

THALITA SOARES CAMARGOS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
PEPTÍDEOS PRESENTES NA PEÇONHA DO ESCORPIÃO
BRASILEIRO *Opisthacanthus cayaporum*

BRASÍLIA, 2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THALITA SOARES CAMARGOS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS
PRESENTES NA PEÇONHA DO ESCORPIÃO BRASILEIRO *Opisthacanthus*
cayaporum

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília
2009

THALITA SOARES CAMARGOS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS
PRESENTES NA PEÇONHA DO ESCORPIÃO BRASILEIRO *Opisthacanthus*
cayaporum

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito
parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovado em 29 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisabeth Ferroni Schwartz – Presidente da Banca Examinadora

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão – Membro externo

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Prof^a. Dr^a. Loreny Gimenes Giugliano – Membro interno

Universidade de Brasília – UnB

Aos meus pais, Joel e Gilsa, por apoiarem todas as minhas decisões.

Ao meu irmão Joel Júnior, um exemplo pra mim.

Ao meu querido Gustavo, que sempre esteve ao meu lado.

Aos meus sobrinhos, Marconi, Maria Clara e Nicole, que não me deixam esquecer
meu lado criança.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível devido aos esforços de muitas pessoas de diferentes laboratórios. Espero, com este agradecimento, tornar pública a minha gratidão por poder contar com tantos colaboradores.

À Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Schwartz, pela orientação, críticas, apoio, confiança e exemplo. Foi uma honra ter sido orientada por você.

Ao Dr. Carlos Bloch Jr e Dr. Luciano P. Silva, do Laboratório de Espectrometria de Massas, Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, por permitirem o acesso ao laboratório e ajudarem-me nas análises de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Osmino Pires Jr., por todo ensinamento prático de laboratório, HPLC, coletas de escorpiões e colaboração em diversas fases do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Schwartz pela colaboração em diversas fases do Mestrado, coletas de escorpiões e ensaio em íleo de cobaia.

Ao Dr. Lourival Possani e a Dr^ª Rita Restano-Cassulini, do Departamento de Medicina Molecular y Bioprocessos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, pela imensa contribuição e realização dos ensaios eletrofisiológicos.

À Prof^ª. Dr^ª Sonia Freitas, do laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília, pela colaboração no ensaio de Dicroísmo Circular.

À Édelyn C. N. Silva, pela construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *Opisthacanthus cayaporum*.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Motta, do Laboratório de Aracnídeos da UnB, pelo auxílio na identificação dos escorpiões.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Convênio CNPq/CONACYT, Processo 491220/2004-9, pelo apoio financeiro.

Ao colega Jimmy Guerrero Vargas, pelas sugestões em diversas etapas do trabalho, certamente esta foi a primeira de muitas colaborações.

Aos colegas de trabalho, que me auxiliaram em muitas atividades de laboratório e pelas sugestões no decorrer do trabalho, Carla Vizzotto, Janaína Starling, Solange Rego, Caroline Mourão, Natiela de Oliveira, Rafael Melani, Pollyanna Campos, Luis Deus.

Aos colegas do Laboratório de Toxinologia, novos e antigos, Carolina Vieira, Verônica Moraes, Daniel Sifuentes, Flávio Dourado, Natan Maciel, Fábio Caixeta, Karen Py-Daniel, Andréa Carvalho, Marianne de Almeida.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Mortari, por toda a colaboração, sugestões e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massas- Embrapa Recursos Genéticos, por todo o suporte nas práticas em Espectrometria de massas, Mariana Quezado, Karla Moreira, Guilherme Brand, Maura Prates, Eder Barbosa.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Comparada dos Vertebrados, Prof. Dr. Antônio Sebben, Thompson Tomatieli, Luisa da Silva, Leandro Ambrósio, Pedro Ivo Molina, Rafael Felix, Núbia Miranda.

Aos Técnicos do laboratório de Toxinologia, Washington e Valter César.

RESUMO

A peçonha de escorpiões é conhecida por ser uma complexa mistura de moléculas capazes de exercer as mais diversas funções. As mais estudadas são as que atuam em canais iônicos, especialmente nos canais seletivos aos íons Na^+ e K^+ , os responsáveis pela transmissão da informação nervosa. Além dessas moléculas, existe uma família de peptídeos sem pontes dissulfeto, chamados de NDBP (*Non Dissulfide Bridged Peptides*), que podem agir como formadores de poros em membranas, como antimicrobianos e citolíticos, e/ou potencializadores de bradicinina. O presente trabalho demonstra a riqueza de moléculas presentes na peçonha do escorpião brasileiro *Opisthacanthus cayaporum*. A caracterização de uma molécula bloqueadora de canal para K^+ , membro da família das κ -KTx, sistematicamente chamada de κ -KTx2.5, mostrou que esta molécula forma α -hélices em ambiente hidrofílico e é capaz de bloquear canais de K^+ dos subtipos hK_V1.1 e 1.4. As sequências parciais de uma molécula da família das Escorpinas e de um NDBP também são descritas no presente trabalho.

ABSTRACT

Scorpion's venom is a rich source of molecules with variable functions. The most studied are those that act on ion channels, particularly those selective for Na^+ and K^+ , which are responsible for the cell excitability. Besides these compounds, a family of peptides without disulfide bridges, called NDBP (Non Dissulfide Bridged Peptides), which act as pores formers in membranes, holding antimicrobial and cytolytic activities, and as bradykinin potentiators. This study demonstrates the richness of molecules present in the venom of Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. The characterization of a K^+ -channel blocker, for member of the family of κ -KTx, and systematically called here as κ -KTx2.5, showed that this molecule form α -helix in an hydrophilic environment, and is able to blockhKV1.1 and 1.4 K^+ -channel subtypes. The partial sequence of a molecule belonging to the Escorpine family and a NDBP are also described in the work.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classe, Ordem e Famílias de escorpiões, em ordem alfabética	1
Figura 2. Representações esquemáticas da subunidade α de um canal para K^+ e de um canal para K^+ com suas quatro subunidades	5
Figura 3. Exemplos de estruturas secundárias de representantes das α , γ e κ -KTxs	6
Figura 4. Alinhamento dos IsCTs.....	11
Figura 5. <i>Opisthacanthus cayaporum</i>	12
Figura 6. Sobreposição do perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta de machos e fêmeas	14
Figura 7. <i>Fingerprinting</i> de peçonha bruta de machos e fêmeas de <i>O.cayaporum</i>	15
Figura 8. Distribuição das massas moleculares \times porcentagem de ACN	16
Figura 9. Perfil cromatográfico da peçonha de <i>O. cayaporum</i>	25
Figura 10. Recromatografia da fração RT 28,85	26
Figura 11. Espectrograma de massa molecular da RT28,85(12,58)	27
Figura 12. Sequência de aminoácidos do peptídeo RT28,85(12,58)	28
Figura 13. Alinhamento das κ -KTx	28
Figura 14. Modelo da κ -KTx2.5, baseado em homologia	29
Figura 15. Exemplo de espectros dicróicos.....	29
Figura 16. Espectros de dicroísmo circular da κ -KTX nativa e sintética	30
Figura 17. Espectros dicróicos das κ -KTx2.5 nativa e sintética, em um gradiente de temperatura.	31
Figura 18. Atividade da κ -KTx2.5 nativa sobre os canais hKv1.1, hKv1.4 e hERG1.	32
Figura 19. Curvas concentração-resposta da κ -KTx2.5 sintética (κ -KTx2.5s) em ensaio de <i>Patch-Clamp</i>	34
Figura 20. Registro da contração de segmento de íleo de cobaia	35
Figura 21. Recromatografia da fração RT 36,32	36
Figura 22. Sequência completa do peptídeo 1285,74Da e sequenciamento <i>de novo</i>	37
Figura 23. Alinhamento do peptídeo OcCT2f com NDBPs.....	38
Figura 24. Diagrama de Helical Wheel do peptídeo OcCT2f	39

Figura 25. Recromatografia da fração RT40,70.	40
Figura 26. Sequenciamento <i>de novo</i> da região N-terminal do peptídeo escorpina-like de <i>O. cayaporum</i>	41
Figura 27. Alinhamento do fragmento N-terminal de 2473,30Da da escorpina- like.	42
Figura 28. Árvore filogenética das KTxs.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Função biológica, número de resíduos de aminoácidos, ponto isoeletrico e atividade biológica dos peptídeos NDBPs.	9
Tabela 2. Comparação entre as sequências de aminoácidos dos BPPs isolados de diferentes animais	10
Tabela 3. Sequência de aminoácidos N-terminal de peptídeos purificados da peçonha de <i>O. cayaporum</i>	13

ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPP	<i>Bradykinin Potentiating Peptide</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa</i>
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoretanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Uniprot	<i>Universal Protein Resource</i>

Ácido Aspártico	D	Isoleucina	I
Ácido Glutâmico	E	Leucina	L
Alanina	A	Lisina	K
Arginina	R	Metionina	M
Asparagina	N	Prolina	P
Cisteína	C	Serina	S
Fenilalanina	F	Tirosina	Y
Glicina	G	Treonina	T
Glutamina	Q	Triptofano	W
Histidina	H	Valina	V

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Peptídeos e canais para K ⁺	4
1.1.1. Peptídeos escorpina-like	6
1.2. Peptídeos NDBP	7
1.3. O gênero <i>Opisthacanthus</i>	10
1.3.1. <i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	10
1.3.2. <i>Opisthacanthus cayaporum</i>	12
2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Soluções.....	19
4.2. Animais	20
4.3. Extração e Quantificação da peçonha.....	20
4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	20
4.5. Espectrometria de Massas	21
4.5.1. Sequenciamento MS/MS.....	21
4.6. Bioinformática	21
4.7. Síntese de Peptídeo	22
4.8. Ensaio antimicrobiano	22
4.9. Eletrofisiologia	22
4.10. Preparação em íleo de cobaia.....	23
4.11. Dicroísmo Circular	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Fracionamento da peçonha de <i>O. cayaporum</i>	25
5.2. Purificação e caracterização de peptídeos.....	26
5.2.1. RT 28,85	26
5.2.2. RT 36,32	36
5.2.3. RT 40,70	40
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	48
8. PERSPECTIVAS	49
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	50

1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões são predadores terrestres, pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, Ordem Scorpiones. Sua morfologia tem se mantido praticamente sem mudanças há milhões de anos e seus registros fósseis datam de cerca de 400 milhões de anos (Barnes, 2005). Habitam os mais variados ambientes, em climas temperados e tropicais, podendo em algumas situações ser a maior biomassa animal desses ambientes (Polis *et al.*, 1990). Possuem um aparato inoculador de peçonha composto de um par de glândulas e um par de sacos, que armazenam o conteúdo produzido pelas glândulas, chamado telson (Barnes, 2005). Alimentam-se principalmente de insetos e outros pequenos animais (Barnes, 2005).

Existem 19 famílias de escorpiões, embora existam algumas divergências quanto à classificação taxonômica desta Ordem (Fet & Soleglad, 2003; Fet & Soleglad, 2005; Predini & Wheeler, 2005). A Figura 1 representa um organograma com a classificação adotada neste trabalho (Predini & Wheeler, 2005).

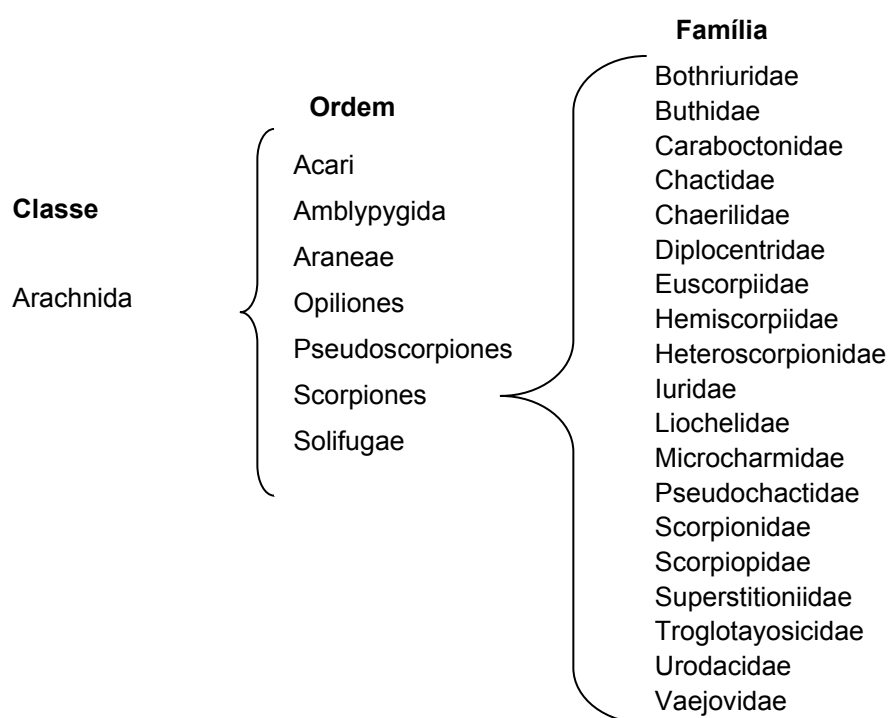


Figura 1. Classe, Ordem e Famílias de escorpiões, em ordem alfabética.

O sucesso adaptativo dos escorpiões deve-se, em parte, à habilidade de produzir e inocular uma peçonha eficiente (Inceoglu *et al.*, 2003). A função dessa peçonha, de paralisar as presas e causar injúria aos agressores, é exercida por uma

complexa mistura de componentes bioativos, que são capazes de induzir respostas fisiológicas e farmacológicas em insetos e/ou mamíferos (Loret *et al.*, 1992; Eitan *et al.*, 1990).

Grande parte do que se conhece acerca de canais iônicos se deve ao estudo de toxinas de animais peçonhentos, particularmente os escorpiões (Rodriguez de la Vega & Possani, 2003). Dentre estes, os mais estudados pertencem à família Buthidae, que são os responsáveis pelos envenenamentos humanos graves provocados por escorpiões. No Brasil, os envenenamentos provocados por escorpiões são atribuídos a alguns representantes da família Buthidae do gênero *Tityus* (*Tityus serrulatus*, *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis*). Outras famílias podem ser encontradas em território brasileiro: Bothriuridae, Chactidae e Liochelidae (Lourenço, 2003).

Os graves efeitos provocados por picadas de alguns escorpiões se devem em parte à complexa composição desta peçonha. A peçonha dos escorpiões é composta de nucleotídeos, lipídeos, sais, aminas biogênicas, peptídeos e proteínas (Possani *et al.*, 2000). Dentre esses componentes, destacam-se os peptídeos capazes de afetar a permeabilidade de membranas de células excitáveis e não excitáveis a íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} (Possani *et al.*, 2000). De acordo com a especificidade peptídeo-canal, estes podem ser classificados em grupos:

- ✓ Bloqueadores de Canais Seletivos a K^+ : As toxinas que bloqueiam canais para potássio possuem entre 20 a 95 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 ou 4 pontes dissulfeto (Rodriguez de la Vega & Possani 2004). Estes peptídeos específicos para canais para K^+ (KTxs) foram divididos em 3 subfamílias denominadas α , β , γ -KTxs, (Tytgat *et al.*, 1999). Seguindo a nomenclatura vigente, foram descritos integrantes de uma nova família de toxinas bloqueadoras de canais para K^+ , as κ -KTxs, que possuem apenas 2 pontes dissulfeto (Srinivasan *et al.*, 2002; Chagot *et al.*, 2005).
- ✓ Moduladores de Canais Seletivos a Na^+ : As toxinas que modulam canais para Na^+ possuem de 58 a 76 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 ou 4 pontes dissulfeto e são divididas em α e β , dependendo do modo de ação (Rodriguez de la Vega & Possani, 2005). Os canais para Na^+ são uma proteína

composta de uma subunidade α onde os domínios homólogos são compostos de seis segmentos transmembrânicos (Yu & Catterall, 2003). As α -toxinas se ligam ao segmento 3 do domínio IV, retardando a inativação do canal; as β -toxinas se ligam ao segmento 4 do domínio II, deslocando o potencial de ativação do canal (Rodriguez de la Vega & Possani, 2005). As β -toxinas são, ainda, subdivididas em “clássicas”, encontradas apenas no gênero *Centruroides*, “Tsy-like”, encontradas no gênero *Tityus*, “excitatórias” e “depressoras”, ambas encontradas em escorpiões do norte do Velho Mundo (Rodriguez de la Vega & Possani, 2007).

✓ Toxinas que se ligam a canais para Cl^- : Em 1991, DeBin e Strichartz descreveram uma molécula com 36 resíduos de aminoácidos, chamada de Clorotoxina, isolada de *Leiurus quinquestriatus*. Posteriormente, Deshane e colaboradores (2003) esclareceram que, de fato, esta toxina não se liga a canais para Cl^- e sim à proteína de matriz metaloproteinase-2 (MMP-2). Fuller *et al.*, (2007) descreveram o peptídeo GaTx1, a primeira toxina de peçonha de escorpião que regula, com alta afinidade, a condutância do ânion Cl^- , isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. A GaTx1, molécula de 3,7kDa e quatro pontes dissulfeto, age nos canais CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), que são canais envolvidos no transporte de íons Cl^- através das membranas celulares, e as mutações nestes canais levam a doenças como a Fibrose Cística (Fuller *et al.*, 2007)

✓ Toxinas que se ligam a canais para Ca^{2+} : São os peptídeos, de 33 a 35 resíduos de aminoácidos, que modulam canais para Ca^{2+} sensíveis a rianodina (Valdivia *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 2009).

