaridade entre a porção N-terminal da toxina F34 com outras toxinas escorpiônicas, destacando-se a similaridade com a toxina Cn11 isolada do escorpião *Centruroides noxius*. A toxina Cn11 é ativa sobre canais para Na_v encontrados em crustáceos (*Cambarellus montezumae*) e insetos (grilos), mas não para mamíferos e exerce sua ação bloqueando o canal (Ramirez-Dominguez *et al.*, 2002). Dentre as outras

toxinas que se mostraram similares, CngtIV, isolada a partir da biblioteca de cDNA da glândula peçonhenta do mesmo escorpião que, por similaridade estrutural, deve modular canais para Na_v se ligando ao sítio 4 (Becerril *et al.*, 1993), assim como a toxina Cn1 (Possani *et al.*, 1985; Vazquez *et al.*, 1995).

Uma vez que a fração F34 impura (oriunda do fracionamento em C_8) apresentou atividade antibacteriana no *screening* realizado (vide Tabela 8), foram feitos experimentos de diluição seriada para determinação do MIC para as bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus* que se mostraram sensíveis nos ensaios realizados anteriormente. Após incubação por 24 horas, observou-se inibição completa no crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* na concentração máxima empregada ($64 \mu\text{M}$) (Figura 26). Infelizmente, na mesma concentração, a inibição da bactéria *S. aureus* foi muito reduzida.

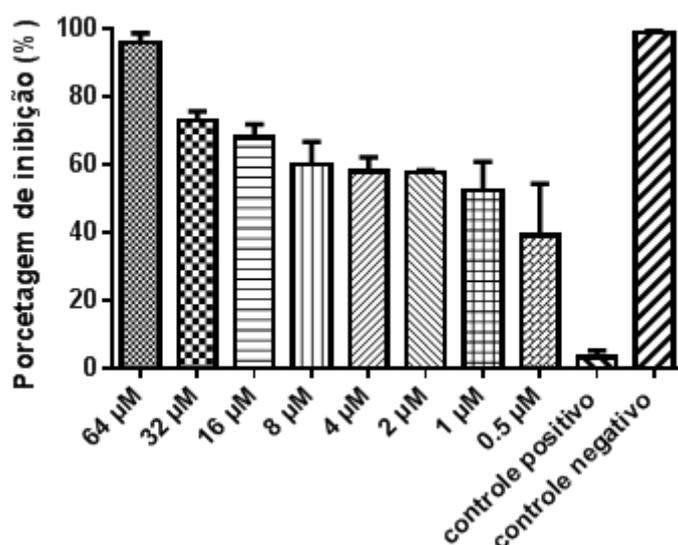


Figura 26. Atividade inibitória da toxina F34 sobre a proliferação da bactéria patogênica Gram-negativa *K. pneumoniae*.

Como dito, o peptídeo F34 exibiu atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* e pouco efeito sobre a proliferação da bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Esse comportamento pode ser explicado por diferenças existentes na composição de suas paredes celulares. Enquanto que nas bactérias Gram-positivas a parede celular é composta por várias camadas de peptidoglicano intercalada por ácido teicóico e ácido lipoteicóico, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana plasmática externa contendo lipopolisacarídeo (LPS) situada sobre uma fina camada de peptidoglicana (Beveridge, 1999; Yount and Yeaman, 2013). De acordo com

a hipótese de "self-promoted uptake", o peptídeo antimicrobiano interage com a membrana externa intensamente negativa e polarizada das bactérias Gram-negativas e induz distorções nessa membrana permitindo ao peptídeo se inserir na membrana ou ser translocado através dessa membrana, induzindo seus efeitos deletérios sobre o organismo (Hancock, 2001).

Como a toxina F34 apresenta similaridade com outras toxinas moduladoras de canais iônicos, foram avaliados os efeitos dessa toxina sobre o potencial de ação de neurônios do gânglio dorsal de ratos (DRG). Em algumas células, a toxina F34 promoveu um aumento na excitabilidade neuronal, causando despolarização da membrana e um aumento da quantidade de potenciais de ação disparado (aumento na frequência de disparo) (Figura 27). Na condição controle, os neurônios testados dispararam apenas um único potencial de ação em resposta a injeções contínuas e periódicas de corrente. A aplicação da toxina F34 (200 nM) despolarizou o neurônio e induziu a deflagração de uma série de potenciais de ação em resposta ao mesmo estímulo. Durante a aplicação da toxina F34, injeções de pulsos hiperpolarizantes suficientes para repolarizar a membrana para os valores do potencial de repouso foram capazes de restaurar o comportamento normal de disparo dos potenciais de ação. Os efeitos da toxina F34 são reversíveis, assim como o disparo normal de potenciais de ação é recuperado após a retirada da toxina da preparação.

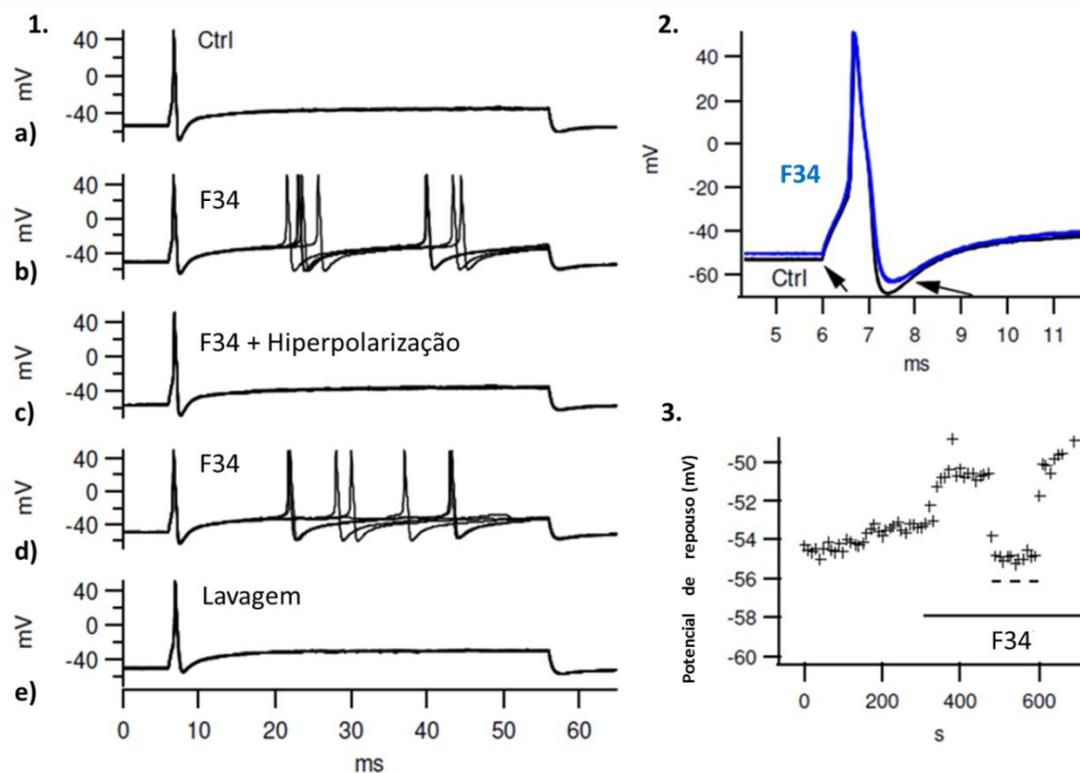


Figura 27. Efeitos da fração F34 sobre o potencial de ação de neurônios de gânglios dorsais de rato. Painel 1, cinco registros eletrofisiológicos de potenciais de ação obtidos em cinco condições experimentais: a) controle (ausência da fração F34); b) presença da fração F34, c) presença da fração F34 acompanhada de pulso de corrente hiperpolarizante d) presença da fração F34 após suprimir a administração de pulso de corrente hiperpolarizante; e) remoção da fração F34 (lavagem). Painel 2, potencial de ação gerado no início da estimulação é mostrado em maior detalhe. Nota-se a despolarização causada pela fração F34 (linha azul), e a diminuição na hiperpolarização comparada ao controle. Painel 3, o potencial de repouso da membrana foi representada graficamente em função do tempo ao longo de todo o experimento. Note-se que a aplicação da fração F34 (indicado pela barra contínua) causou uma clara despolarização da membrana. A aplicação de um pulso de corrente hiperpolarizante (indicado pela linha a descontinua) restaurou o potencial de membrana para os seus valores de controle.