O estudo com peçonhas de escorpiões tem se destacado no panorama científico, uma vez que apenas uma pequena porcentagem de moléculas da peçonha foi estudada de um pequeno grupo de escorpiões sendo a maior parte desses estudos com escorpiões da família Buthidae. Essa quantidade de moléculas descritas corresponde a aproximadamente 0,02% quando consideradas as peçonhas das mais de 1500 espécies de escorpiões conhecidas (Possani *et al.*, 2000). Os efeitos neurotóxicos da peçonha de escorpiões são provocados principalmente pela ação das toxinas que atuam nos canais para Na^+ e K^+ (Rodriguez de la Vega & Possani, 2004). Essas toxinas, apesar de agirem em alvos

moleculares distintos, possuem um motivo estrutural semelhante, constituído por α -hélice e folhas- β estabilizado por cisteínas (CS- $\alpha\beta$) (Mouhat *et al.*, 2004).

Além dos peptídeos que interferem na permeabilidade das membranas a íons, compostos com diferentes estruturas e funções têm sido encontrados nas peçonhas de escorpiões. Os peptídeos de peçonha de escorpião que não possuem resíduo de cisteína formam a família dos NDBP – *Non-Dissulfide-Bridged Peptide*, e possuem diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, hemolítica e potencializadores de bradicinina (Zeng *et al.*, 2005).

1.1. Peptídeos e Canais para K^+

Existem mais de 100 subtipos de canais altamente seletivos a K^+ e que possuem uma grande distribuição nos tecidos (Miller, 2000). Os canais para K^+ são proteínas integrais de membrana que formam tetrâmeros de subunidades α (Fig.2) (Wickenden, 2002). Alguns canais de K^+ voltagem dependentes (K_v) estão associados a subunidades- β , que têm a capacidade de influenciar biofísica e farmacologicamente as propriedades dos canais para K^+ (Wickenden, 2002).

Acredita-se que os canais para K^+ desempenhem funções importantes em uma variedade de processos fisiológicos, tais com, excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios, regulação da secreção de fluidos e ativação de linfócitos (Wickenden, 2002). Por possuírem essa relevância, é necessário que esses canais sejam bem compreendidos e caracterizados quanto ao funcionamento e especificidade, o que tem se tornado possível pelo estudo de toxinas de escorpiões e outros organismos peçonhentos.

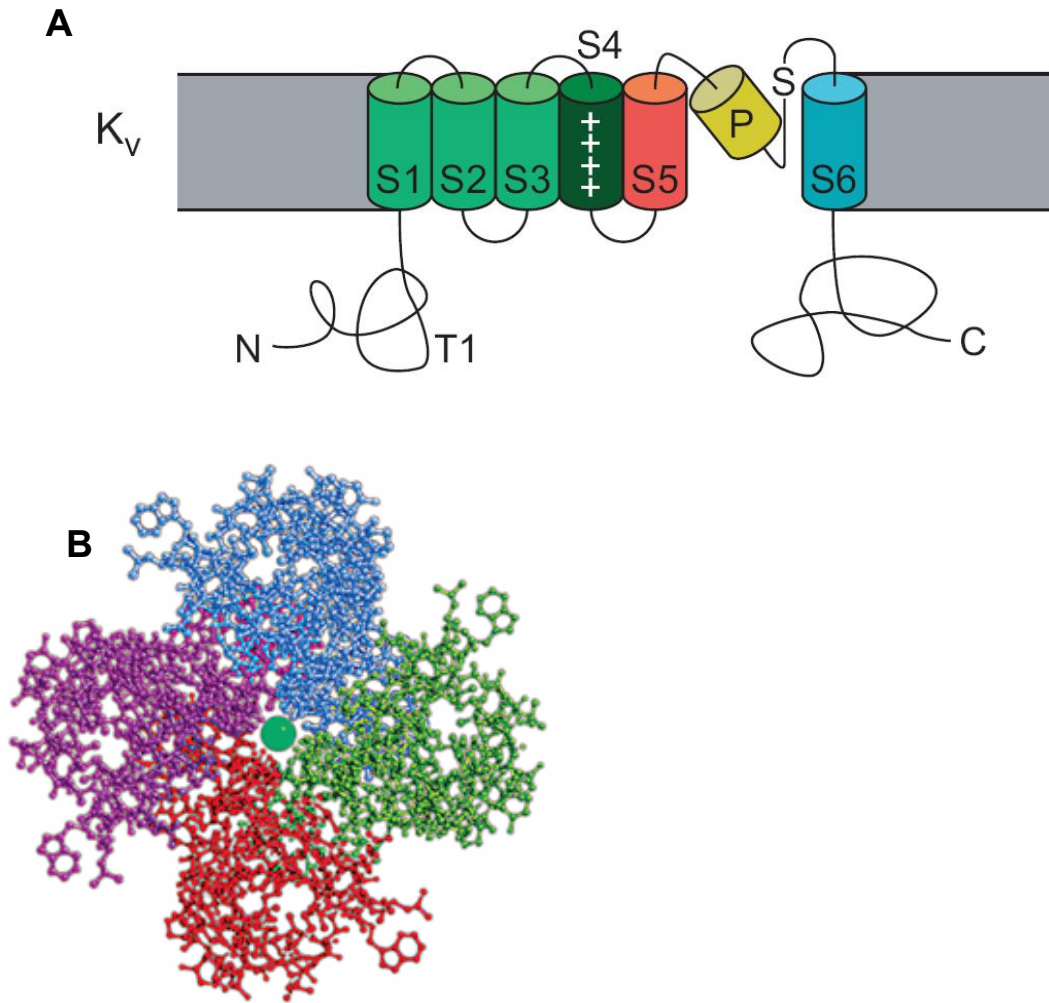


Figura 2. Representações esquemáticas da subunidade α de um canal para K^+ e de um canal para K^+ com suas quatro subunidades. A) Representação esquemática da subunidade α de um canal para K^+ com seus segmentos transmembrânicos numerados de 1 a 6. O segmento 4 é o elemento voltagem-sensível do domínio compreendido pelas hélices S1-S4. T1: domínio conservado dos canais para K^+ dependentes de voltagem (Retirado de Miller, 2000); B) Representação de um canal para K^+ com suas 4 subunidades em cores, e ao centro, em verde um íon K^+ (<http://pubs.acs.org/cen/images/8141/8141NOTW1bloba.gif>).

Os peptídeos que bloqueiam canais para K^+ , KTx, são agrupados em 4 famílias, de acordo com as similaridades estruturais, entre as quais, o posicionamento de suas cisteínas :

- ✓ α -KTx – a maior das famílias, possui mais de 120 sequências peptídicas descritas, distribuídas entre 20 subfamílias (Fig. 3a).

- ✓ β -KTx – possui pelo menos 18 peptídeos e não possuem sua estrutura tridimensional determinada, dentre os quais estão as Escorpinas, peptídeos de cadeia longa.
- ✓ γ -KTx – possui pelo menos 28 sequências, e agem em canais para K^+ do tipo *ether-a-go-go related* (Fig. 3b).
- ✓ κ -KTx – possui 3 peptídeos descritos para o gênero *Heterometrus* (Srinivasan *et al.*, 2002; Nirthanan, *et al.*, 2005) e 5 para o gênero *Opisthacanthus* (Silva *et al.*, 2008, Chagot *et al.*, 2005). São formadas por duas α -hélices estabilizadas por duas pontes dissulfeto, *Csa*/ α (Fig. 3c).

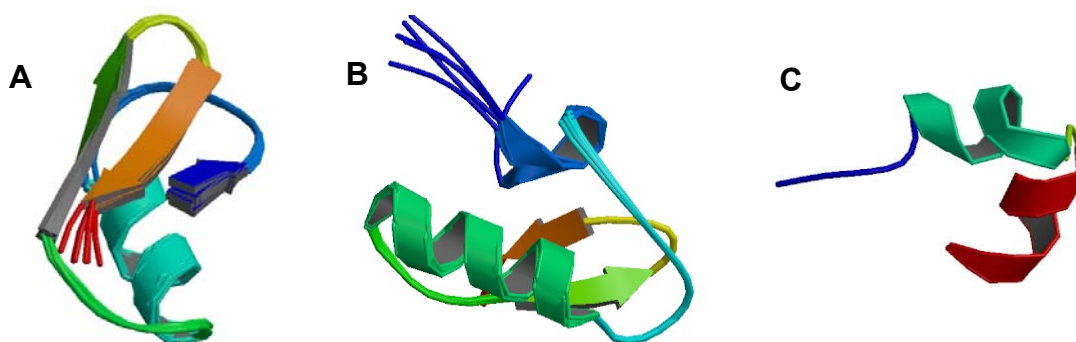


Figura 3. Exemplos de estruturas secundárias de representantes das α , γ e κ -KTxs. A) Charibdotoxina, denominada α -KTx1.1 (PDB: 2CRD) (Bontems *et al.*, 1992); B) CnErg1, denominada γ -KTx1.1 (PDB: 1NE5). (Torres *et al.*, 2003); C) κ -KTx kappa-Hefutoxin1, denominada κ -KTx (PDB: 1HP9). Diferentemente das demais KTxs escorpionicas, as κ -KTxs são formadas por duas α -hélices e estabilizadas por apenas duas pontes dissulfeto (Srinivasan *et al.*, 2002).

1.1.1. Peptídeos escorpina-like

Os peptídeos escorpina-like são peptídeos de cadeia longa, pertencentes às β -KTxs, e que possuem dois domínios estruturais: uma sequência N-terminal livre, sem resíduos de cisteína e uma região C-terminal, com 3 pontes dissulfeto e firmemente enlaçado em um motivo CS- $\alpha\beta$ (Legros *et al.*, 1998; Zhu & Tytgat, 2004). A análise de similaridade conduzida com os peptídeos da família das β -KTxs, sugere a existência de três grupos: (1) os peptídeos de cadeia longa bloqueadores de canais para K^+ , como as β -KTxs dos Buthidae; (2) os peptídeos escorpina-like presentes nos Scorpionidae e Iuridae; (3) peptídeos heterogêneos, similares ao BmTXK β dos Buthidae e Iuridae (Diego-Garcia *et al.*, 2007a). Os peptídeos

escorpina-*like* apresentam atividades antibacteriana, antimalárica e antifúngica (Conde *et al.*, 2000, Uawonggul *et al.*, 2007), enquanto as β -KTx dos Buthidae e os peptídeos similares ao BmTXK β bloqueiam canais para K⁺ (Diego-García *et al.*, 2007a).

Conde e colaboradores (2000) isolaram da peçonha do escorpião *Pandinus imperator* a primeira escorpina, que apresentou atividade antimicrobiana, além de uma potente atividade inibitória da fase esporogônica de *Plasmodium berghei*, protozoário causador da malária murina. A molécula possui 75 resíduos de aminoácidos, 8350 Da e três pontes dissulfeto cuja região linear é similar a peptídeos antimicrobianos catiônicos, entre os quais a cecropina (Moore *et al.*, 1996), enquanto que o domínio CS- $\alpha\beta$ é similar a defensinas de invertebrados.

Trabalhos posteriores identificaram moléculas que possuem grande similaridade com a escorpina, os peptídeos escorpina-*like*. Do escorpião *Opisthophthalmus carinatus* foi identificada a Opiscorpina (Zhu & Tytgat, 2004), de *Heterometrus laoticus*, a HS1, (Uawonggul *et al.*, 2007) e as HgeScplp 1 e 2 de *Hadrurus gertschi* (Diego-Garcia *et al.*, 2007b; Schwartz *et al.*, 2007).

Uma escorpina recombinante, chamada de rScp, foi produzida a partir de expressão heteróloga em *Anopheles gambiae* e reproduziu os efeitos antimicrobianos e anti-malária das escorpinas nativas (Carballar-Lejarazú *et al.*, 2008). Além dos efeitos já conhecidos, a replicação do vírus da dengue tipo-2 foi inibida em uma linhagem de mosquitos transgênicos, sugerindo a viabilidade da criação de mosquitos transgênicos resistentes a esse vírus (Carballar-Lejarazú *et al.*, 2008). Os estudos com a escorpina demonstram a versatilidade dessa molécula no combate a microrganismos e vírus e o seu potencial farmacológico.

1.2. Peptídeos NDBP

Esta família é constituída de peptídeos que não possuem pontes dissulfeto e que apresentam diversas atividades, como potencializadores de bradicinina (hipotensores), antibacterianos, antifúngicos, hemolíticos e imunomoduladores (Tab. 1) (Zeng *et al.*, 2005).

A primeira estrutura identificada desta família foi o peptídeo T isolado de *Tityus serrulatus*, com 13 resíduos de aminoácidos, que tem atividade hipotensora, potencializando a ação da bradicinina (Ferreira *et al.*, 1993). Posteriormente, foram descritas moléculas com atividade antimicrobiana, entre as quais a Parabutoporina (Moerman *et al.*, 2000), isolada de *Parabuthus schlectheri* e a hadrurina, isolada de *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios *et al.*, 2000). Desde então, foram descritos outros peptídeos com atividades antimicrobiana, hemolítica e imunomoduladora (Zeng *et al.*, 2005).

Tabela 1. Função biológica, número de resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico e atividade biológica dos peptídeos NDBPs (Atualizado e adaptado de Zeng *et al.*, 2005).

Escorpião	Peptídeo	aa	pl	Ativ.	Família	Acc
<i>Tityus serrulatus</i>	Peptide T	13	6,56	PB	1.1	Q9TWR4
<i>Buthus occitanus</i>	K12	21	6,52	PB	1.2	Q9TWD3
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-I	25	4,51	PB	1.3	P84189
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-II	25	4,36	PB	1.4	P84190
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-III	24	4,51	PB	1.5	P84191
<i>Tityus serrulatus</i>	TsHpt-IV	24	4,36	PB	1.6	P84192
<i>Buthus indicus</i>	Bs10	34	10,80	Ds	2.1	P59866
<i>Hadrurus aztecus</i>	Hadrurin	41	12,17	AM HL	3.1	P82656
<i>Parabuthus schlechteri</i>	Parabutoparin	45	10,66	AM IM	3.2	P83312
<i>Buthus martensii</i>	Bmkbpp	47	10,88	PB	3.3	Q9Y0X4
<i>Pandinus imperator</i>	Pandinin1	44	10,91	AM HL	3.4	P83239
<i>Opisthophthalmus carinatus</i>	Opistoparin1	44	10,89	AM IM	3.5	P83313
<i>Opisthophthalmus carinatus</i>	Opistoparin2	44	10,89	AM	3.6	P83314
<i>Hadrurus gertschi</i>	NDBP-3.7	58	9,65	PB	3.7	P0C8L3
<i>Opisthophthalmus carinatus</i>	Opistoparin4	44	9,9	AM	3.8	Q5VJS9
<i>Tityus stigmurus</i>	Pape	46	4,30	Ds	3.9	P0C8W6
<i>Pandinus imperator</i>	Pandinin2	24	10,79	AM HL	4.1	P83240
<i>Buthus martensii</i>	BmKb1	18	9,67	AM	4.2	Q718F4
<i>Buthus martensii</i>	BmKn1	13	9,67	Ds	5.1	Q9GQW4
<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	IsCT	13	9,51	AM HL	5.2	Q8MMJ7
<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	IsCT2	13	9,67	AM HL	5.3	Q8MTX2
<i>Buthus martensii</i>	BmKn2	13	11,65	AM	5.4	Q6JQN2
<i>Hadrurus gertschi</i>	TXTL1_HADGE	13	5,52	AM HL	5.5	P0C8W1
<i>Hadrurus gertschi</i>	TXTL2_HADGE	10	8,59	AM	5.6	P0C8W2
<i>Buthus martensii</i>	BmKa1	37	3,39	Ds	6.1	Q9Y0X5
<i>Buthus martensii</i>	BmKa2	50	2,69	Ds	6.2	Q8N0N8

aa: número de resíduos de aminoácidos; pl: ponto isoelétrico; Ativ. Bio.: Atividade Biológica; Acc:

Número de acesso Uniprot; PB: Potencializador de Bradicinina; AM: Antimicrobiano; IM:

Imunomodulador; HL: Hemolítico; Ds: desconhecido

Uma nova família de BPPs (peptídeos potencializadores de bradicinina) isolados da peçonha do escorpião *T. serrulatus*, as TsHpt-I a IV, foi descrita em 2008 por Verano-Braga e colaboradores. As TsHpts possuem uma assinatura característica de BPPs: a presença dois resíduos de prolina (Pro-Pro) na região C-terminal (Tab. 2), que sugerem que elas ajam como agentes hipotensores, assim como os peptídeos já descritos dessa família. Foi construído, então, um peptídeo com nove resíduos de aminoácidos mimetizando a região C-terminal da TsHpt-I, e os ensaios realizados demonstraram que de fato essa região é essencial para o efeito hipotensor (Verano-Braga *et al.*, 2008).

Tabela 2. Comparação entre as sequências de aminoácidos dos BPPs isolados de diferentes animais. Em negrito, os dois resíduos de prolina característicos da região C-terminal desses peptídeos (Adaptado de Verano-Braga *et al.*, 2008).