De acordo com a sua estrutura, os peptídeos antimicrobianos podem ser dispostos em quatro famílias (Hancock, 2001): 1) peptídeos lineares α helicoidais; 2) peptídeos formadores de folhas beta estabilizadas por pontes dissulfeto; 3) peptídeos com " β -hairpin": ou estrutura em *loop* estabilizadas pela presença de um única ponte dissulfeto e 4) peptídeos estendidos. Considerando a similaridade de sequência observada entre as toxinas F34 e Cn11, a toxina antibacteriana F34 pode ser incluída no grupo das toxinas que possuem estruturas β estabilizadas por pontes dissulfeto.

Na literatura, existem poucos registros de peptídeos antimicrobianos isolados de escorpiões com essas características. Entre eles estão as bactridinas 1 a 6 isoladas do escorpião venezuelano *Tityus discrepans*. Essas toxinas possuem massas moleculares entre 6.916 - 7.362 Da, são ricas em cisteínas e ativos sobre vários tipos de bactérias,

bem como canais para sódio (Diaz *et al.*, 2009). A Escorpina de *Pandinus imperator* possui M_r 10.394 Da, três pontes dissulfeto e é capaz de inibir as bactérias *Bacillus subtilis* e *K. pneumoniae* com MICs abaixo 10 μ M (Conde *et al.*, 2000). A Escorpina é homóloga à Heteroscorpina-1 (8.293 Da) que apresenta atividade inibitória sobre *B. subtilis*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Uawonggul *et al.*, 2007).

Com relação à atividade observada sobre neurônios, esse tipo de resposta de disparo dos potenciais de ação tem sido descrito para outras toxinas, como, por exemplo, o peptídeo Iberitoxina (IbTx - 4.200 Da) isolado da peçonha dos escorpião *Mesobuthus tamulus*. Esta toxina é ativa sobre canais para potássio, promovendo seu bloqueio (Galvez *et al.*, 1990). Quando avaliado seu efeito sobre os potenciais de ação, IbTx prolonga sua duração e aumenta a frequência de disparo em neurônios, mas não altera significativamente o potencial de repouso da membrana, o limiar de excitabilidade ou a amplitude do potencial de ação (Zhang *et al.*, 2003).

A Ciguatoxina (*Pacific Ciguatoxin 1/P-CTX-1*), é um poliéter produzido por um dinoflagelado, responsável por sintomas neurológicos observados em casos clínicos de envenenamento. Tal toxina promove aumento na frequência de disparo de potenciais de ação ao interagir com o sítio 4 de canais para Na^+ (Bidard *et al.*, 1984). Esta interação causa despolarização da célula e um aumento no influxo de sódio, assim como redução na amplitude da hiperpolarização (Birinyi-Strachan *et al.*, 2005). Estudos acerca do comportamento de canais iônicos ou análise dos seus diferentes componentes químicos, relacionam as mudanças na frequência de disparos repetitivos de potenciais de ação, seja aumentando-a ou reduzindo-a, com o efeito associado com a bomba de sódio em neurônios e sua despolarização (Tsai and Chen, 1995; Renganathan *et al.*, 2001; Renganathan *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009).

Como observado, as características básicas que permitem aos canais para sódio desempenhar suas funções fisiológicas incluem a ativação rápida dependente de voltagem e sua inativação. A inativação é um processo que fecha o canal e previne sua reabertura até que haja tempo suficiente para recuperação, o que permite determinar a frequência máxima de disparo. Além disso, a inativação leva as células a resistirem a um longo período de despolarização sem dispararem novos potenciais de ação, prevenindo o colapso dos gradientes iônicos que podem levar à morte celular (Goldin, 2003). Nesse sentido, a fração F34 poderia atuar como uma beta-toxina escorpiônica

ligando-se ao sensor de voltagem do sítio 4, deixando o sensor de voltagem em um estado de pré-ativação. Uma vez pré-ativado, uma segunda despolarização de menor intensidade poderia ser capaz de abrir o canal, permitindo sua ativação em valores mais eletronegativos, quando comparado com o que ocorre na ausência da toxina.

Como a fração F34 apresentou propriedades antibacterianas e, em virtude da crescente incidência de multi-resistência em bactérias patogênicas, tal peptídeo pode representar uma alternativa como droga no controle de infecções bacterianas, principalmente se associarmos o fato dela não apresentar efeito citolítico sobre eritrócitos humanos.

5.5.2.2. Fração F38

A fração semi-purificada identificada como F38 apresentou inibição sobre o crescimento das bactérias *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Na purificação do principal componente presente nessa fração foram necessários dois passos cromatográficos adicionais (Figura 28) para obtermos a toxina em alto grau de homogeneidade (Figura 29). Sua porção amino-terminal foi determinada por sequenciamento químico e mostrou-se muito similar com a da fração F34 como evidenciado na Figura 30, sugerindo tratar-se de uma isoforma. A busca por toxinas similares revelou similaridade com o peptídeo BotIT6 (Figura 31), uma toxina anti-inseto purificada a partir da peçonha de *Buthus occitanus tunetanus*. Tal toxina é muito ativa nos VGSC de inseto, mas interessantemente não afeta canais para sódio de mamíferos, como demonstrado nos estudos realizados por Mejri e colaboradores (2003) e Bel Haj Rhouma e colaboradores (2005).

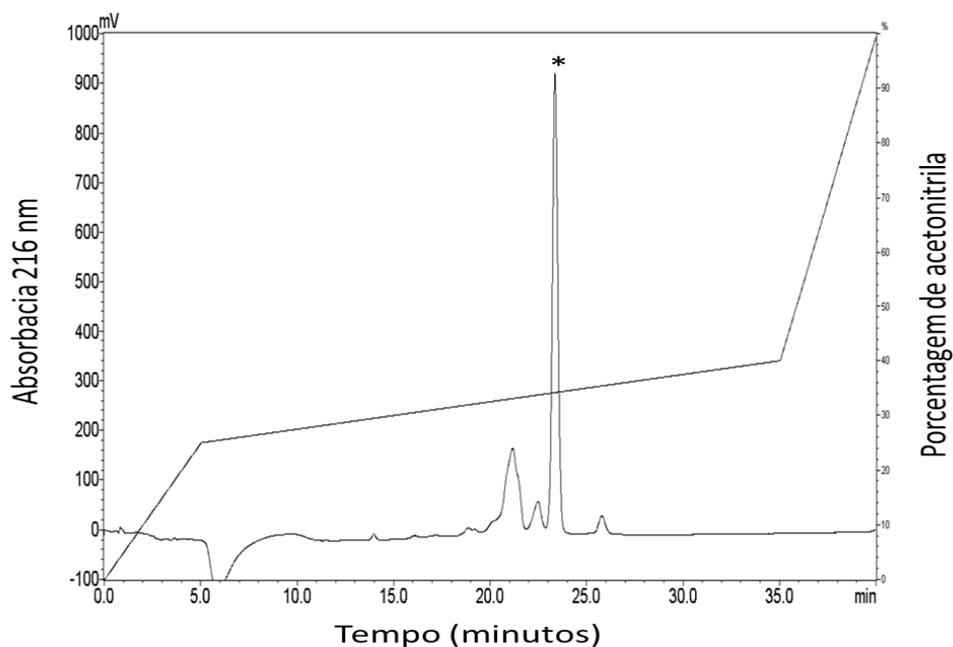


Figura 28. Perfil cromatográfico típico da purificação da F38 em coluna de fase reversa C_{18} . O sobrenadante foi injetado em coluna de fase reversa do tipo C_{18} , previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 0,8 mL/min e aplicação de gradiente linear de acetonitrila de 40% em 30 min. e detecção em 216 nm. A fração F38 está identificada por um asterisco (*).