Peptídeo	Espécie	Estrutura Primária	Acc
TsHpt-I	<i>Tityus serrulatus</i>	AEIDFSGIPEDI I K Q I K E T N A K PPA	P84189
TsHpt-II	<i>Tityus serrulatus</i>	AEIDFSGIPEDI I K E I K E T N A K PPA	P84190
TsHpt-III	<i>Tityus serrulatus</i>	AEIDFSGIPEDI I K Q I K E T N A K PP-	P84191
TsHpt-IV	<i>Tityus serrulatus</i>	AEIDFSGIPEDI I K E I K E T N A K PP-	P84192
TsHpt-I _[17-25]	<i>Tityus serrulatus</i>	-----K E T N A K PPA	-
K12	<i>Buthus occitanus</i>	----LRDYANRVINGGPVEAAG PPA	Q9TWD3
Phypo Xa	<i>Phyllomedusa</i>	-----Pyr----FRPSYQ IPP-	P85165
BPP V-9	<i>Bothrops jararaca</i>	-----PyrGGW-PRPGPE IPP-	Q6LEM5
BPP S4,3,1	<i>Bothrops insularis</i>	-----Pyr-NW-PHP--Q IPP-	P68515
BPP V6-II	<i>Bothrops jararaca</i>	-----Pyr-NW-PRP--Q IPP-	P01022
BPP S5,1	<i>Bothrops insularis</i>	-----Pyr--WGQHP--N IPP-	P30426
BPP	<i>Vipera aspis</i>	-----PyrG-W PGP--KV PP-	P31351
Kinin-potentiating fraction F	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	-----PyrL-W-PRPH-- IPP-	P0C7R6

Acc: Número de acesso Uniprot. Pyr: ácido piroglutâmico

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) encontrados na peçonha de escorpiões podem ter diferentes funções, como o combate a infecções na glândula, a despolarização de células nervosas induzindo a imobilização da presa e a potenciação da ação de neurotoxinas encontradas na peçonha (Carballar-Lejarazú *et al.*, 2008). Os peptídeos que possuem carga positiva interagem diretamente com a membrana celular das bactérias, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana, que culmina em sua ruptura e morte celular (Giangaspero *et al.*, 2001).

1.3. O gênero *Opisthacanthus*

Os escorpiões do gênero *Opisthacanthus* pertencem à família Liochelidae, segundo a classificação adotada neste trabalho, e podem ser encontrados no sul da África, América Central e América do Sul (Lourenço, 2003), podendo, por isso, serem considerados uma verdadeira herança Gondwânica. Atualmente, esse gênero compreende 28 espécies.

1.3.1. *Opisthacanthus madagascariensis*

Trabalhos realizados com o escorpião africano *O. madagascariensis*, descreveram os NDBPs IsCT (1501,9Da) e IsCT2 (1463,9Da), ambos com C-

terminal amidado (Dai *et al.*, 2001; 2002). Os IsCTs apresentam grande similaridade com peptídeos citotóxicos de vespas e ambos possuem atividade antimicrobiana e hemolítica, sendo que o IsCT2 apresenta 78% de homologia com o IsCT e é chamado assim por apresentar carga de 2+ (Fig. 4).

IsCT	ILGKIWEGIKSLF- NH ₂
IsCT2	IFGAIWNGIKSLF-NH ₂
IsCTf	ILGKIWEGIKS
IsCT2f	IFGAIWNGIKS

Figura 4. Alinhamento dos IsCTs. Os IsCTs possuem apenas algumas diferenças entre si e apresentam substituições nas posições 2, 4 e 7. Apesar dessas substituições, os IsCT e IsCT2 possuem conformação anfipática em α -hélice em TFE a 60%. Os IsCTf e IsCT2f assumem estrutura aleatória em solução aquosa de TFE 60% (Dai *et al.*, 2001, 2002). Em cinza, aminoácidos conservados.

Os IsCTs apresentaram MIC de 5-200 μ g/mL, sendo que bactérias Gram-positivas se mostraram mais susceptíveis aos peptídeos que bactérias Gram-negativas (Dai *et al.*, 2001; 2002). Além da atividade antimicrobiana, eles foram mais potentes que o mastoparan na degranulação e liberação de histaminas por mastócitos de ratos (Dai *et al.*, 2001; 2002). Estes peptídeos podem ter ação defensiva ou ofensiva na peçonha do escorpião.

Outros dois análogos do IsCT foram identificados na peçonha de *O. madagascariensis* e foram chamados de IsCTf (1242,80Da) e IsCTf2 (1204,74Da) (Dai *et al.*, 2002). Estes dois peptídeos não possuem a porção C-terminal LF-NH₂ e aparentemente são fragmentos dos IsCTs (Fig. 4). Estes fragmentos possuem estrutura randômica em TFE 60% e não possuem atividade antimicrobiana. Sua função permanece não esclarecida. Todos os peptídeos IsCTs eluem em concentrações bastante distintas de acetonitrila em RP-HPLC (Dai *et al.*, 2002).

Em 2004, Yamaji e colaboradores descreveram a IsTX, uma toxina sexo-específica, bloqueadora de canal para potássio, membro das α -KTx, encontrada exclusivamente na peçonha de *O. madagascariensis* machos. Esse foi o primeiro relato de uma toxina sexo-específico em escorpiões. A IsTX possui 41 resíduos de aminoácidos e a estrutura conservada CS- $\alpha\beta$ estabilizada por quatro pontes dissulfeto. Esta toxina demonstrou alta afinidade a canais para K⁺ dependentes de voltagem e a canais para K⁺ ativados por Ca²⁺. A IsTX apresentou uma grande

similaridade à HsTX1 isolada de *Heterometrus spinifer* (Lebrun *et al.*, 1997), uma toxina que bloqueia canais do tipo $K_v1.3$ em concentrações picomolares (Yamaji *et al.*, 2004).

1.3.2. *Opisthacanthus cayaporum*

No Brasil, o gênero *Opisthacanthus* conta com duas espécies: *O. borboremai* (Lourenço & Fé, 2003) e *O. cayaporum* (Fig.6). O escorpião *O. cayaporum* está distribuído desde o sul do Pará até a região central de Tocantins. Vive em cupinzeiros e possui hábito gregário (Lourenço, 1981), sendo possível encontrar até 13 escorpiões em um único cupinzeiro. Os indivíduos adultos possuem entre 7 e 9 cm, sendo possível a diferenciação sexual pela contagem do número de dentes no pente (órgão quimiorreceptor próximo ao opérculo), que em machos possui entre 10-12 dentes e, nas fêmeas, entre 7-8 dentes (Lourenço, 1981). *O. cayaporum* não possui importância médica e até o presente momento, foram publicados dois trabalhos sobre a proteômica e o transcriptoma deste escorpião (Schwartz *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009).



Figura 5. *Opisthacanthus cayaporum*

No desenvolvimento dos projetos de Iniciação Científica (2005-2007), realizados com a peçonha de *O. cayaporum*, foi possível conduzir análises comparativas entre as peçonhas de machos e fêmeas, além da análise das massas moleculares dos componentes da peçonha (*fingerprinting*). Esses dados

compuseram parte do trabalho publicado em 2008, por Schwartz e colaboradores, tendo sido o primeiro trabalho com a peçonha do escorpião brasileiro *O. cayaporum*. Neste trabalho, também foi avaliado o efeito farmacológico da peçonha bruta de *O. cayaporum* em preparações de nervos isolados de ratos e baratas. A ED₅₀ obtida foi de 1,1 mg/mL em nervos de baratas, não sendo muito significativa a redução dos potenciais de ação em nervo de rato, sugerindo a especificidade desta peçonha para insetos. Em cerca de 80 frações cromatográficas, pelo menos 93 componentes distintos foram identificados por LC/MS e MALDI TOF/TOF MS, com massas moleculares que variaram entre 229,2 e 61.144Da. Foi identificada uma distribuição peptídica de 42% dos componentes na faixa de 229,2-2985,3Da, 37% entre 3045–7258,6 Da e 12% entre 7458,4-9429Da. As sequências da região N-terminal de 17 peptídeos foram apresentadas, assim como atividade biológica de alguns deles, dentre fosfolipases e um peptídeo escorpina-*like* (Tab.3).

Tabela 3. Sequência de aminoácidos da região N-terminal de peptídeos purificados da peçonha de *O. cayaporum*. Tempo de retenção, massa molecular e sequência N-terminal dos peptídeos isolados da peçonha de *O. cayaporum* (Adaptado de Schwartz *et al.*, 2008)

RT (min)	mm(Da)	Sequência
18,34 (20,89)	2188,0	SCKRECSGSKRQK...
19,98 (17,84)	3773,0	IRCTGSKECYSPSY...
21,22 (18,81)	3807,0	IRCQGSNQCYGHCREKTGCPNGKCID...
21,33 (24,34)	3800,0; 3571,0	IRCTGSKECYSPCYKATGCPNAKC...
21,73 (19,92)	3875	IRCQGSNQCYGHCREKTGCMNGKCINRVCKC...
21,73 (19,25)	3874	XNPELRCGLKD...
21,84 (26,85)		DNLKRRRCADDD...
25,50 (18,95)	5093	NRTFKTNTKCHVKNCNFLCQ...
25,93 (30,06)	3135	YDACVNACLENHPNVRECEEAC...
27,64	1217,7	LGKSVTN...
35,82(33,22)		GWGRTIRTHXSIDLNXGE...
33,43 (29,03)	6525,0	FENEDEGYFQDPEDCS...
37,75 (39,04)	14237,0	DFTGVKFDNTIGCGKG...
Oc 32,49	14117; 14518	FMKVIDPGTKWCGPGNKAADDTDNGKN...
39,87 (31,86)	8315,0	GWINEEKIQKKIDEP...
40,78 (22,97)		AKNSAEANENSXDANE...
48,89	8929,0	GSLGEKYAQKAAEVLTSIIP...

RT: Tempo de Retenção; mm: Massa Molecular

Seguindo a idéia apresentada por Yamaji *et al.*(2004), que descrevem um peptídeo sexo-específico em *O. madagascariensis*, uma dos objetivos do projeto de Iniciação Científica foi a comparação das peçonhas de machos e fêmeas de *O. cayaporum*. A análise de perfil cromatográfico (Fig. 6), assim como a análise das

peçonhas de machos e fêmeas em MALDI TOF/TOF MS (Fig.7), mostraram diferenças quantitativas entre essas peçonhas (Schwartz *et al.*, 2008).

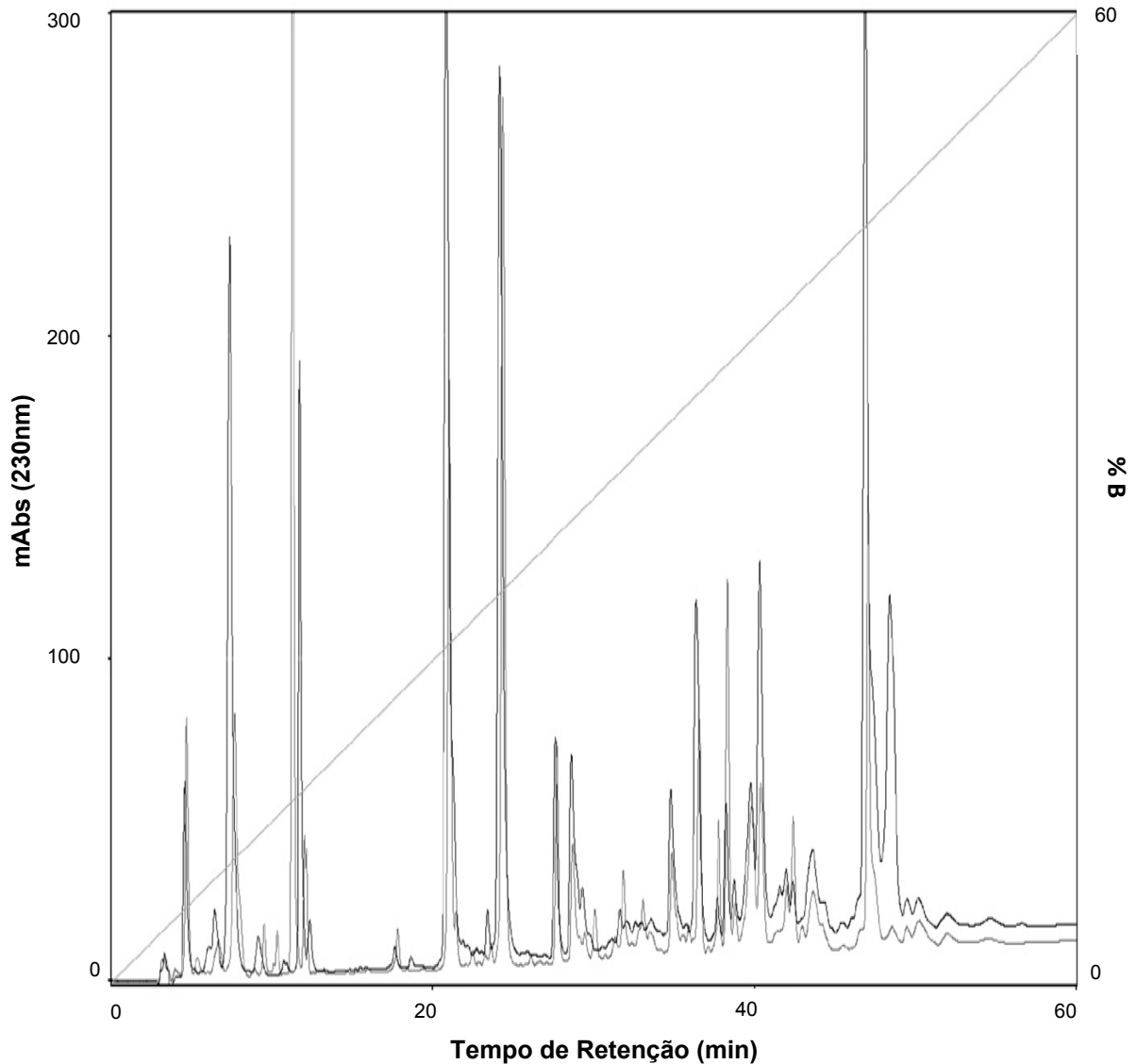


Figura 6. Sobreposição do perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta de machos (preto) e fêmeas (cinza). O perfil cromatográfico obtido de 1mg de peçonha bruta, em coluna C18 de fase reversa (0% A a 60% de B) é similar em ambos os casos, havendo diferenças apenas quantitativas entre as frações (Adaptado de Schwartz *et al.*, 2008).

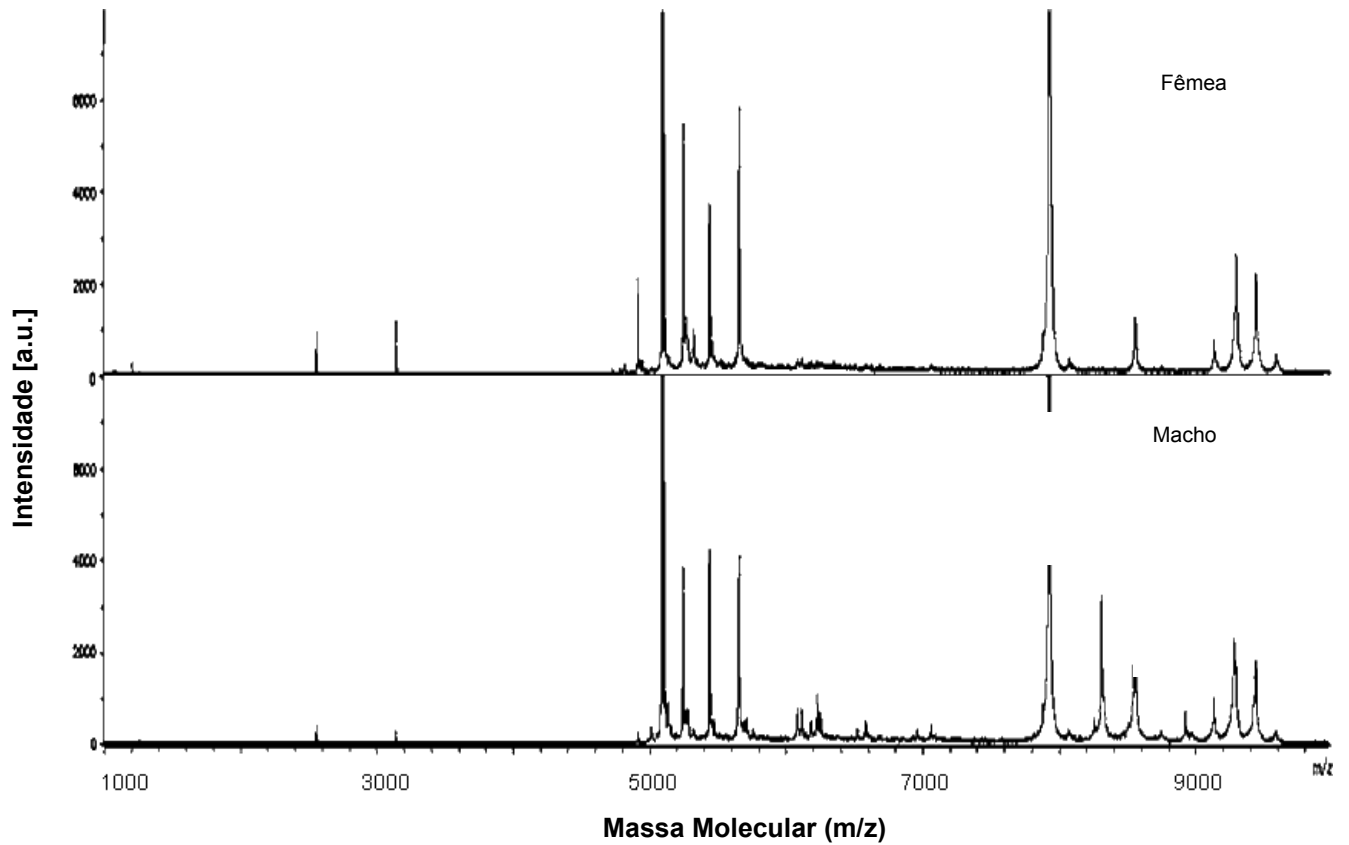


Figura 7. Fingerprinting de peçonha bruta de machos e fêmeas de *O. cayaporum*. Foram identificadas diferenças qualitativas entre as peçonhas de ambos os sexos (Adaptado de Schwartz *et al.*, 2008).

A Figura 8 ilustra a distribuição de massas moleculares encontradas na peçonha de *O. cayaporum*, por MALDI-TOF/TOF MS, de acordo com a porcentagem de ACN. Observa-se a predominância de moléculas menores que 10kDa, cerca de 91% (adaptação dos dados de Schwartz *et al.*, 2008).

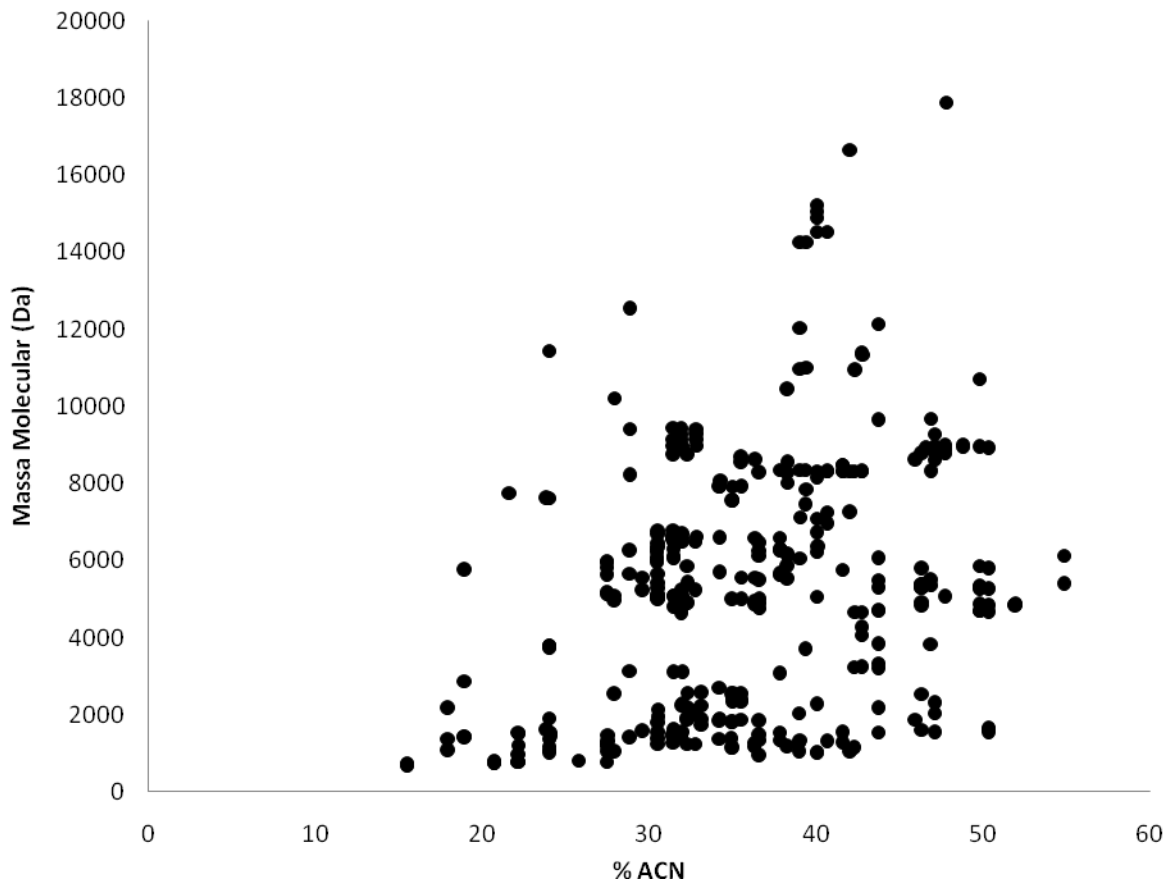


Figura 8. Distribuição das massas moleculares × porcentagem de acetonitrila (ACN). A maior parte dos peptídeos eluem entre 10 e 50% de ACN, sendo 91% dos peptídeos menores que 10kDa .

Em 2009, Silva e colaboradores divulgam a análise transcriptômica parcial da glândula de peçonha de *O. cayaporum*, onde foram identificados 118 clones que codificam para 61 sequências diferentes. Os dados do transcriptoma da glândula de peçonha de *O. cayaporum* foram comparados aos dados obtidos da análise proteômica previamente publicados (Schwartz *et al.*, 2008). Por apresentarem relevância para o presente trabalho, destacam-se entre clones descritos em Silva *et al.* (2009), os OcyC1 e OcyC2, os quais codificam para peptídeos NDBP, o OcyC8, que codifica para um peptídeo da família κ -KTx e o OcyC7 que codifica para um peptídeo escorpina-*like*.

2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Muito do que se conhece atualmente acerca do funcionamento de canais iônicos é resultado de estudos utilizando peptídeos isolados de organismos peçonhentos, particularmente de escorpiões (Rodriguez de la Vega & Possani, 2003). Peptídeos isolados da peçonha de escorpiões, como a Charybdotoxina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Miller *et al.*, 1985) modulam de forma seletiva canais para K^+ do tipo K_{Ca} 3.1 e são comercializados para essa função. Outro exemplo é a γ -KTx, Ergtoxin-1, de *Centruroides noxius* que bloqueia canais para K^+ do tipo $K_V11.1$ (HERG) (Scaloni *et al.*, 2000).

O estudo da peçonha de escorpiões tem se destacado no panorama científico, uma vez que apenas uma pequena porcentagem de moléculas foram estudadas da peçonha de um pequeno grupo de escorpiões, cerca de 0,02% do potencial em compostos bioativos quando consideradas as mais de 1500 espécies de escorpiões conhecidas, sendo a maior parte desses estudos com escorpiões de importância médica, principalmente a família Buthidae (Possani *et al.*, 2000). Pouco se sabe sobre a peçonha de escorpiões de outras famílias com menor importância médica, como a do escorpião brasileiro *Opisthacanthus cayaporum*.

Alguns NDBPs são um bom exemplo do potencial farmacológico de moléculas isoladas da peçonha de escorpiões, como os potencializadores de bradicinina K12 (Meki *et al.*, 1995) e peptídeo T (Ferreira *et al.*, 1993), assim como os peptídeos TsHpt (Verano-Braga *et al.*, 2008), que agem como hipotensores e potencializam a ação da bradicinina. Peptídeos como as escorpina-like (Conde *et al.*, 2000; Zhu & Tytgat, 2004; Uawonggul *et al.*, 2007) expressos em insetos transgênicos exemplificam a utilização de peptídeos obtidos de peçonha de escorpiões para controle de doenças tropicais como a malária e a dengue. Dessa forma, existe ainda um potencial muito grande em moléculas com as mais diversas atividades biológicas a serem exploradas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

- ❖ Caracterizar peptídeos presentes na peçonha do escorpião brasileiro *Opisthacanthus cayaporum*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterização química e biológica de um novo peptídeo da família das κ -KTxs.
- ❖ Caracterização química de um peptídeo da família NDBP.
- ❖ Caracterização química de um peptídeo de cadeia longa, da família β -KTx.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Soluções

✓ Meio Luria-Bertani (LB)

Preparação em 1L de água destilada:

Peptona de Carne – 10g

Extrato de Levedura – 5g

NaCl – 10g

Autoclavar após homogeneização.

✓ Solução Tyrode

Preparação a 35°C, em 1 L

NaCl – 8,0g

KCl – 0,2g

CaCl₂ – 0,2g

MgCl₂.6H₂O - 0,21g

NaHCO₃ - 1,0g

NaH₂PO₄.H₂O – 0,055g

Glicose – 1,0g

✓ Solução externa para eletrofisiologia para células CHO

Concentrações finais em mM. Solução ajustada para pH 7,4:

NaCl – 130

KCl – 5

CaCl₂ – 2

MgCl₂ – 2

HEPES-NaOH – 10

D-glicose – 5

✓ Solução interna de pipeta para células CHO

Concentrações finais em mM. Solução ajustada para pH 7,3:

K⁺-aspartato 130

NaCl 10

MgCl₂ 2

EGTA-KOH 10

HEPES-KOH 10

[Ca²⁺]_i de ~50 nM

4.2. Animais

Exemplares de *Opisthacanthus cayaporum*, de ambos os sexos, coletados em Palmas, Tocantins, sob licença do IBAMA n° 048/2007-CGFAU, foram mantidos em terrários apropriados no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, onde receberam água *ad libitum* e foram alimentados periodicamente com baratas.

4.3. Extração e Quantificação da peçonha

A peçonha de exemplares adultos de *Opisthacanthus cayaporum* foi extraída por meio de estimulação elétrica próximo ao telson. A peçonha foi solubilizada em água deionizada e submetida à centrifugação a 10.000 *g* por 5 min. O sobrenadante foi retirado, seco a vácuo e armazenado a -20°C. A quantificação foi feita por espectrofotometria a 280 nm. Um intervalo mínimo de 30 dias foi respeitado entre extrações de peçonha.

4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Alíquotas de 1mg de peçonha de *O. cayaporum* foram fracionadas em HPLC utilizando coluna de fase-reversa C₁₈ analítica (250 x 4,60 mm, 4 microns, Phenomenex, Inc., USA). A cromatografia foi realizada em um gradiente linear da solução A (0,12% ácido trifluoroacético - TFA em água) a 60% da solução B (0,10% TFA em acetonitrila), a um fluxo de 1mL/min, por 60 min. A detecção foi feita por leitura das absorvâncias a 216 e 280nm (sensibilidade de 0,5-unidades). As frações foram coletadas manualmente e secadas a vácuo. Um segundo passo de cromatografia foi requerido para purificação dos peptídeos caracterizados neste trabalho.

4.5. Espectrometria de massas

A inspeção das massas moleculares dos compostos foi realizada em sistema MALDI-TOF/TOF (MS) e para fragmentação das amostras de interesse em sistema MS/MS. As frações foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5), na proporção 3:1 (matriz:amostra). As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletido ou linear positivo, utilizando calibração externa. As amostras analisadas foram depositadas em uma placa do tipo Anchorchip (600 mm), secas à temperatura ambiente. As figuras de espectrometria de massas foram elaboradas utilizando-se o software gratuito mMass (<http://mmass.biographics.cz/>).

4.5.1. Sequenciamento MS/MS

O sequenciamento foi realizado em sistema MALDI-TOF/TOF, auxiliado pelas sequências obtidas da análise do transcriptoma da glândula de peçonha de *O. cayaporum* (Silva *et al.*, 2009). Os espectrogramas de massas dos fragmentos seqüenciados foram interpretados com auxílio do software PepSeq, Micromass-1999.

4.6. Bioinformática

A busca por similaridade de sequências foi realizada por meio da ferramenta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos foram obtidos por ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2index.html>).

A modelagem da κ -KTx2.5 foi realizada com auxílio do SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold *et al.*, 2006). A sequência peptídica foi comparada com o banco de dados PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) em busca de estruturas homologas para serem utilizadas como parâmetro. A ferramenta disponível em <http://cl.sdsc.edu> foi utilizada para calcular o alinhamento estrutural entre as duas cadeias peptídicas.

O diagrama de Helical Wheel foi obtido em <http://www.kael.net>.

4.7. Síntese de peptídeos

A toxina κ -KTx2.5s foi adquirida da GenWay Biotech, Inc., San Diego, CA.

4.8. Ensaio antimicrobiano

Foram utilizadas bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922,) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) gentilmente cedidas pelo Laboratório Exame, Brasília, DF. Colônias destas bactérias foram inoculadas em meio líquido estéril LB. Após a incubação *overnight* a 37°C, uma alíquota desta cultura foi transferida para 10 mL de meio fresco e incubada a 37°C sob agitação constante, até a densidade ótica de 0,5 a 600nm.

O peptídeo foi dissolvido e diluído em meio LB, sendo sua concentração inicial de 256 μ M. O volume final foi de 200 μ L, sendo 100 μ L da solução do peptídeo a ser testado e os outros 100 μ L de suspensão bacteriana. Os controles positivos foram feitos em triplicata e foi constituído de 100 μ L da suspensão de cada bactéria e 100 μ L do meio LB. O controle negativo, também em triplicata, foi constituído 200 μ L do meio LB. A leitura da absorbância foi feita a 630nm após 12h de incubação a 37°C.

4.9. Eletrofisiologia

Cultura de células: Células ovarianas de hamsters Chineses (CHO) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada e com 5% CO₂.

Cerca de 2×10^4 células foram transfectadas com 1-1,5 μ g do vetor pcDNA3.1 que codifica para os canais humanos ou Kv1.1 ou Kv1.4, juntamente com 0,2 μ g de pEGFP-C1 que codifica para uma proteína fluorescente verde (Clontech, E.U.A.) utilizando o kit de reagente de lipofectamina (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Correntes foram registradas 24-72 h após transfecção.

Os peptídeos foram ressuspensos em água destilada e adicionados à solução externa.

As leituras registradas foram realizadas em amplificador EPC10 Heka conectado ao computador. As correntes foram amostradas a 500 μ s por ponto e filtradas *in-line* a 1 kHz. Para aquisição de dados e análises, foi utilizado o *software* Patchmaster (Heka). Os registros em *patch-clamp* foram obtidos a temperatura ambiente. A resistência da pipeta (1-2m Ω), a capacitância da célula e resistência em série foram devidamente compensadas antes da execução dos protocolos.

Estes experimentos foram realizados pela Dr^a Rita Restano-Cassulini, do Departamento de Medicina Molecular y Bioprocessos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

4.10. Preparação em íleo de cobaia

Uma cobaia pesando cerca de 250g, em jejum por 24 horas, foi sacrificada por concussão cefálica, seguida da secção dos vasos cervicais. Pequenos seguimentos de íleo, com cerca de 2 cm de comprimento foram dissecados e lavados cuidadosamente com solução Tyrode. O segmento de íleo foi amarrado em uma das extremidades a um bastão de aço imerso no banho de uma cuba de vidro, com capacidade para 10mL e dotado de um sistema de aquecimento da solução fisiológica, cuja temperatura foi mantida a 35° C. A outra extremidade foi acoplada ao transdutor isométrico F-60 conectado ao polígrafo, ambos da NARCO Bio Systems. A preparação foi estabilizada por aproximadamente 30 minutos, mantendo-se constante o arejamento com carbogênio e trocando-se a cada 10 min a solução Tyrode. Após esse período, adicionou-se bradicinina em diferentes concentrações (de 16 $\times 10^3\mu$ M a 4 $\times 10^3\mu$ M, registrando-se a contração durante 1 min. Após esse período, a solução fisiológica foi trocada cinco vezes. Após o registro do controle com bradicinina, a preparação foi lavada e incubada com do peptídeo κ -KTxs2.5, e após registro de 1 minuto adicionou-se bradicinina na concentração 4 $\times 10^3\mu$ M. Repetiu-se este procedimento, pré-incubando a preparação com o peptídeo em três diferentes concentrações de 3,19, 6,38 e 9,58 μ M. O experimento foi repetido em três seguimentos diferentes de íleo.

4.11. Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos κ -KTxs2.5 nativo e sintético foram obtidos em espectropolarímetro Jasco815, com comprimento de onda variando de 190 a 260nm, em célula de quartzo de 1 mm. Os peptídeos foram preparados em água, e em solução aquosa de TFE a 10, 30 e 50%, a 25°C. O TFE é um promotor de estruturas secundárias em peptídeos e proteínas. A adição de TFE à solução aquosa de peptídeos auxilia a estabilização de α -hélices por meio da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares. Os resultados foram expressos em elipicidade molar ($\text{deg}\times\text{cm}^2/\text{dmol}$). A termoestabilidade dos peptídeos diluídos em água deionizada foi testada a partir dos espectros obtidos em temperaturas que variaram de 25 a 97°C (adquiridos a cada 10°C).

5. RESULTADOS

5.1. FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DE *O. CAYAPORUM*

A figura 9 ilustra o perfil cromatográfico obtido do fracionamento de 1 mg peçonha em RP-HPLC, em coluna C18 analítica. Observa-se a separação de 60 frações cromatográficas, sendo algumas selecionadas para posterior recromatografia e caracterização do peptídeo purificado.