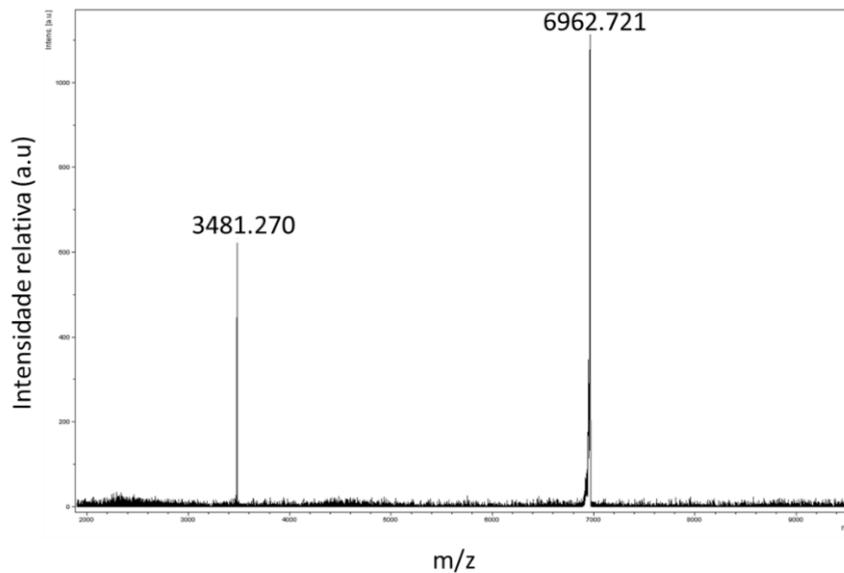


Figura 29. Espectro de massas da fração bioativa F38 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* com massa molecular de 6.962,721 Da $[M+H]^+$ e sua correspondente forma duplamente carregada (3.481,270 Da).

```

F34 ARDGYIVDEKKGCKFACFIN----- 19
F38 ARDGYIVDEEGCKIISCFINNKWCNS 25
      *****:***: :*****

```

Figura 30. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F34 e F38. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

```

F38   ARDGYIVDEEGCKIISCFINNKWCNS----- 25
Cn11  ARDGYPVDEKKGCKLSCLINDKWCNSACHSRGGKYGYCYTGGGLACYCEAVPDNVKVVWYETNTC-- 63
BotIT6 --DGYPKQKNGCKYDCIINNKCNGICKMHGGYYGYCWGWGLACWCEGLPED-KKWWYETNKCGR 62
      ***  :::*** .*:**:****.

```

Figura 31. Alinhamento múltiplo entre a sequência parcial de aminoácidos da toxina F38 e outras toxinas escorpiônicas que apresentaram alta similaridade após busca via BLAST. Na figura os asteriscos (*) correspondem a resíduos idênticos e o símbolo dois pontos (:) indica substituições conservativas.

5.5.2.3. Fração F39 (MgTx3)

Como já ressaltado, os componentes semi-purificados da peçonha de escorpião foram avaliados quanto à sua capacidade em inibir a proliferação de bactérias patogênicas e as massas moleculares dos componentes presentes nessas frações foram determinadas empregando-se MALDI-TOF MS. Aplicando tal abordagem, observamos que a fração F39 corresponde, na verdade, a um peptídeo já isolado do mesmo escorpião e caracterizado pelo nosso grupo por Guerrero-Vargas (2008), sendo conhecido como Margatoxina 3 (MgTx3), com massa molecular de 3.375 Da e três pontes dissulfeto. A estrutura primária da MgTx3 (toxina F39) é formada por 30 resíduos de aminoácidos: VCRTCEVVDGDQYFCPLLGYCKNNKCVCLP. Este componente não teve similaridade significativa quando comparado com outras sequências reportadas nos bancos públicos de sequências de proteínas (BLAST-NCBI).

Para a realização dos testes biológicos se realizaram diversas corridas cromatográficas e recromatográficas com a finalidade de obter material puro suficiente para cada teste. Na Figura 32 podemos observar o perfil recromatográfico da fração isolada, e na Figura 33, seu espectro de massas obtido por MALDI TOF-MS.

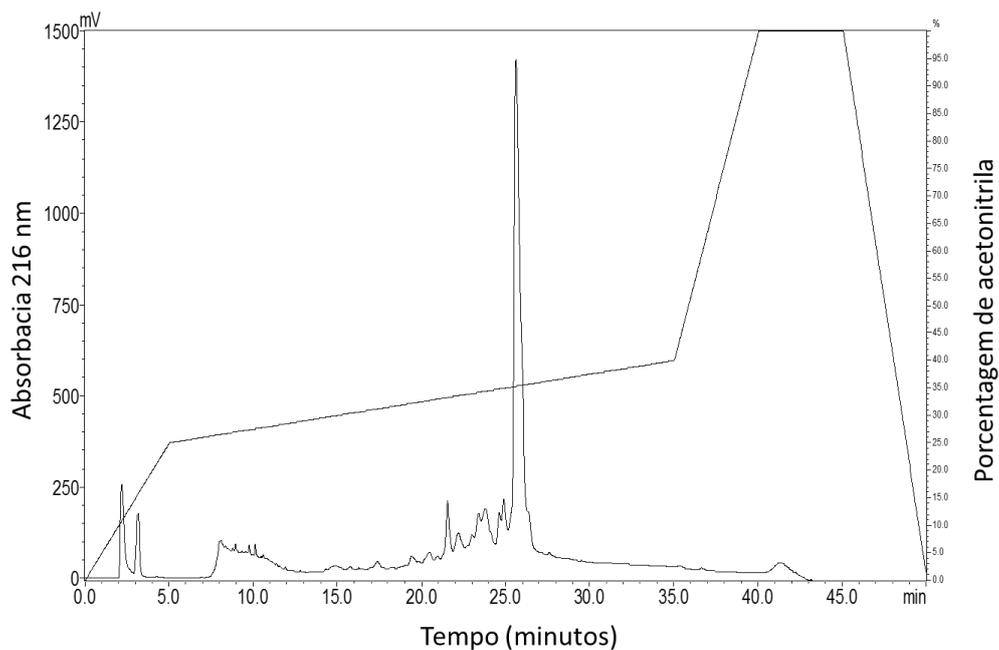


Figura 32. Perfil cromatográfico típico da purificação da F39 em coluna de fase reversa C_{18} . O sobrenadante foi injetado em coluna de fase reversa do tipo C_{18} , previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v). As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetoneitrila, com fluxo constante de 0,8 mL/min e aplicação de gradiente linear de acetoneitrila de 25 a 40% em 30 min. e detecção em 216 nm.