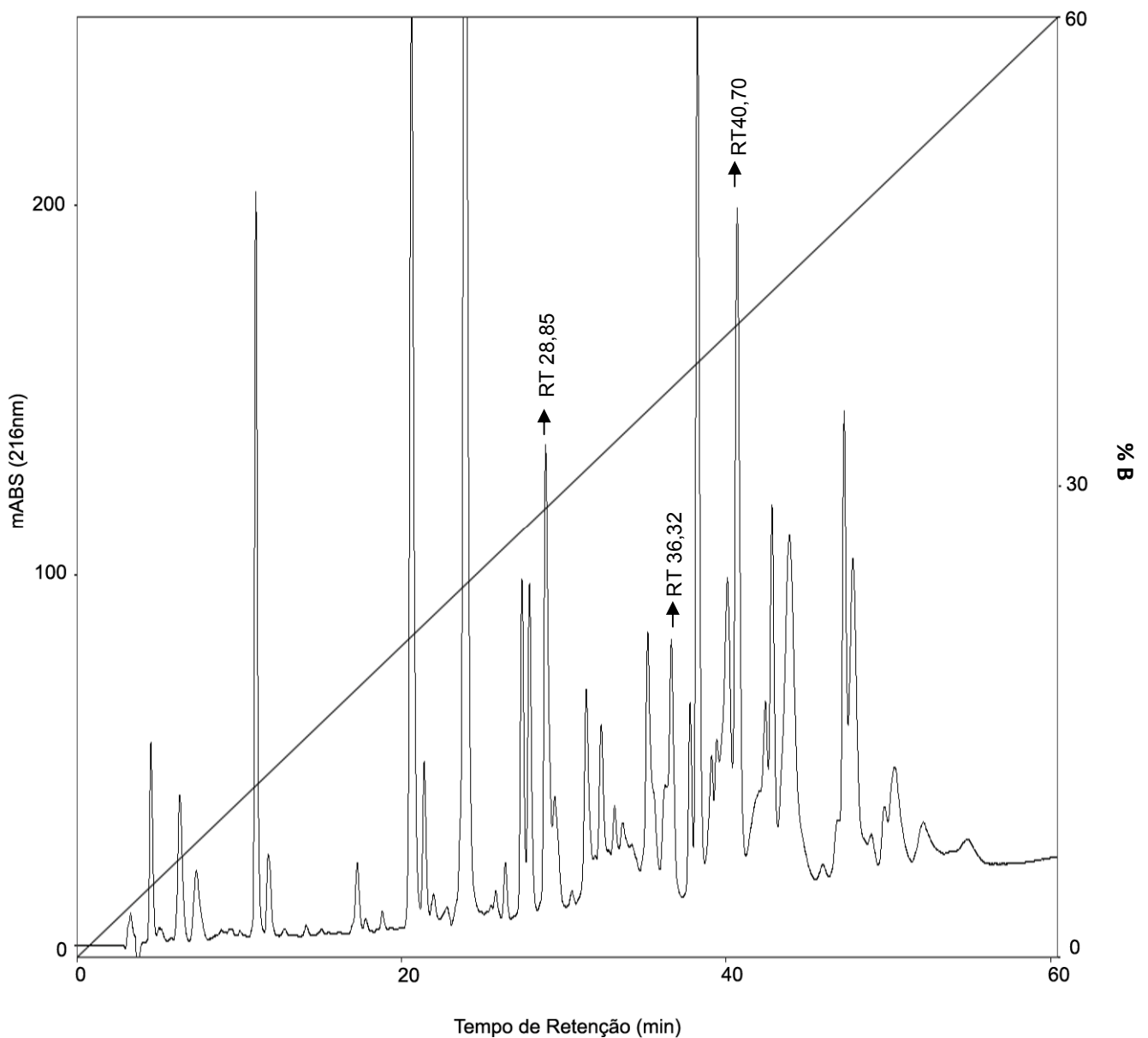


Figura 9. Perfil cromatográfico da peçonha de *O. cayaporum*. Perfil cromatográfico obtido pelo fracionamento de 1 mg de peçonha bruta de *O. cayaporum*. As frações indicadas foram recromatografadas e os peptídeos purificados foram caracterizados.

5.2. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS

5.2.1. RT 28,85

A fração RT28,85 foi recromatografada em coluna de fase reversa C18 analítica, com gradiente de 20 a 40% de B em 40 minutos, a 1mL por minuto, a 216nm. Foram originadas duas frações majoritárias (Fig. 10), chamadas de RT28,85(11,78) e RT28,85(12,58). Um peptídeo com 5090,00Da foi purificado da fração RT28,85(11,78) (não caracterizado neste trabalho) e o peptídeo de 3132,26Da foi isolado e caracterizado da RT28,85(12,58).

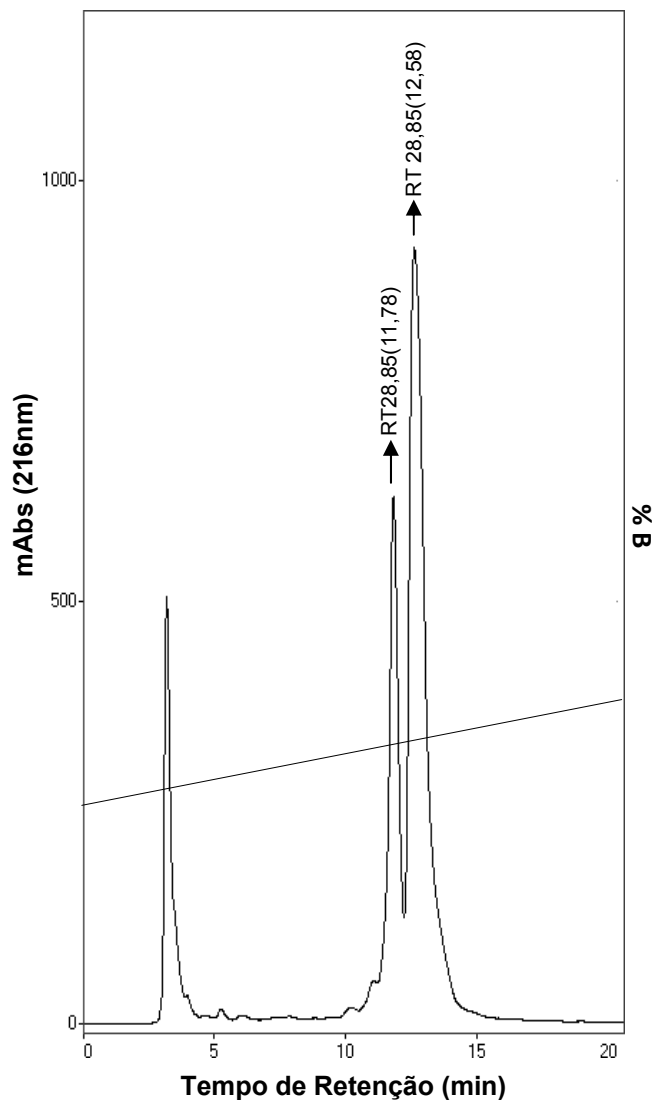


Figura 10. Recromatografia da fração RT 28,85. A recromatografia da fração RT 28,85 originou duas frações distintas chamadas de RT 28,85(11,78) e RT28,85(12,58). Gradiente de 20 a 40% de B, em 40 minutos, a 1mL/min.

O peptídeo RT28,85(12,58) teve sua massa molecular determinada por MALDI TOF/TOF MS, mostrando ser um peptídeo de 3132,26Da (Fig. 11). A sequência parcial deste peptídeo foi realizada por degradação de Edman em Schwartz *et al.*, (2008). Na análise do transcriptoma da glândula de peçonha de *O. cayaporum*, o precursor chamado de OcyC8 possui massa teórica monoisotópica de 3136,36Da e pI 4,92 (Silva *et al.*, 2009) e corresponde ao peptídeo RT28,85(12,58).

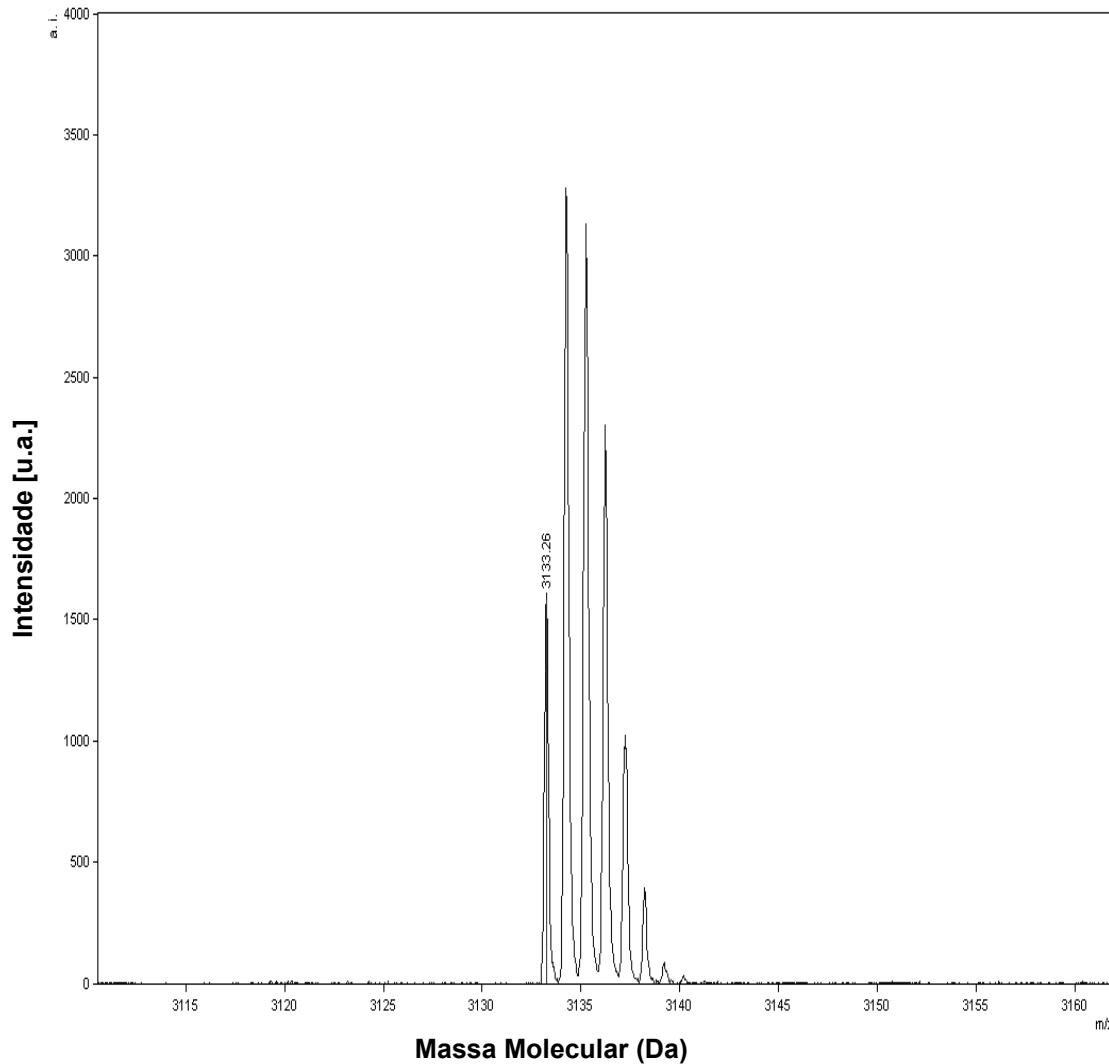


Figura 11. Espectrograma de massa molecular da RT(28,85)12,58. A figura ilustra a resolução monoisotópica da fração RT(28,85)12,58 (M+H), cujo espectro foi obtido em MALDI TOF/TOF MS.

A sequência de aminoácidos do precursor identificado por Silva *et al.*, (2009) confirmam a porção N-terminal divulgada em Schwartz *et al.*, (2008). A figura 12 ilustra a sequência completa do peptídeo 3132,26Da.

YDACVNACLEHHPNVRECEEACKNPVPP

Figura 12. Sequência de aminoácidos do peptídeo RT28,85(12,58).

A sequência de aminoácidos da RT28,85(12,58) apresentou identidade com peptídeos bloqueadores de canal para K⁺, isolados de *Heterometrus fulvipes* (κ -KTx1.1-1.2, acc P82850, P82851) (Srinivisan *et al.*, 2002), *Heterometrus spinifer* (κ -KTx 1.3, acc P83655) (Nirthanan *et al.*, 2005) e *Opisthacanthus madagascariensis* (κ -KTx2.1, 2.2 e 2.4, acc P0C1Z3; κ -KTx2.4, acc P0C1Z4) (Chagot *et al.*, 2005) (Fig.13). Esses peptídeos compõem a família κ -KTx. O peptídeo RT28,85(12,58) foi nomeado κ -KTx2.5 segundo classificação sugerida previamente (Tytgat *et al.*, 1999).

Nome	Sequência	% de Identidade
κ -KTx1.1	GHAC ^{<u>Y</u>} RNC ^{<u>W</u>} REGNDEET ^{<u>C</u>} KERC-----	27
κ -KTx1.2	GHAC ^{<u>Y</u>} RNC ^{<u>W</u>} REGNDEET ^{<u>C</u>} KERC ^{<u>G</u>} -----	26
κ -KTx1.3	GFG ^{<u>C</u>} YRSC ^{<u>W</u>} KAGHDEET ^{<u>C</u>} KKE ^{<u>C</u>} S-----	17
κ -KTx2.1	-DPC ^{<u>Y</u>} EV ^{<u>C</u>} LQ ^{<u>Q</u>} HGNVKE ^{<u>C</u>} EEA ^{<u>C</u>} KHPVE-	61
κ -KTx2.2	-DPC ^{<u>Y</u>} EV ^{<u>C</u>} LQ ^{<u>Q</u>} HGNVKE ^{<u>C</u>} EEA ^{<u>C</u>} KHPVEY	59
κ -KTx2.3	NDPC ^{<u>Y</u>} EV ^{<u>C</u>} LQ ^{<u>H</u>} TGNVKA ^{<u>C</u>} EEA ^{<u>C</u>} Q-----	52
κ -KTx2.4	-DPC ^{<u>Y</u>} EV ^{<u>C</u>} LQ ^{<u>Q</u>} HGNVKE ^{<u>C</u>} EEA ^{<u>C</u>} KHP---	62
κ -KTx2.5	YDAC ^{<u>V</u>} NAC ^{<u>L</u>} E ^{<u>H</u>} H ^{<u>P</u>} NVRE ^{<u>C</u>} EEA ^{<u>C</u>} K ^{<u>N</u>} <u>P</u> ^{<u>V</u>} <u>P</u> ^{<u>P</u>}	100

* . * . : . *:: *

Figura 13. Alinhamento das k-KTx. Alinhamento da k-KTx 2.5 com as outras k-KTx já descritas na literatura, e a porcentagem de identidade em relação às outras toxinas. Nota-se, em sublinhado, a sequência PVPP característica de peptídeos potencializadores de bradicinina. (*) aminoácidos idênticos; (:) substituições conservativas.

As κ -KTxs possuem conformação C α / α mantida por 2 pontes dissulfeto no arranjo C1-C4 e C2-C3. Por homologia foi construído um modelo da κ -KTx2.5, conforme ilustrado na Figura 14.



Figura 14. Modelo da κ -KTx2.5. Baseado em homologia, o modelo evidencia a conformação em Csa/ α (Silva *et al.*, 2009).

A formação de α -hélices pela κ -KTx2.5 foi confirmada após a obtenção de espectro de dicroísmo circular, onde foi possível a identificação de um padrão de elipicidade correspondente ao padrão de absorção das α -hélices (Fig.15), em 208 e 222nm, tanto da toxina nativa quanto da sintética (Fig.16a,b). No entanto a toxina sintética apresentou predominância de estruturas randômicas na concentração de 50% de TFE, indicando desnaturação do peptídeo (Fig. 16 b, pontilhado cinza).

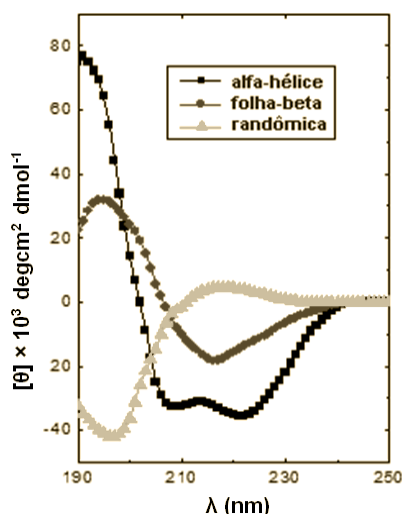


Figura 15. Exemplo de espectros dicróicos. Ilustração dos espectros dicróicos característicos de estrutura secundárias: α -hélice (preto com quadrados), folhas- β (cinza escuro com círculos) e estruturas randômicas (cinza claro com triângulos) (http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm).