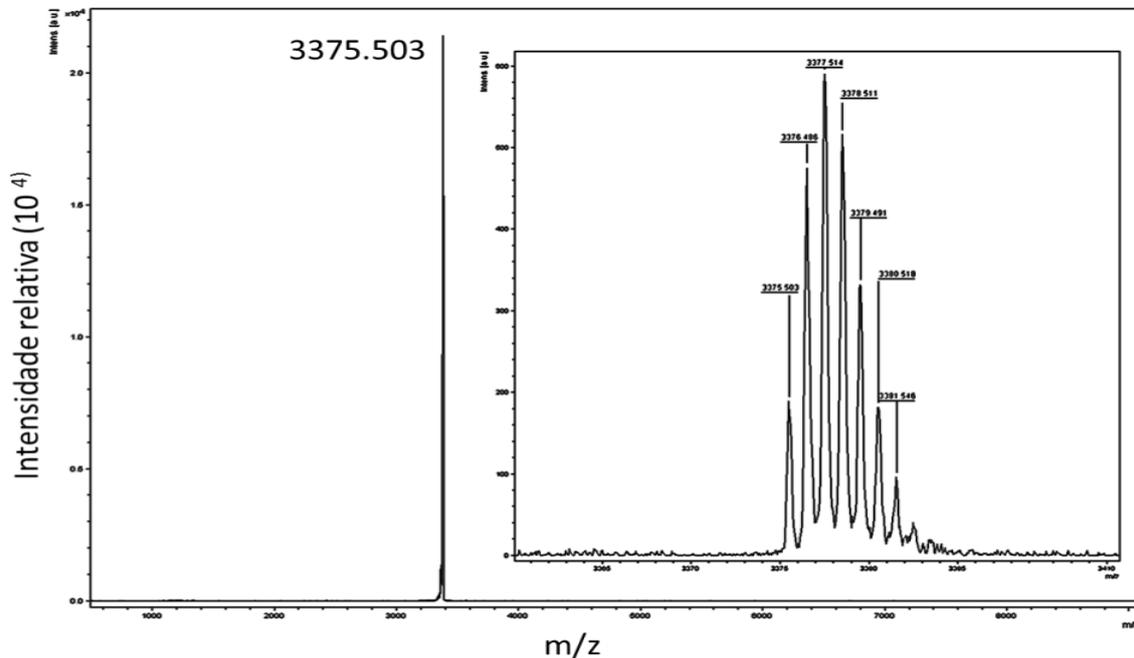


Figura 33. Espectro de massas da fração bioativa F39 isolada da peçonha do escorpião *C. margaritatus* com massa molecular de 3375,503 Da $[M+H]^+$.

Como dito anteriormente, a fração F39 obtida por meio do fracionamento da peçonha bruta em coluna C8 apresentou atividade antibacteriana nos testes realizados (vide Tabela 8). Em virtude disso, o peptídeo purificado foi avaliado quanto à sua capacidade em inibir a proliferação das bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Após incubação por 24 horas, observou-se inibição completa no crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* na concentração máxima empregada (64 μ M) (Figura 34). No caso da bactéria Gram-positiva *S. aureus* a inibição foi parcial tendo sido observada cerca de 64% de inibição do crescimento bacteriano (Figura 35).

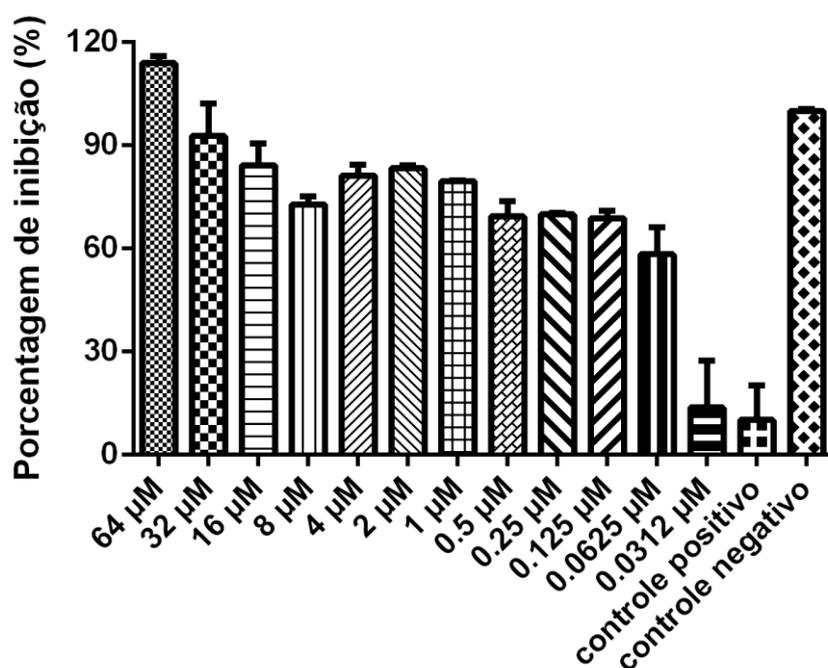


Figura 34. Atividade inibitória da toxina F39 sobre a proliferação da bactéria patogênica Gram-negativa *K. pneumoniae*.

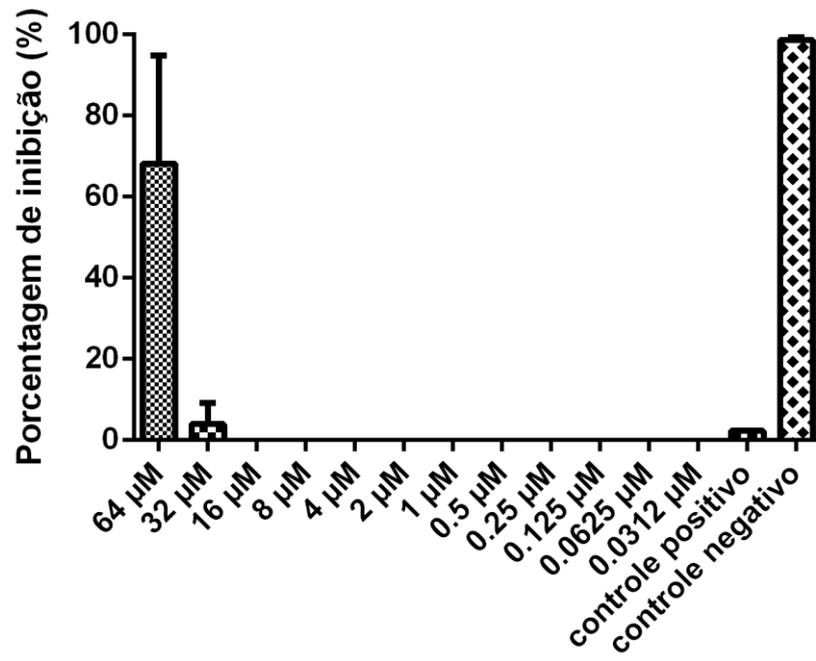


Figura 35. Atividade inibitória da toxina F39 sobre a proliferação da bactéria patogênica Gram-positiva *S.aureus*.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo permitiu a identificação e caracterização parcial de peptídeos biologicamente ativos presentes na peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* isolados com o emprego de técnicas cromatográficas.

Com exceção das frações F1 a F7, foram obtidos espectro de massas das frações cromatográficas ativas obtidas com o fracionamento da peçonha do escorpião *C. margaritatus* em coluna de fase reversa C₈, o que permitiu uma visão geral dos componentes moleculares presentes na peçonha deste escorpião.

Algumas das frações ativas, depois de purificadas, foram caracterizadas química e biologicamente por meio da determinação dos MICs para bactérias patogênicas, assim como, foram determinadas parcialmente as suas estruturas primárias por meio de sequenciamento químico empregando-se degradação de Edman.

A fração Cm1.F1 apresentou citotoxicidade sobre células tumorais das linhagens MCF-7 e B16F10, sem o mesmo efeito tendo sido observado sobre fibroblastos normais murinos da linhagem NH3T3. Também não apresentou atividade hemolítica sob eritrócitos humanos. Consideramos esta fração um excelente alvo para futuras pesquisas direcionadas à caracterização química do(s) composto(s) bioativo(s) presente(s). Também serão necessários estudos acerca do mecanismo molecular de atuação de tal(is) composto(s).

Dentre os componentes citotóxicos isolados, as frações F24, F30 e F31 foram identificadas como peptídeos, parcialmente caracterizados quimicamente com a determinação de sequências N-terminais e avaliadas quanto à sua atividade citotóxica com emprego do ensaio de viabilidade celular baseado no MTT. Mais estudos precisam ser realizados a fim de se determinar o mecanismo de ação destas toxinas, uma vez que canais para sódio podem estar envolvidos no processo apoptótico.

As frações cromatográficas obtidas da peçonha de *C. margaritatus* também foram avaliadas quanto aos seus efeitos citolíticos sobre a bactéria patogênica Gram-negativa *K. pneumoniae* e a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Observamos que existe uma relação dose resposta entre a bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* e os

peptídeos F34 e F39, o que terminou na elucidação do valor mínimo inibitório dos dois peptídeos, ressaltando também a atividade citolítica nula frente a eritrócitos humanos, o que atrai mais fortemente nosso interesse em desenvolver novos estudos para determinar seu mecanismo de ação e seu potencial como agentes terapêuticos para doenças infecciosas.

7. REFERÊNCIAS

- Aitken, A., Learmonth, M., 1996. Protein determination by UV absorption. The protein protocols handbook. Springer, pp. 3-6.
- Almaaytah, A., Tarazi, S., Mhaidat, N., Al-Balas, Q., Mukattash, T.L., 2013. Mauriporin, a Novel Cationic α -Helical Peptide with Selective Cytotoxic Activity Against Prostate Cancer Cell Lines from the Venom of the Scorpion *Androctonus mauritanicus*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 1-13.
- Amiche, M., Galanth, C., 2011. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. Current pharmaceutical biotechnology 12, 1184-1193.
- Andreu, D., Rivas, L., 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. Biopolymers-Peptide Science Section 47, 415-434.
- Archibald, A.R., 1989. The Bacillus cell envelope. Bacillus. Plenum Press, New York, NY, 217-254.
- Arias, C.A., Murray, B.E., 2009. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. New England Journal of Medicine 360, 439-443.
- Bahloul, M., Chaari, A., Dammak, H., Samet, M., Chtara, K., Chelly, H., Ben Hamida, C., Kallel, H., Bouaziz, M., 2011. Pulmonary edema following scorpion envenomation: Mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. International Journal of Cardiology.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Respiratory research 1, 141.
- Batista, C.V., del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D., 2004a. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. Journal of Chromatography B 803, 55-66.
- Batista, C.V.F., del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D., 2004b. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. Journal of Chromatography B 803, 55-66.
- Becerril, B., Vázquez, A., Garcia, C., Corona, M., Bolivar, F., Possani, L.D., 1993. Cloning and characterization of cDNAs that code for Na⁺ channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Gene 128, 165-171.
- Beckh, S., Noda, M., Lübbert, H., Numa, S., 1989. Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. The EMBO journal 8, 3611.

- Bel Haj Rhouma, R., Cérutti-Duonor, M., Benkhadir, K., Goudey-Perrière, F., El Ayeb, M., Lopez-Ferber, M., Karoui, H., 2005. Insecticidal effects of *Buthus occitanus tunetanus* BotIT6 toxin expressed in *Escherichia coli* and baculovirus/insect cells. *Journal of insect physiology* 51, 1376-1383.
- Benjamin, T.F., Seung, C.H., Patricia, P.C., Raymond, J.T., 2001. *Cell injury and cell death: Apoptosis, oncosis and necrosis* CRC Press.
- Berger, M., Reck, J., Terra, R., Beys da Silva, W., Santi, L., Pinto, A., Vainstein, M., Termignoni, C., Guimarães, J., 2010. Lonomia obliqua venomous secretion induces human platelet adhesion and aggregation. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 1-11.
- Bergeron, Z.L., Bingham, J.-P., 2012. Scorpion Toxins Specific for Potassium (K⁺) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. *Toxins* 4, 1082-1119.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics* 303, 474-482.
- Beveridge, T.J., 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology* 181, 4725-4733.
- Bezánilla, F., 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews* 80, 555-592.
- Bidard, J., Vijverberg, H., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A., Bagnis, R., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *Journal of Biological Chemistry* 259, 8353-8357.
- Birinyi-Strachan, L.C., Gunning, S.J., Lewis, R.J., Nicholson, G.M., 2005. Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 175-186.
- Blandino, J., Viglione, M., Bradley, W., Oie, H., Kim, Y., 1995. Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG. *The Journal of membrane biology* 143, 153-163.
- Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology* 13, 61-92.
- Bosmans, F., Tytgat, J., 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon* 49, 142-158.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250.
- Brogden, K.A., Ackermann, M., Huttner, K.M., 1997. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 1615-1617.

- Brogden, K.A., De Lucca, A.J., Bland, J., Elliott, S., 1996. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 412-416.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., Sahl, H.-G., 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 154-160.
- Campos, F.V., Chanda, B., Beirão, P.S., Bezanilla, F., 2008. α -Scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. *The Journal of general physiology* 132, 251-263.
- Catteau, A., Morris, J.R., 2002. *BRCA1* methylation: a significant role in tumour development? , *Seminars in cancer biology*. Elsevier, pp. 359-371.
- Catterall, W.A., 1977. Activation of the action potential Na^+ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *Journal of Biological Chemistry* 252, 8669-8676.
- Catterall, W.A., 2000a. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.
- Catterall, W.A., 2000b. From ionic currents to molecular review mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.
- Catterall, W.A., 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67, 915-928.
- 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.
- Catterall, W.A., Yu, F.H., 2006. Painful channels. *Neuron* 52, 743-744.
- Cedar, H., Bergman, Y., 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics* 10, 295-304.
- Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1998. Voltage Sensor–Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by β -Scorpion Toxin Bound to the S3–S4 Loop in Domain II. *Neuron* 21, 919-931.
- Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2006. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a β -scorpion toxin. *Journal of Biological Chemistry* 281, 21332-21344.
- Clare, J.J., Tate, S.N., Nobbs, M., Romanos, M.A., 2000. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug discovery today* 5, 506-520.
- Cloud-Hansen, K.A., Peterson, S.B., Stabb, E.V., Goldman, W.E., McFall-Ngai, M.J., Handelsman, J., 2006. Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nature Reviews Microbiology* 4, 710-716.
- Cohen, M.L., 1992. Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post—Antimicrobial Era. *Science* 257, 1050.

- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D., 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters* 471, 165-168.
- Corona M., Possani., 2002. Genes and peptides from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*, that recognize Na(+)-channels. EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K.J., He, W., Norton, R.S., Nakajima, T., 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal* 359, 35.
- Costa, P.M., Cardoso, A.L., Mendonca, L.S., Serani, A., Custódia, C., Conceicao, M., Simoes, S., Moreira, J.N., de Almeida, L.P., de Lima, M.C.P., 2013. Tumor-targeted Chlorotoxin-coupled Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery to Glioblastoma Cells: A Promising System for Glioblastoma Treatment. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 2, e100.
- Coughlin, S., Ekwueme, D., 2009. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiology* 33, 315-318.
- Chippaux, J.-P., 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug design, development and therapy* 6, 165.
- Chippaux, J.-P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica* 107, 71-79.
- Choudhuri, S., Arvidson, K., Chanderbhan, R., 2007. Carcinogenesis: Mechanisms and models. In: Ramesh, C.G., Dvm, Mvsc, Phd, Dabt, Fact (Eds.), *Veterinary Toxicology*. Academic Press, Oxford, pp. 343-359.
- Chugunov, A.O., Koromyslova, A.D., Berkut, A.A., Peigneur, S., Tytgat, J., Polyansky, A.A., Pentkovsky, V.M., Vassilevski, A.A., Grishin, E.V., Efremov, R.G., 2013. Modular Organization of α -Toxins from Scorpion Venom Mirrors Domain Structure of Their Targets-Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*.
- D'Suze, G., Rosales, A., Salazar, V., Sevcik, C., 2010. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon* 56, 1497-1505.
- Daher, K., Selsted, M., Lehrer, R., 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology* 60, 1068-1074.
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2001. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 820-825.
- Das Gupta, S., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J.R., Gomes, A., 2007. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leukemia Research* 31, 817-825.
- de Armas, L.F., Sarmiento, D.L., Flórez, E., 2012. Composición del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en Colombia, con la descripción de una nueva especie. *Boletín de la SEA*, 105-114.