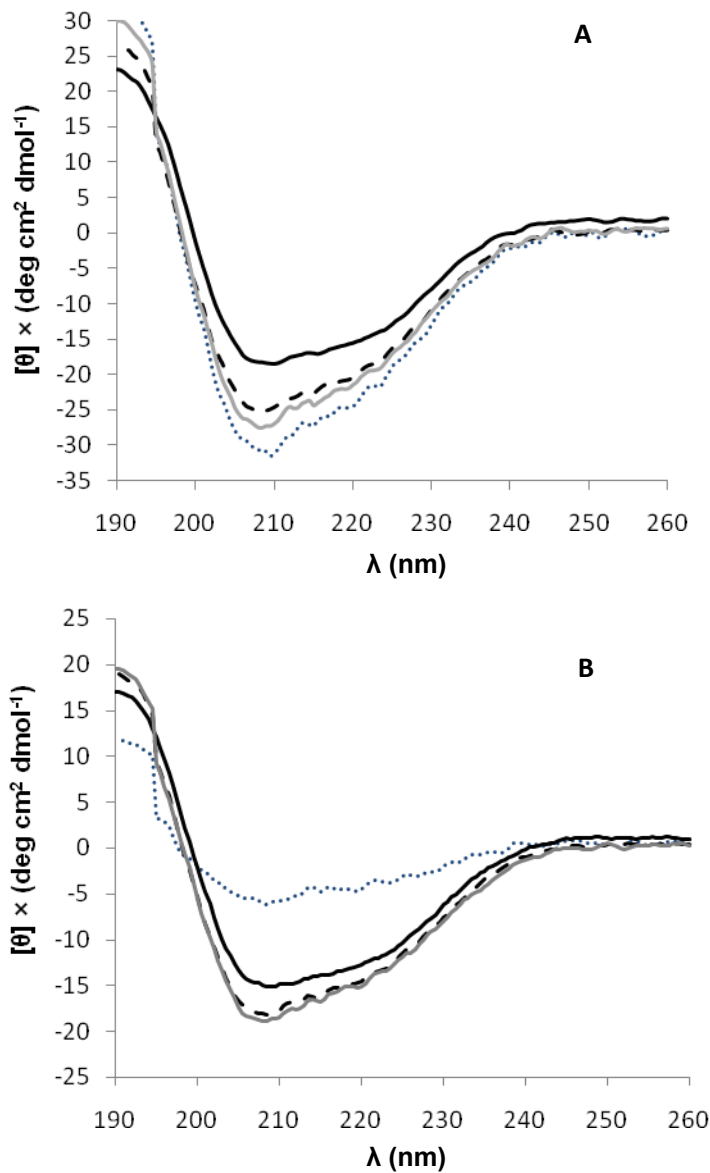


Figura 16. Espectros de dicroísmo circular das κ -KTx nativa (A) e sintética (B). Espectros de dicroísmo circular das κ -KTx2.5 nativa(A) e sintética(B) em água (linha preta sólida), 10% TFE (traçado preto), 30% TFE (sólido cinza), 50% TFE (pontilhado cinza). Os peptídeos mostraram padrão de elipicidade característico de α -hélices. θ :Elipicidade; λ : comprimento de onda.

A termoestabilidade das κ -KTx2.5 nativa e sintética foi testada em temperaturas que variaram de 25 a 95°C, com obtenção de espectro de dicroísmo circular a cada 10°C (Fig. 17). A molécula nativa mostrou uma variação do espectro dicróico na temperatura de 25°C (Fig. 17 A, preto), indicando uma instabilidade em sua conformação. Entretanto, após temperatura de 25°C, manteve-se de forma estável, apresentando predominância de estrutura α -hélice em todo gradiente de

temperatura. O peptídeo sintético sofreu pequenas variações no espectro, sem, contudo, perder a predominância de α -hélices como estrutura secundária (Fig. 17B).

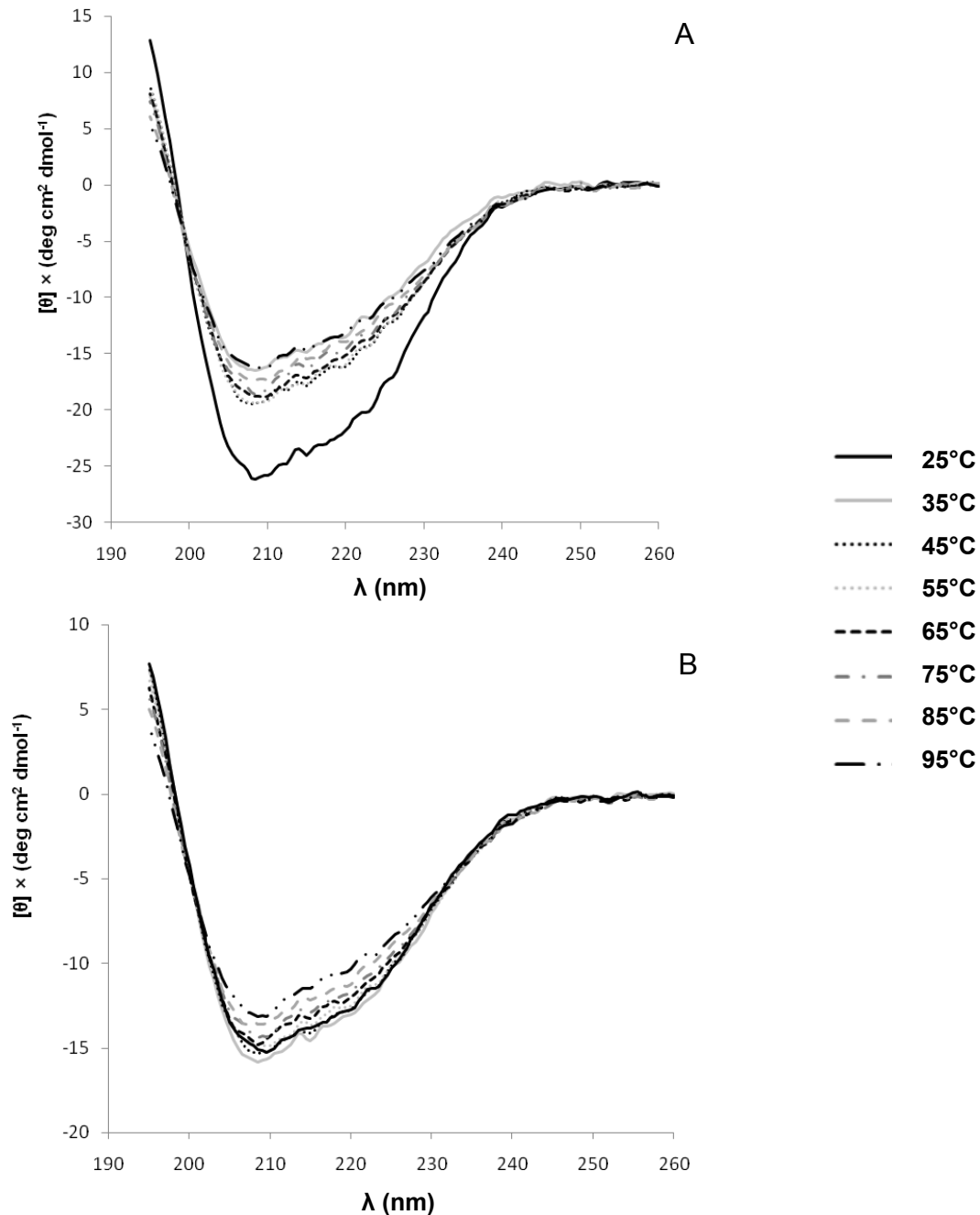


Figura 17. Espectros dicróicos das κ -KTx2.5 nativa e sintética, em um gradiente de temperatura. Espectros dicróicos das κ -KTx2.5 nativa (A) e sintética (B) em um gradiente de temperatura que variou de 25 a 97°C, em destaque a linha sólida preta que corresponde à temperatura de 25°C, onde a κ -KTx2.5 nativa apresentou instabilidade.

A κ -KTx2.5 nativa foi testada em canais para K^+ dos tipos hKv1.1, hKv1.4 e hERG1 (Fig.18). Nos canais Kv1.1, 16 μ M do peptídeo reduziram as correntes de K^+ em menos do que 20% (Fig.18a). Nos canais hKv1.4, a κ -KTx2.5, a 16 μ M, reduziu em cerca de 50% as correntes de K^+ (Fig.18b). A corrente de cauda registrada em hERG1 apresentou um comportamento de retardamento da desativação, atrasando o fechamento dos canais.

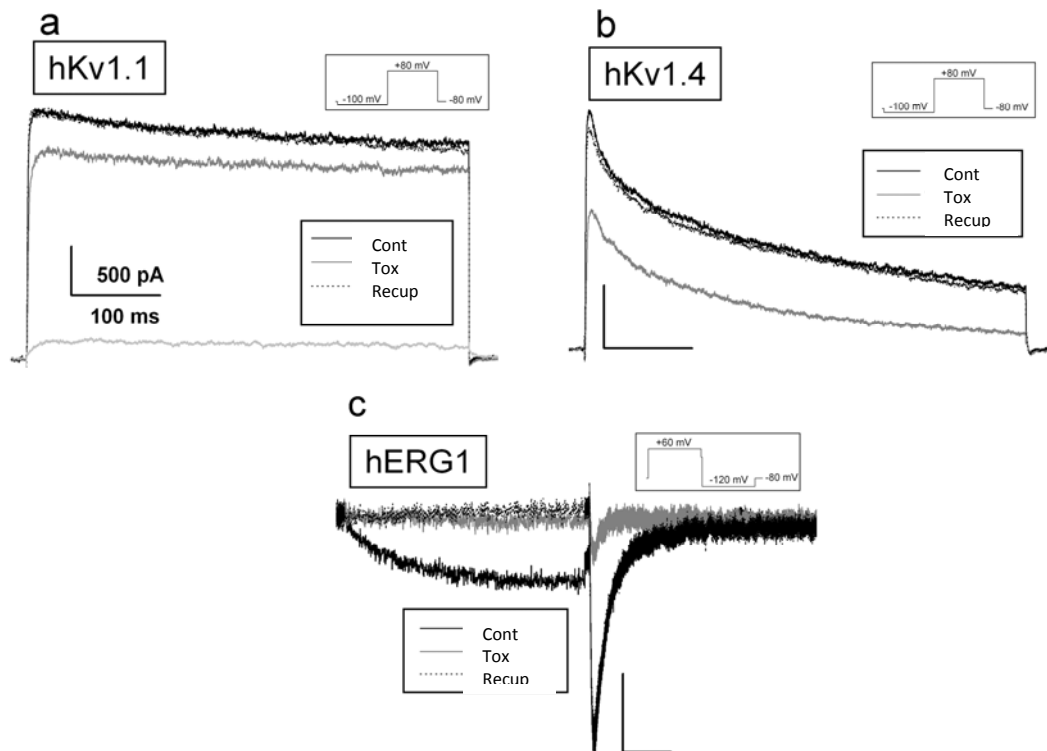


Figura 18. Atividade da κ -KTx2.5 nativa sobre os canais hKv1.1, hKv1.4 e hERG1. A aplicação de 16 μ M da κ -KTx2.5 bloqueou de forma reversível os canais para K^+ dos tipos hKv1.1 (a), hKv1.4 (b) e retardou a desativação dos canais em hERG1 (c).

As curvas concentração-resposta da κ -KTx sintética (κ -KTxs) foram obtidas para hKv1.1 e hKv1.4, a partir das quais pôde-se obter os valores de IC_{50} de $71 \pm 8,9$ μ M em hKv1.4 e de 217 ± 46 μ M para hKv1.1 (Fig. 19 A e C, respectivamente). Em Fig.19B, um exemplo de corrente em hKv1.4 utilizando um protocolo de incremento de -80 mV a 80 mV, no controle (em preto) e depois da aplicação de 64 μ M da toxina (em cinza). A relação I/V no controle (quadrados pretos) e depois da aplicação de κ -KTx2.5s (círculos cinza) mostram a não-dependência de voltagem para o bloqueio.

A Figura 19D ilustra a sobreposição dos traçados das correntes em hKv1.1 no controle (em preto), na presença de 145 μM da toxina (linha cinza) e das correntes na presença de 145 μM da toxina normalizada com o controle (traçado cinza). As correntes foram obtidas com um único passo de despolarização a 50 mV. Neste potencial, o tempo corrido da ativação da corrente é expresso com uma dupla equação exponencial, sendo τ_{fast} ($1,8 \pm 0,3$ ms) e τ_{slow} ($34 \pm 0,4$ ms) as constantes de tempo do processo. Durante a aplicação da toxina, nenhuma mudança significativa foi percebida para o τ_{fast} ($3,3 \pm 1,2$ ms), enquanto que a toxina foi capaz de diminuir o τ_{slow} (76 ± 8 ms) (traçado cinza e gráfico de barras). Um efeito semelhante foi relatado anteriormente para k-Hefutoxina1 em correntes de K^+ nos canais Kv1.3 (Srinivasan *et al*, 2002).

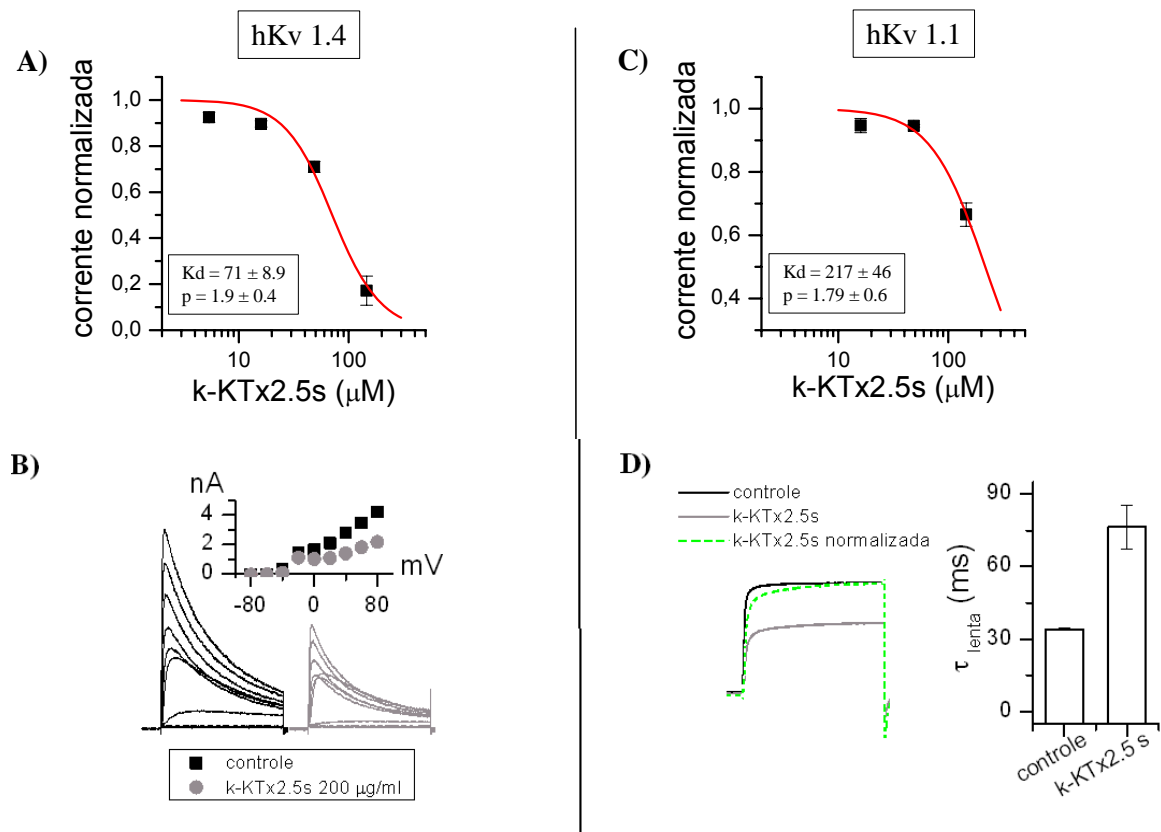


Figura 19. Curvas concentração-resposta da κ -KTx2.5s sintética (κ -KTx2.5s) em ensaio de *Patch-Clamp*. **A)** Curva concentração-resposta obtida em hKv1.4. Os dados foram ajustados em escala semi-logarítmica originando um IC_{50} de $71 \pm 1,9 \mu\text{M}$ e coeficiente de Hill de $1,9 \pm 0,4$. **B)** Exemplo de corrente em hKv1.4 utilizando um protocolo de incremento de -80 mV a 80 mV , no controle (preto) e depois da aplicação de $64 \mu\text{M}$ da toxina (cinza). A relação I/V no controle (quadrados pretos) e depois da aplicação de κ -KTx2.5s (círculos cinza) mostram a não-dependência de voltagem para o bloqueio. **C)** Curva concentração-resposta obtida em hKv1.1. Os dados foram ajustados em escala semi-logarítmica originando um IC_{50} de $217 \pm 46 \mu\text{M}$ e um coeficiente de Hill de $1,8 \pm 0,6$. **D)** Sobreposição dos traçados das correntes em hKv1.1 no controle (preto), na presença de $145 \mu\text{M}$ da toxina (linha cinza) e das correntes na presença de $145 \mu\text{M}$ da toxina normalizadas com o controle (traçado cinza). As correntes foram obtidas com um único passo de despolarização a 50 mV . Neste potencial, o tempo corrido da ativação da corrente é expresso com uma dupla equação exponencial, sendo T_{fast} ($1,8 \pm 0,3 \text{ ms}$) e T_{slow} ($34 \pm 0,4 \text{ ms}$) as constantes de tempo do processo. Durante a aplicação da toxina, nenhuma mudança significativa foi percebida para o T_{fast} ($3,3 \pm 1,2 \text{ ms}$), enquanto que a toxina foi capaz de diminuir o T_{slow} ($76 \pm 8 \text{ ms}$) (traçado cinza e gráfico de barras).

Na concentração de $128 \mu\text{M}$, a κ -KTx2.5 sintética não apresentou atividade antibacteriana em *E. coli* e *S. aureus* (dado não mostrado).

No ensaio *in vitro* de segmentos de íleo de cobaia, a bradicinina promoveu contração dose-dependente (dado não mostrado). A κ -KTx2.5 sintética não induziu

qualquer efeito em segmentos de íleo de cobaia quanto adicionada sozinha à solução fisiológica (Fig. 20). Quando o segmento de íleo foi pré-incubado com a κ -KTx2.5s, a resposta à bradicinina não foi alterada de maneira significativa, baseado no cálculo da média dos 3 experimentos (Fig. 20).

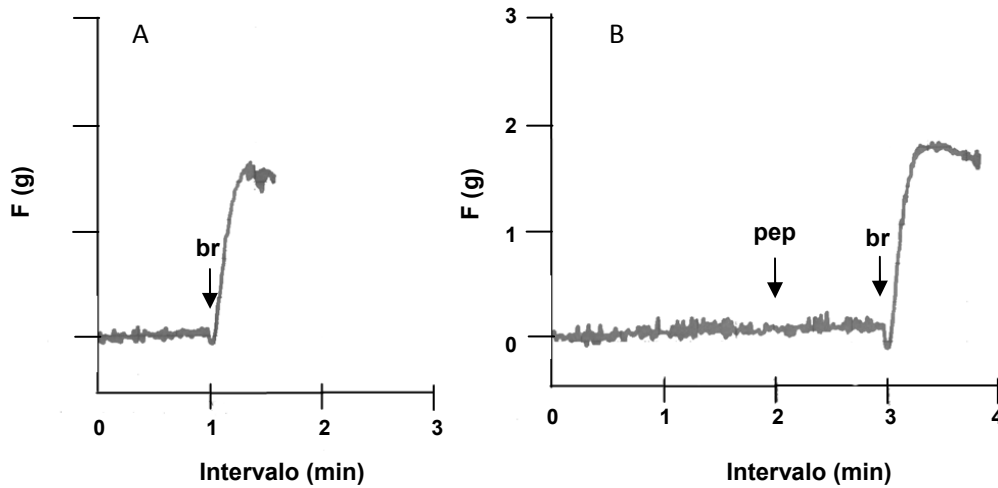


Figura 20. Registro da contração de segmento de íleo de cobaia. A) Registro após a adição de bradicinina $4 \times 10^3 \mu\text{M}$; B) registro após aplicação de κ -KTx2.5s $6,39 \mu\text{M}$ (pep), e aplicação da bradicinina $4 \times 10^3 \mu\text{M}$ (br) após a pré-incubação com κ -KTx2.5s $6,39 \mu\text{M}$.

5.2.2. RT 36,32min

A Figura 21 mostra a recromatografia da fração RT36,32, que foi, então, separada em quatro frações. A massa molecular dos componentes dessas frações foi determinada e a fração de RT36,32(9,05), foi selecionada por possuir os dois peptídeos de interesse, de massas moleculares de 1173,69 e 1285,74Da.

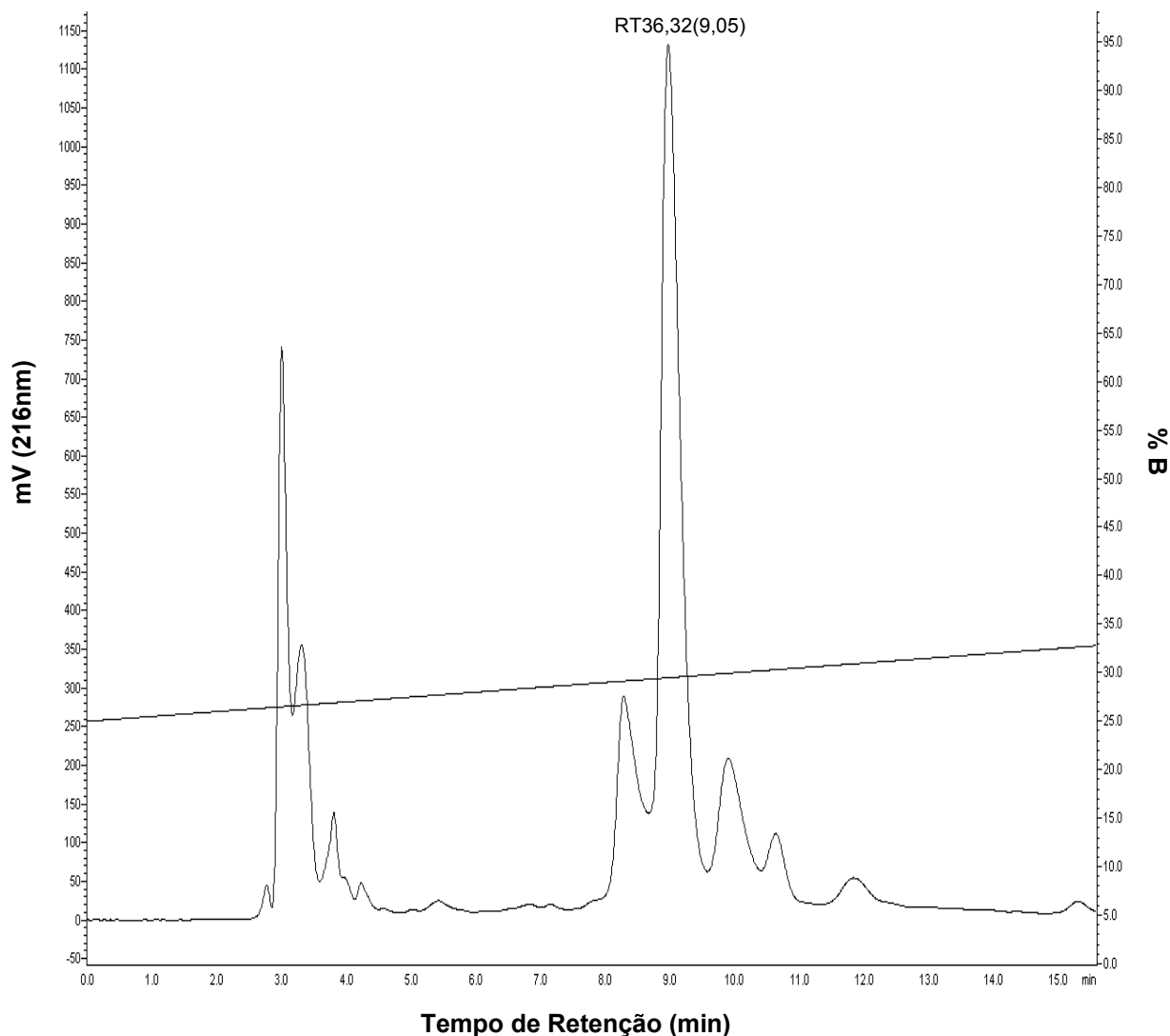


Figura 21. Recromatografia da fração RT36,32. A recromatografia do RT 36,32 foi realizada em um gradiente de 25 a 45% de B, a 1mL/min. A fração correspondente aos peptídeos de 1173,69 e 1285,74Da está indicada por RT36,32(9,05).

O peptídeo 1285,74Da teve sua sequência de aminoácidos determinada por sequenciamento *de novo* (Fig. 22a,b). Este peptídeo possui 12 resíduos de aminoácidos e foi classificado como um membro das NDBPs. Conforme mostra o alinhamento de sequências (Fig. 23), esse peptídeo possui identidade de 83% com o

IsCT, peptídeo descrito em *Opisthacanthus madagascariensis*, que apresenta atividade antimicrobiana e hemolítica (Dai *et al.*, 2001) e com outros peptídeos da família 5 dos NDBPs.

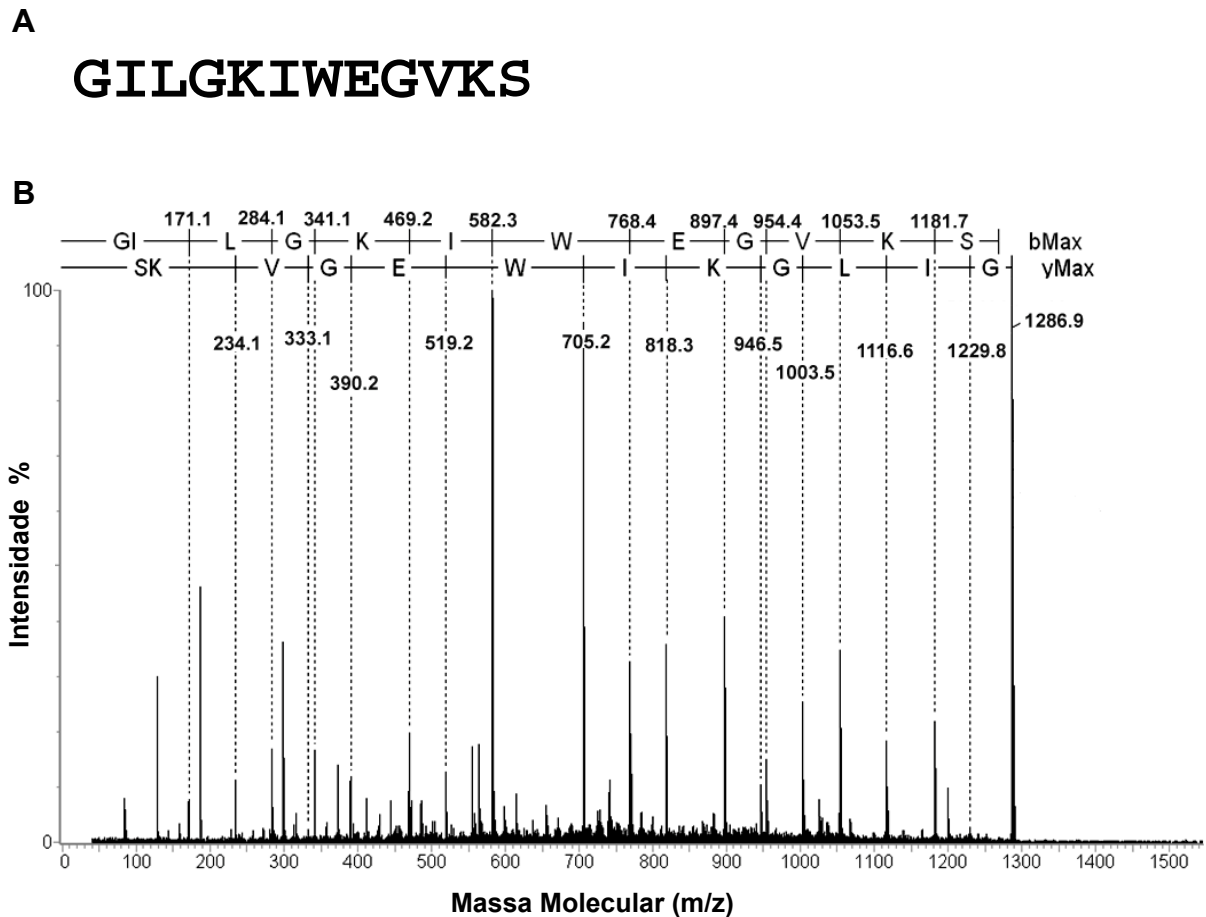


Figura 22. Sequência completa do peptídeo 1285,74Da e sequenciamento *de novo*. A) Sequência completa do peptídeo 1285,74Da. B) Sequenciamento *de novo* do peptídeo 1285,74 Da. As séries “y” e “b” estão apresentadas no topo direito em B.

Dados gerados a partir da construção da biblioteca de cDNA em Silva *et al.*, 2009, permitiram a inferência de que o peptídeo de 1285,74Da corresponde a um fragmento de um precursor chamado de OcyC2, cuja sequência predita é GILGKIWEGVKS_{LI} e massa molecular teórica de 1511,913Da, que foi chamado de NDBP5.8. Utilizando a mesma nomenclatura adotada para as IsCTs de *O. madagascariensis* (Dai *et al.*, 2002), sugerimos que o fragmento do peptídeo NDBP 5.8 seja denominado de OcCT2f.

Peptídeo	Sequência de aa	% de Identidade
OcCT2f	GILGKIWEGVKS--	100
OcyC2_NDBP 5.8	GILGKIWEGVKSLI	84
OcyC1_NDBP 5.7	-ILSAIWSGIKSLF	58
IsCT_NDBP 5.2	-ILGKIWEGIKSLF	83
IsCT2_NDBP 5.3	-IFGAIWNGIKSLF	58
BmKn1_NDBP 5.1	-FIGAVAGLLSKIF	33
BmKn2_NDBP 5.4	-FIGAIARLLSKIF	25
Hge027_NDBP 5.5	-IFSAIAGLLSNLL	16
Hge028_NDBP 5.6	-F---IFDLLKLV	20
	: : :	

Figura 23. Alinhamento do peptídeo OcCT2f com NDBPs. Alinhamento do OcCT2f, o peptídeo de 1285,74Da, e membros da família NDBP 5. As identidades do OcCT2f em relação aos peptídeos alinhados é apresentada a direita. “:” substituições conservativas.

Apesar do tamanho diminuto, é provável que o OcCT2f forme α -hélice em solução aquosa. O diagrama em Helical Wheel (Fig. 24) sugere uma conformação em α -hélice com uma separação das cargas apolares (cinza) e polares e neutras (branco), o que é um indicativo de anfipaticidade, que favoreceria a permeabilização desse peptídeo em membranas biológicas. A possível conformação em α -hélice anfipática e a alta identidade com os IsCTs indicam que o peptídeo NDBP 5.8 e seus fragmentos possam apresentar atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana do OcCT2f não pôde ser avaliada por falta do peptídeo puro em quantidades necessárias para a realização do ensaio.

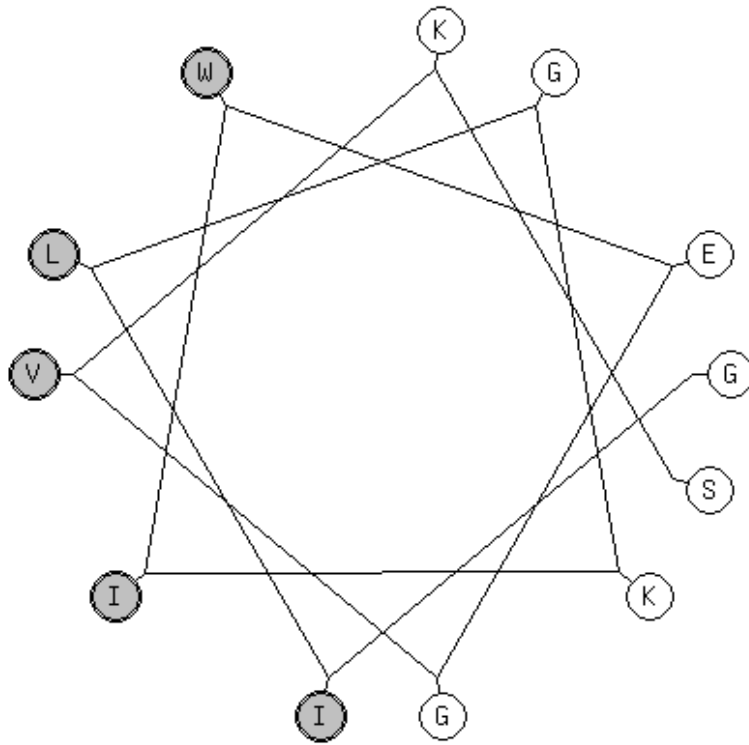


Figura 24. Diagrama de Helical Wheel do peptídeo OcCT2f. A partir da projeção em Helical Wheel é possível observar uma separação das cargas apolares (cinza) e polares e neutras (branco).

5.2.3. RT40,70

A Figura 25 mostra a recromatografia da fração RT40,70, realizada de 30 a 50% de B, a 1 mL por minuto, a 216nm, em coluna de fase reversa C18 analítica. A massa molecular da fração mais abundante obtida da recromatografia foi determinada em MALDI TOF/TOF MS, sendo possível obter a sequência, por sequenciamento *de novo* de um fragmento de 2473,30Da (Fig. 26).