- de la Vega, R.C.R., Possani, L.D., 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 49, 171-180.
- Debatin, K.-M., 2000. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicology Letters* 112, 41-48.
- Deshane, J., Garner, C., Sontheimer, H., 2003. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 4135.
- Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J.D., Sherman, N.E., Fox, J.W., 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon* 54, 802-817.
- Dib-Hajj, S.D., Cummins, T.R., Black, J.A., Waxman, S.G., 2007. From genes to pain: Na_v1.7 and human pain disorders. *Trends in neurosciences* 30, 555-563.
- Dijkstra, A.J., Keck, W., 1996. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *Journal of bacteriology* 178, 5555.
- Diss, J., Stewart, D., Pani, F., Foster, C., Walker, M., Patel, A., Djamgoz, M., 2005. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate cancer and prostatic diseases* 8, 266-273.
- Dueñas-Cuellar, R.A., 2009. Valoración *in vivo* del Efecto Tóxico, Citotóxico y Genotóxico del Veneno del Escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841).
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J.A., van Dorsselaer, A., Bulet, P., 1996. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29537.
- Elgar, D., Verdonck, F., Grobler, A., Fourie, C., du Plessis, J., 2006. Ion selectivity of scorpion toxin-induced pores in cardiac myocytes. *Peptides* 27, 55-61.
- Erdogan, A., Schaefer, C.A., Schaefer, M., Luedders, D.W., Stockhausen, F., Abdallah, Y., Schaefer, C., Most, A.K., Tillmanns, H., Piper, H.M., 2005. Margatoxin inhibits VEGF-induced hyperpolarization, proliferation and nitric oxide production of human endothelial cells. *Journal of vascular research* 42, 368-376.
- Escobar, E., Velásquez, L., Rivera, C., 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)(Scorpiones: Buthidae). *Revista Peruana de Biología* 10, 217-220.
- Espino-Solis, G.P., Estrada, G., Olamendi-Portugal, T., Villegas, E., Zamudio, F., Cestele, S., Possani, L.D., Corzo, G., 2011. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Toxicon* 57, 739-746.
- Facey, S.J., Kuhn, A., 2010. Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cellular and molecular life sciences* 67, 2343-2362.
- Fan, S., Sun, Z., Jiang, D., Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Liu, H., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2010. BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis. *Cancer Letters* 291, 158-166.

- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 428, 271-283.
- Finch, R., Hunter, P.A., 2006. Antibiotic resistance—action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12–13 December 2005. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 58, i3-i22.
- Fleischer, A., Ghadiri, A., Dessauge, F., Duhamel, M., Rebollo, M.P., Alvarez-Franco, F., Rebollo, A., 2006. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Molecular immunology* 43, 1065-1079.
- Flórez, E., 2001. Escorpiones de la familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. Reporte.
- Flórez, E., 2007. Los escorpiones, enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. *Innovación y Ciencia. Innovación y Ciencia.* 4, 26-33.
- Fortin, D., Ferris, F., Beveridge, T., 1997. Surface-mediated mineral development by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 35, 161-180.
- Foulds, L., 1954. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Research* 14, 327.
- Frank, A., Sloan, F.A., Gelband, H., 2007. Cancer control in low- and middle-income countries. Institute of Medicine: National Research Council.
- Frank, H.Y., Catterall, W.A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome biology* 4, 207.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.-M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical cancer research* 11, 5381-5389.
- Friedrich, C., Scott, M.G., Karunaratne, N., Yan, H., Hancock, R.E., 1999. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 1542-1548.
- Fu, Y.-J., Yin, L.-T., Liang, A.-H., Zhang, C.-F., Wang, W., Chai, B.-F., Yang, J.-Y., Fan, X.-J., 2007. Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neuroscience Letters* 412, 62-67.
- Fu, Y., An, N., Li, K., Zheng, Y., Liang, A., 2012. Chlorotoxin-conjugated nanoparticles as potential glioma-targeted drugs. *Journal of neuro-oncology* 107, 457-462.
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1990. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 11083-11090.

Gao, R., Zhang, Y., Gopalakrishnakone, P., 2008. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon* 52, 348-353.

Garcia-Calvo, M., Leonard, R., Novick, J., Stevens, S., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G., Garcia, M., 1993. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 268, 18866-18874.

George Jr, A.L., 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1990-1999.

Gillet, L., Roger, S., Potier, M., Brisson, L., Vandier, C., Besson, P., Le Guennec, J.-Y., 2010. Voltage-Gated Sodium Channels: New Targets in Cancer Therapy? *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Volume (5) 5, 234.

Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F., 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2, 1-33.

Goldin, A.L., 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current opinion in neurobiology* 13, 284-290.

González-Sponga, M.A., 1996. Arácnidos de Venezuela: Seis nuevas especies del género. *Tityus*.

Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., Zinn-Justin, S., 1998. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *Toxin Reviews* 17, 131-159.

Goudet, C., Chi, C., Tytgat, J., 2002. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239-1258.

Guerrero-Vargas, 2008. Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841). Universidade de Brasília.

Guerrero-Vargas, J., Ayerbe, S., Rada-Mendoza, M., Vélez, P., D'suze, G., 2003. Estandarización de la extracción del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Scorpionida: Buthidae) del municipio de El Patía, departamento del Cauca y determinación de su DL-50. pp. 17-19.

Gupta, S., 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sciences* 69, 2957-2964.

Gupta, S., 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *International journal of oncology* 22, 15.

Gupta, S.D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., Gomes, A., 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-Biological Interactions* 183, 293-303.

Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., Stankiewicz, M., 2007. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon* 49, 473-489.

Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research* 301, 5-17.

- Hancock, R.E., 1997. Peptide antibiotics. *The Lancet* 349, 418-422.
- Hancock, R.E., 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases* 1, 156-164.
- Hancock, R.E., Chapple, D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 1317-1323.
- Hannun, Y.A., 1997. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 89, 1845-1853.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D., Lotfipour, F., 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113, 723-736.
- He, Y., Zhao, R., Di, Z., Li, Z., Xu, X., Hong, W., Wu, Y., Zhao, H., Li, W., Cao, Z., 2013. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. *Journal of proteomics*.
- Heinen, T., da Veiga, A., 2011. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*.
- Hille, B., 2001. Ion channels of excitable membranes (Sinauer, Sunderland, MA).
- Hille, B., Catterall, W.A., 2011. Electrical excitability and ion channels. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*, 63.
- Holcik, M., 2005. Apoptosis in health and disease: clinical and therapeutic aspects. Cambridge University Press.
- Hornef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M., Normark, S., 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *nature immunology* 3, 1033-1040.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E., 2009. Cell death. *New England Journal of Medicine* 361, 1570-1583.
- Jablonsky, M.J., Watt, D.D., Rama Krishna, N., 1995. Solution structure of an Old World-like neurotoxin from the venom of the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Journal of molecular biology* 248, 449-458.
- Janeway Jr, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197-216.
- Jarosz, J., Gliński, Z., 1990. Selective inhibition of cecropin-like activity of insect immune blood by protease from American foulbrood scales. *Journal of invertebrate pathology* 56, 143-149.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., 2010. Cancer fact & figures 2010. American Cancer Society; Atlanta, Georgia.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19, 491-511.
- Jentsch, T.J., Hübner, C.A., Fuhrmann, J.C., 2004. Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature cell biology* 6, 1039-1047.

- Johnson, B.A., Stevens, S.P., Williamson, J.M., 1994. Determination of the three-dimensional structure of margatoxin by ¹H, ¹³C, ¹⁵N triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 33, 15061-15070.
- Jones, P.A., Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Joseph, B., George, J., 2012. Scorpion toxins and its applications. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research* 4, 57-61.
- Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., 2006. Paroxysmal muscle weakness-the familial periodic paralyses. *Journal of neurology* 253, 1391-1398.
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Kelloff, G.J., Sigman, C.C., 2007. Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer-preventive drug development. *Nature Reviews Cancer* 7, 508-518.
- Khalifa, R.B., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Serrano-Hernandez, S.E., Possani, L.D., Hinkel, H., Mebs, D., 1997. Action of Babycurus-toxin 1 from the East African scorpion *Babycurus centrurimorphus* on the isolated cockroach giant axon. *Toxicon* 35, 1069-1080.
- Klein, E., Smith, D.L., Laxminarayan, R., 2007. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging infectious diseases* 13, 1840.
- Knaus, H.-G., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., Slaughter, R.S., 1995. [¹²⁵I] Margatoxin, an Extraordinarily High Affinity Ligand for Voltage-Gated Potassium Channels in Mammalian Brain. *Biochemistry* 34, 13627-13634.
- Kolár, M., Urbánek, K., Látal, T., 2001. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International journal of antimicrobial agents* 17, 357-363.
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B.A., Hoffmann, R., Otvos, L., 2001. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40, 3016-3026.
- Kuhn-Nentwig, L., 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and molecular life sciences* 60, 2651-2668.
- Kulp, A., Kuehn, M.J., 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology* 64, 163.
- Ladokhin, A.S., White, S.H., 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1514, 253-260.
- Lee, K., Shin, S.Y., Kim, K., Lim, S.S., Hahm, K.S., Kim, Y., 2004. Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 712-719.
- Lehrer, R., Barton, A., Daher, K., Harwig, S., Ganz, T., Selsted, M., 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *Journal of Clinical Investigation* 84, 553.

- Lehrer, R.I., Ganz, T., 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology* 11, 23-27.
- Li, M., Xiong, Z.-G., 2011. Ion channels as targets for cancer therapy. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 3, 156.
- Li, Y., Qu, H., Xiang, Q., Su, Z., Huang, Y., 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*.
- Lippens, G., Najib, J., Wodak, S., Tartar, A., 1995a. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* 34, 13-21.
- Lippens, G., Najib, J., Wodak, S.J., Tartar, A., 1995b. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* 34, 13-21.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of Cellular 3 (4, 5 Dimethylthiazol 2 yl) 2, 5 Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of neurochemistry* 69, 581-593.
- Liu, Y., Yohrling, G.J., Wang, Y., Hutchinson, T.L., Brenneman, D.E., Flores, C.M., Zhao, B., 2009. Carisbamate, a novel neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Research* 83, 66-72.
- Liu, Y.F., Hu, J., Zhang, J.H., Wang, S.L., Wu, C.F., 2002. Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Preparative biochemistry & biotechnology* 32, 317.
- Liu, Z.-R., Ye, P., Ji, Y.-H., 2011. Exploring the obscure profiles of pharmacological binding sites on voltage-gated sodium channels by BmK neurotoxins. *Protein & cell* 2, 437-444.
- Loret, E., Hammock, B., 2001. Structure and neurotoxicity of scorpion toxins In: Brownell, P.; Polis, G.A. *Scorpion Biology and Research*. New York: Oxford University Press, p. 204-233.
- Mamelak, A.N., Jacoby, D.B., 2007. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601).
- Marban, E., Yamagishi, T., Tomaselli, G.F., 1998. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Physiology* 508, 647-657.
- Marcotte, P., Chen, L.-Q., Kallen, R., Chahine, M., 1997. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin γ on voltage-gated Na⁺ channels. *Circulation research* 80, 363-369.
- Mathes, C., 2006. QPatch: the past, present and future of automated patch clamp.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., Miyajima, K., 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35, 11361-11368.

- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 9, 4-9.
- Mejri, T., Borchani, L., Srairi-Abid, N., Benkhalifa, R., Cestele, S., Regaya, I., Karoui, H., Pelhate, M., Rochat, H., El Ayeb, M., 2003. BotIT6: a potent depressant insect toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom. *Toxicon* 41, 163-171.
- Melo, M.N., Ferre, R., Castanho, M.A., 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology* 7, 245-250.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Van Der Walt, J., 2002. Antibacterial and antifungal properties of helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry* 269, 4799-4810.
- Moerman, L., Verdonck, F., Willems, J., Tytgat, J., Bosteels, S., 2003. Antimicrobial peptides from scorpion venom induce Ca^{2+} signaling in HL-60 cells* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 90-97.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Neuhaus, F.C., Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 686-723.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121.
- Olamendi-Portugal, T., Inés García, B., López-González, I., Van Der Walt, J., Dyason, K., Ulens, C., Tytgat, J., Felix, R., Darszon, A., Possani, L.D., 2002. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca^{2+} and Na^{+} channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299, 562-568.
- Oren, Z., Shai, Y., 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science* 47, 451-463.
- Otero, R., Navió, E., Céspedes, F.A., Núñez, M.J., Lozano, L., Moscoso, E.R., Matallana, C., Arsuza, N.B., García, J., Fernández, D., 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 742-750.
- Otvos, L., O, I., Rogers, M.E., Consolvo, P.J., Condie, B.A., Lovas, S., Bulet, P., Blaszczyk-Thurin, M., 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 39, 14150-14159.
- Park, C.B., Kim, H.S., Kim, S.C., 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244, 253-257.

- Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians 55, 74.
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., Hancock, R.E., 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 605-614.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., Catterall, W.A., 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. Nature 475, 353-358.
- Pieta, P., Mirza, J., Lipkowski, J., 2012. Direct visualization of the alamethicin pore formed in a planar phospholipid matrix. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 21223-21227.
- Pittet, D., Allegranzi, B., Storr, J., Nejad, S.B., Dziekan, G., Leotsakos, A., Donaldson, L., 2008. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. Journal of Hospital Infection 68, 285-292.
- Plesiat, P., Nikaido, H., 1992. Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. Molecular microbiology 6, 1323-1333.
- Possani, L., Martin, B., Svendsen, I., Rode, G., Erickson, B., 1985. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochem. J 229, 739-750.
- Possani, L., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie 82, 861-868.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. European Journal of Biochemistry 264, 287-300.
- Powers, J.-P.S., Hancock, R.E., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides 24, 1681-1691.
- Prendini, L., Wheeler, W.C., 2005. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. Cladistics 21, 446-494.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Shuba, Y., 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. Trends in molecular medicine 16, 107-121.
- Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J., Gurrola, G., Valdivia, H., Possani, L., 2013. Scorpion venom components that affect ion-channels function. Toxicon.
- Ramirez-Dominguez, M.E., Olamendi-Portugal, T., Garcia, U., Garcia, C., Arechiga, H., Possani, L.D., 2002. Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true blocker of Na⁺ currents in crayfish neurons. Journal of experimental biology 205, 869-876.
- Remijsen, Q., Verdonck, F., Willems, J., 2010. Parabutoporin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: Much more than an antibiotic. Toxicon 55, 180-185.

- Renganathan, M., Cummins, T.R., Waxman, S.G., 2001. Contribution of Nav1. 8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *Journal of neurophysiology* 86, 629-640.
- Renganathan, M., Gelderblom, M., Black, J., Waxman, S., 2003. Expression of Nav_v 1.8 sodium channels perturbs the firing patterns of cerebellar purkinje cells. *Brain research* 959, 235-242.
- Rivera, C., Flores, L., Pantigoso, C., Escobar, E., 2010. Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. *Revista Peruana de Biología* 17, 129-132.
- Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C., Laffitte, D., Bertin, D., Ouafik, L.H., Luis, J., ElAyebe, M., Srairi-Abid, N., 2011. Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides* 32, 656-663.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 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* 46, 831-844.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2010. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56, 1155-1161.
- Roger, S., Besson, P., Le Guennec, J.-Y., 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1616, 107-111.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.-I., Iochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., Le Guennec, J.-Y., 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 774-786.
- Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1996. Molecular determinants of high affinity binding of α -scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel α subunit. *Journal of Biological Chemistry* 271, 15950-15962.
- Rotem, S., Mor, A., 2009. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788, 1582-1592.
- Rowe, A.H., Xiao, Y., Scales, J., Linse, K.D., Rowe, M.P., Cummins, T.R., Zakon, H.H., 2011. Isolation and Characterization of CvIV4: A Pain Inducing α -Scorpion Toxin. *PloS one* 6, e23520.
- Royet, J., Dziarski, R., 2007. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature Reviews Microbiology* 5, 264-277.

- 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 genomics* 11, 452.
- Rush, A.M., Dib-Hajj, S.D., Liu, S., Cummins, T.R., Black, J.A., Waxman, S.G., 2006. A single sodium channel mutation produces hyper- or hypoexcitability in different types of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 8245-8250.
- Salton, M., 1967. Structure and function of bacterial cell membranes. *Annual Reviews in Microbiology* 21, 417-442.
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., Fujiyoshi, Y., 2001. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 409, 1047-1051.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C., 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology today* 14, 131-136.
- Shahbazzadeh, D., Srairi-Abid, N., Feng, W., Ram, N., Borchani, L., Ronjat, M., Akbari, A., Pessah, I., De Waard, M., El Ayeb, M., 2007. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels. *Biochem. J* 404, 89-96.
- Shao, M., Hirsch, J., Peusner, K., 2006. Maturation of firing pattern in chick vestibular nucleus neurons. *Neuroscience* 141, 711.
- Shieh, C.-C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M., 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological reviews* 52, 557-594.
- Sidorczyk, Z., Zahringer, U., Rietschel, E.T., 1983. Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. *European Journal of Biochemistry* 137, 15-22.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2013. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* 63, 11-30.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000414.
- Steller, H., 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science - New York then Washington*, 1445-1445.
- Stevens, M., Peigneur, S., Tytgat, J., 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in pharmacology* 2.
- Subbalakshmi, C., Sitaram, N., 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS microbiology letters* 160, 91-96.
- Tapia-Vieyra, J.V., Mas-Oliva, J., 2001. Apoptosis and cell death channels in prostate cancer. *Archives of Medical Research* 32, 175-185.

Torres Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European Journal of Biochemistry* 267, 5023-5031.

Tsai, M.-C., Chen, Y.-H., 1995. Bursting firing of action potentials in central snail neurons elicited by d-amphetamine: role of the electrogenic sodium pump. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 111, 131-141.

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: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences* 20, 444-447.

Uawonggul, N., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Arkaravichien, T., Bunyatratthata, W., Ruangjirachuporn, W., Jearranaiprepame, P., Nakamura, T., Matsuda, M., Kobayashi, M., 2007. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon* 49, 19-29.

Valdez-Cruz, N.A., Dávila, S., Licea, A., Corona, M., Zamudio, F.Z., García-Valdes, J., Boyer, L., Possani, L.D., 2004. Biochemical, genetic and physiological characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochimie* 86, 387-396.

Valdez-Velázquez, L.L., Quintero-Hernández, V., Romero-Gutiérrez, M.T., Coronas, F.I., Possani, L.D., 2013. Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. *PloS one* 8, e66486.

Valdivia, H.H., Fuentes, O., El-Hayek, R., Morrissette, J., Coronado, R., 1991. Activation of the ryanodine receptor Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *Journal of Biological Chemistry* 266, 19135-19138.

Valdivia, H.H., Kirby, M.S., Lederer, W.J., Coronado, R., 1992. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 12185-12189.

Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W., 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia* 31, 214-223.

Van Der Walt, J., Dyason, K., García-Gómez, B., Olamendi-Portugal, T., Paniagua, J., Possani, L., 2009. Heterologous expression of a gene that codes for Pg8, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice.

Vandendriessche, T., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., Tytgat, J., 2010. Isolation and characterization of two novel scorpion toxins: The α -toxin-like CeII8, specific for Na_v 1.7 channels and the classical anti-mammalian CeII9, specific for Na_v 1.4 channels. *Toxicon* 56, 613-623.

Vazquez, A., Tapia, J.V., Eliason, W.K., Martin, B.M., Lebreton, F., Delepierre, M., Possani, L.D., Becerril, B., 1995. Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na⁺ channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 33, 1161-1170.

- Veiseh, M., Gabikian, P., Bahrami, S., 2007. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5. 5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Research* 67, 6882.
- Venance, S., Cannon, S., Fialho, D., Fontaine, B., Hanna, M., Ptacek, L., Tristani-Firouzi, M., Tawil, R., Griggs, R., 2006. The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* 129, 8-17.
- Vollmer, W., 2011. Bacterial outer membrane evolution via sporulation? *Nature Chemical Biology* 8, 14-18.
- Wang, W., Gu, J., Li, Y.-Q., Tao, Y.-X., 2011. Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain. *Mol Pain* 7, 16.
- Wang, W.X., Ji, Y.H., 2005. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *Journal of Neuro-Oncology* 73, 1-7.
- Weinberger, H., Moran, Y., Gordon, D., Turkov, M., Kahn, R., Gurevitz, M., 2010. Positions under positive selection key for selectivity and potency of scorpion α -toxins. *Molecular biology and evolution* 27, 1025-1034.
- Williams, G.T., Smith, C.A., 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74, 777-779.
- Wingerd, J.S., Vetter, I., Lewis, R.J., 2012. Voltage-Gated Sodium Channels as Therapeutic Targets. *Therapeutic Targets: Modulation, Inhibition, and Activation*, 63.
- Wu, J.J., Dai, L., Lan, Z.D., Chi, C.W., 2000. The gene cloning and sequencing of Bm-12, a chlorotoxin-like peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 38, 661-668.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R.E., 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 7235-7242.
- Wuthrich, K., 1986. NMR of proteins and nucleic acids. The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University (USA).
- Wyllie, A.H., 2010. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Molecular neurobiology* 42, 4-9.
- Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R.I., Kearney, W., Tack, B.F., Hong, M., 2001. Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical journal* 81, 2203-2214.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W., 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical journal* 81, 1475-1485.
- Yount, N.Y., Yeaman, M.R., 2013. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277, 127-138.
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2004. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science Signaling* 2004, re15.

- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.A., 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 7577.
- Yuan, W., Cao, L., Ma, Y., Mao, P., Wang, W., Zhao, R., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2010. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides* 31, 22-26.
- Zang, M., Liu, X., Chen, L., Xiao, Q., Yuan, L., Yang, J., 2013. Determination of BmKCT-13, a chlorotoxin-like peptide, in rat plasma by LC-MS/MS: Application to a preclinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*.
- Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., Khan, H.A., 2011a. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and molecular pathology*.
- Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., Khan, H.A., 2011b. Scorpion (*Odontobuthus doriae*) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells. *Molecular and cellular biochemistry* 348, 173-181.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zeng, X.C., Corzo, G., Hahin, R., 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life* 57, 13-21.
- Zeng, X.C., Li, W.X., Zhu, S.Y., Peng, F., Zhu, Z.H., Wu, K.L., Yiang, F.H., 2000. Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of a chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch* 1. *Toxicon* 38, 1009-1014.
- Zeng, X.C., Wang, S.X., Zhu, Y., Zhu, S.Y., Li, W.X., 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch* 1. *Peptides* 25, 143-150.
- 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, 1003-1011.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2011. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell calcium* 50, 211-221.
- Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Luo, L., Jin, D., Zhao, Y., Tytgat, J., 2011. Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.
- Zlotkin, E., Shulov, A., 1969. Recent studies on the mode of action of scorpion neurotoxins. A review. *Toxicon* 7, 217-221.