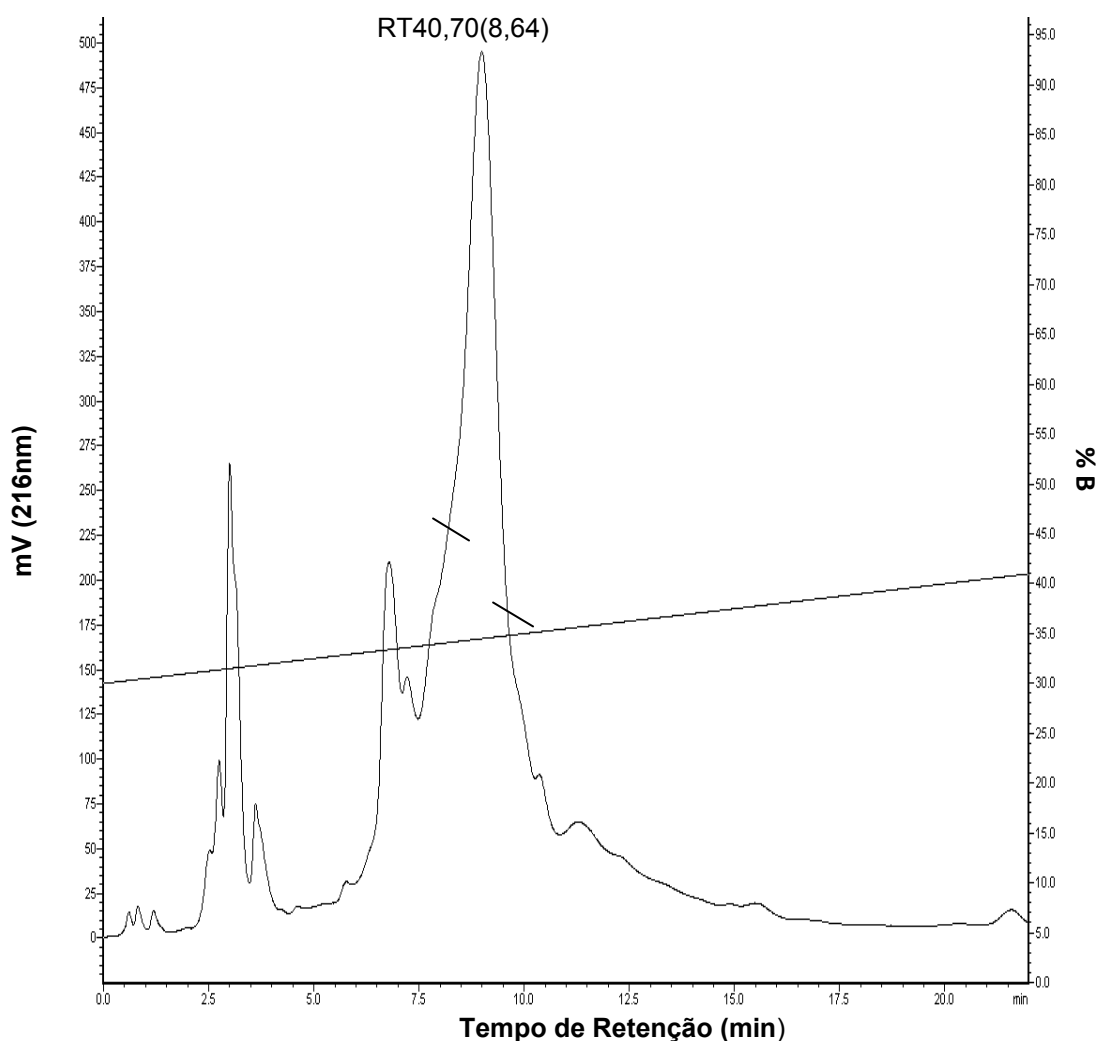


Figura 25. Recromatografia da fração RT40,70. A recromatografia do RT40,70 foi realizada em um gradiente de 30 a 40 % de B, em 20 min, a 1mL/min. Houve a separação em pelo menos 5 frações distintas. A fração indicada por RT40,70(8,64) corresponde à escorpina-like de *O. cayaporum* (Schwartz *et al.*, 2008). Os traços pretos indicam o momento do início e término da coleta.

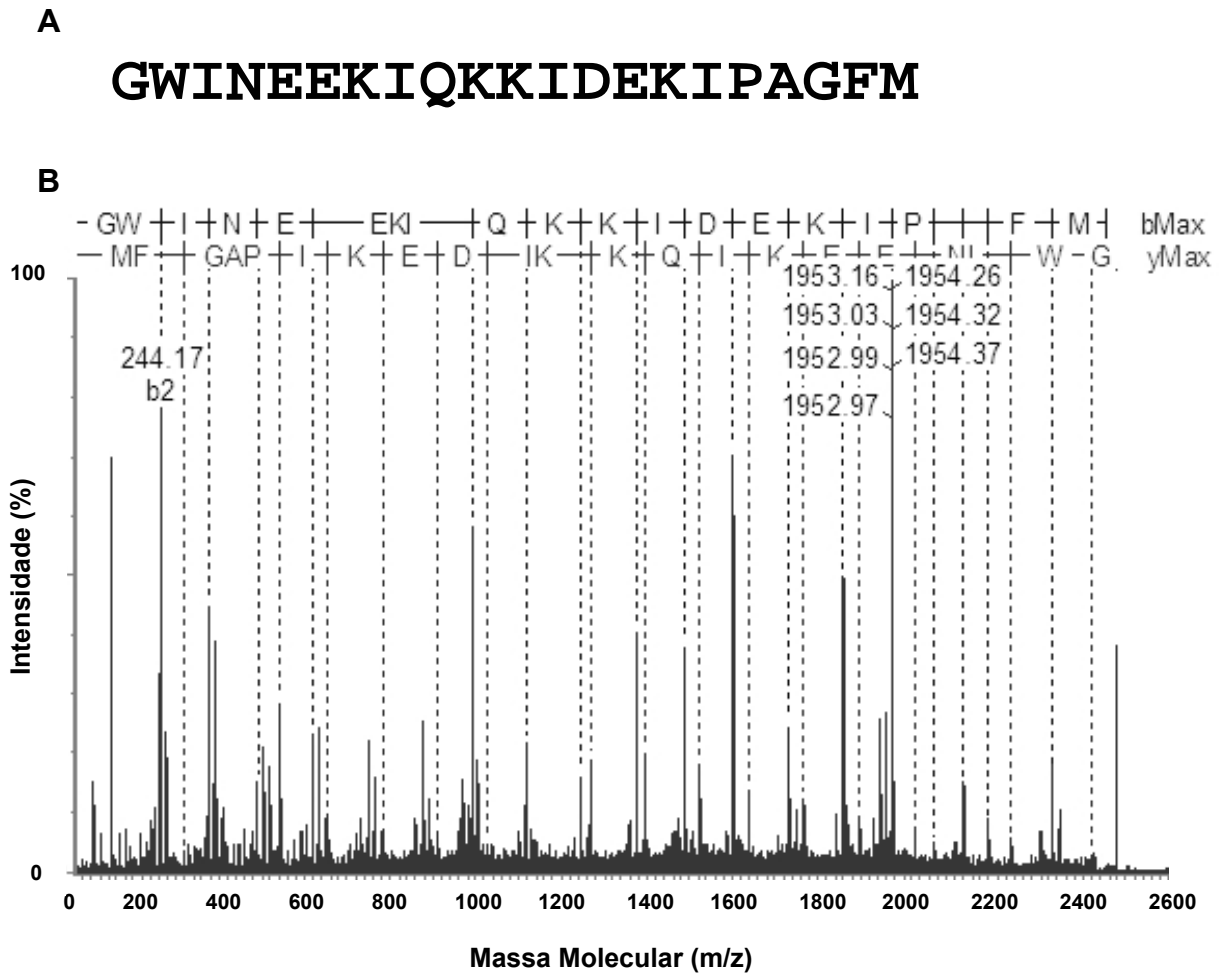


Figura 26. Sequenciamento *de novo* da região N-terminal da escorpina-like de *O. cayaporum*.

A) Sequência de um fragmento N-terminal da escorpina-like . B) Sequenciamento *de novo* de um fragmento de 2473,30Da que corresponde à região N-terminal da escorpina-like. As séries “y” e “b” são anotadas acima, à direita em B.

A busca por similaridade nos bancos de dados e posterior alinhamento mostraram que este fragmento possui identidade com peptídeos da família da escorpina-like (Fig. 27). Schwartz *et al.*, (2008) apresentaram uma sequência parcial de um peptídeo escorpina-like, que possui atividade antimicrobiana a aproximadamente 1,8 μ M.

acc	Sequências
2473, 30Da	GWINEEKIQKKIDEKIPAGFM-----
P0C2F4	GWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAKGEFQCVANIDTMGNCETHCQKTSGEK
P56972	GWINEEKIQKKIDERMGNTVLGGMAKAIIVHKMAKNEFQCMANMDMLGNCEKHCQT-SGEK
Q5WR03	KWFNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEK
Q5WQZ7	KWLNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEK
Q5WQZ9	KWLNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANIDMTKSCDTHCQKASGEK
Q5WR01	KWLNEKSIQNKIDEKIGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCANMDPTGSCETHCQKASGEK
Q0GY40	GWMSEKKVQGILDKKLPEGIIRNAAKAIVHKMAKNQFGCFANVDVKGDCRHKCA-EDKE
Q5G8A6	-GLREKHVQ-KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPA---YEGYCNNHCQDIERKD
	: * : : * : : :

Figura 27. Alinhamento do fragmento N-terminal de 2473,30Da da escorpina-like. Alinhamento do fragmento de 2473,30Da, correspondente ao N-terminal da escorpina-like encontrada em *O. cayaporum*. P0C2F4 : *Heterometrus laoticus* (Uawonggul *et al.*, 2007); P56972: *Pandinus imperator* (Conde *etal.*, 2000); Q5WR03, Q5WQZ7, Q5WQZ9, Q5WR01: *Opisthophthalmus carinatus* (Zhu & Tytgat, 2004); Q0GY40: *Hadrurus gertschi* (Schwartz *et al.*, 2007), Q5G8A6: *Tityus costatus* (Diego-Garcia *et al.*, 2005). "*" aminoácidos idênticos; ":" substituição conservativa.

6. Discussão

✓ κ-KTx 2.5

As KTxs são toxinas de 20-95 resíduos de aminoácidos estabilizadas por três ou quatro pontes dissulfeto e que têm em comum um arranjo estrutural secundário altamente conservado conhecido por CSα/β (arranjo α/β estabilizado por cisteínas), que consiste de uma alfa-hélice ligada a duas ou três folhas-beta pelas pontes dissulfeto, o que torna esta estrutura bastante estável (Fig. 28) (Rodriguez de la Vega *et al.*, 2003).



Figura 28. Árvore filogenética das KTxs. As KTx estão relacionadas por sua estrutura primária e pelo arranjo de sua estrutura secundária, como é possível visualizar nas imagens 3D de diversas KTxs (Retirado de Rodriguez de la Vega *et al.*, 2003).

Essas toxinas foram originalmente classificadas em três famílias chamadas α, β e γ. Porém, nos últimos anos vêm sendo descritas toxinas com um arranjo

estrutural diferenciado, com apenas duas α -hélices estabilizadas por duas pontes dissulfeto, CS α / α . Esta família foi nomeada κ -KTx como sugerido em Tytgat *et al.*, 1999.

O primeiro peptídeo descrito desta família foi a k-Hefutoxin1, de *Heterometrus fulvipes* (Srinivasan *et al.*, 2002), que foi chamada sistematicamente de κ -KTx1.1. Por possuir os resíduos de aminoácidos Y5 e K19, semelhantemente a vários outros bloqueadores de canais de K⁺, sugeriu-se que a k-hefutoxin1 pudesse apresentar essa atividade. Desta forma, essa molécula foi testada nos canais de K⁺ Kv1.1, 1.2 e 1.3, provocando uma redução das correntes de K⁺ de 50% em Kv1.3 e de 17% em Kv1.2, a 40 μ M, de forma reversível e não teve efeito sobre canais Kv1.1 (Srinivasan *et al.*, 2002). A κ -hefutoxina 3, que apresenta 60% de identidade com a κ -hefutoxina 1, chamada de κ -KTx1.3, foi isolada de *Heterometrus spinifer*. Apesar da κ -hefutoxina 3 ter alta identidade com a k-hefutoxin 1 e possuir os dois resíduos de aminoácidos importantes para a função de bloqueio de canais de K⁺ (Y5 e K19), a toxina nativa não bloqueou canais Kv1.1, 1.2 e 1.3 (Nirathanan *et al.*, 2005). As Omtoxinas, isoladas de *Opisthacanthus madagascariensis*, apresentam menor identidade com as hefutoxinas e foram classificadas como κ -KTx2.1, 2.2, 2.3 e 2.4,. Esses peptídeos também apresentam a conformação CS α / α e os aminoácidos Y5 (ou Y4) e K15, e assim como as κ -KTx1.1 e 1.2, apresentam baixa afinidade aos canais de K⁺, mostrando-se pouco potentes como bloqueadores de canais de K⁺. A κ -KTx2.3 provocou redução das correntes de K⁺ em 70% em canais Kv1.3, porém a concentrações muito elevadas (500 μ M) (Chagot *et al.*, 2005)

A κ -KTx2.5 apresentou identidade de 62% com a κ -KTx2.4 e de 59% com a κ -KTx2.2, ambas de *O. madagascariensis* (Chagot *et al.*, 2005). Entretanto, a κ -KTx2.5s, quando comparada à KTx2.2, apresentou maior afinidade aos canais Kv1.1, resultando em um valor de IC₅₀ de 220 μ M. A κ -KTx2.5 foi testada em canais Kv1.4, sendo a primeira vez que uma toxina da família κ -KTx é testada em Kv1.4. Em canais Kv1.4, a κ -KTx2.5s se mostrou mais ativa que em Kv1.1, com IC₅₀ de 71 μ M. Apesar da κ -KTx2.5 não apresentar os resíduos das posições 5 e 19 correspondentes à díade característica de bloqueadores de canais de K⁺, foi possível observar o bloqueio de 50% das correntes K⁺ em Kv1.4 e 20% em Kv1.1. Na KTx2.5, os resíduos de aminoácidos nas posições 5 e 19 são, respectivamente V

e E, de onde infere-se que a ausência dos resíduos Y5 e K19 não implica na perda da afinidade aos canais de K⁺.

Ainda assim, as κ-KTx2.5 e κ-KTx2.5s apresentaram atividade bloqueadora de canais de K⁺ apenas em altas concentrações. O IC₅₀ da κ-KTx2.5s foi de cerca de 71 μM em canais Kv1.4 e de 217 μM em canais Kv1.1. Esta alta concentração requerida para o bloqueio dos canais sugere que os alvos biológicos das κ-KTxs possam ser outros subtipos de canais para K⁺ ou, até mesmo, outros alvos moleculares bastante distintos.

As estruturas secundárias das κ-KTx2.5 e κ-KTx2.5s foram avaliadas por dicroísmo circular em água e em água+TFE, que é um solvente promotor de estruturas secundárias. Os solventes promotores de α-hélice mimetizam características dos sistemas *in vivo* e, desta forma, são muito utilizados nos estudos estruturais por meio da técnica de dicroísmo circular. No entanto, a indução da α-hélice pelo TFE só ocorre se o peptídeo possuir sequência primária com possibilidade de estruturar-se com tal. Os ensaios demonstraram que ambos os peptídeos possuem a mesma característica estrutural com padrão de elipicidade característicos de α-hélices, exceto na concentração de 50% de TFE, o que pode indicar diferenças entre as toxinas nativa e sintética. As termoestabilidades também foram avaliadas, sendo que a toxina nativa apresentou instabilidade na temperatura de 25°C, porém essa instabilidade não implicou na desnaturação do peptídeo, que manteve predominância de estrutura α-hélice em todo gradiente de temperatura. A estrutura da toxina sintética mostrou-se estável em todo gradiente de temperatura.

Em virtude da conformação em α-hélices, a atividade antimicrobiana da κ-KTx2.5s foi testada em *E. coli* e *S. aureus*. Não foi demonstrada atividade inibidora do crescimento dessas bactérias na concentração de 128μM do peptídeo. Tal resultado pode ser justificado, em parte, pela estrutura primária do peptídeo que resulta em uma carga líquida negativa e pI de 4,98. Os peptídeos antimicrobianos são, normalmente, catiônicos o que facilita a interação entre a hélice e a membrana negativamente carregada de bactérias.

A presença de duas prolinas na porção C-terminal da κ-KTx2.5 é característico dos potencializadores de bradicinina. Apesar de possuir essa

sequência Prolina-Prolina na região C-terminal, a κ -KTx2.5 não apresentou atividade de potencializador de bradicinina em segmentos de íleo de cobaia, em concentrações micromolares (até 9,58 μ M).

✓ **As OcCT**

Os peptídeos antimicrobianos são considerados uma das formas mais antigas de combate a infecções provocadas por microrganismos. O princípio de ação de alguns desses peptídeos, como é o caso dos peptídeos catiônicos, é a interação entre o peptídeo e as membranas de bactérias. A anfipaticidade da molécula é um importante fator para que ocorra a interação peptídeo-membrana (Giangaspero *et al.*, 2001).

Da fração RT36,32(9,05) foram identificadas duas massas moleculares correspondentes a dois fragmentos de peptídeos preditos pela biblioteca de cDNA (Silva *et al.*, 2009). O fragmento de 1173,69Da (pI 8,75) corresponde ao fragmento de um peptídeo de 1433,83Da, existindo evidências de que este peptídeo seja amidado (dado não mostrado). Seguindo a nomenclatura adotada para as IsCTs, este peptídeo predito é chamado OcCT1, e seu fragmento chamado OcCT1f. O segundo peptídeo identificado corresponde a um fragmento da OcCT2, de 1511,91Da, sendo portanto nomeado de OcCT2f. Esses dois peptídeos pertencem à subfamília 5 dos NDBP de escorpiões. Exceto pelo NDBP5.1, todos os outros integrantes dessa família possuem atividade antimicrobiana.

O peptídeo OcCT2f tem caráter anfipático e catiônico, pI 8,5, e possui identidade de 83% com o IsCT, um peptídeo antimicrobiano (Dai *et al.*, 2001). Estas características são um indicativo de que este peptídeo, OcCT2f, apresente atividade antimicrobiana, e que atue promovendo uma permeabilização da membrana bacteriana, provocando ruptura da membrana. O OcCT2f é um fragmento de um peptídeo inferido pela biblioteca de cDNA de *O. cayaporum*, cuja massa molecular teórica é de 1511,91Da. Infelizmente, não foi possível separar, pelas técnicas cromatográficas adotadas, os peptídeos OcCT1f e OcCT2f, provavelmente às características semelhantes dessas moléculas. Desta forma, não foi possível avaliar a atividade antimicrobiana dos mesmos.

✓ **A escorpina-like de *O. cayaporum***

O peptídeo de massa molecular de 8315,00Da e que inibiu em 78% do crescimento de *S. aureus* a 1,8 μ M foi parcialmente descrito em Schwartz *et al.*, (2008) e é membro da família das escorpinas. No presente trabalho, um fragmento de 21 resíduos de aminoácidos e de 2473,30Da foi sequenciado por MS/MS, mostrando ser idêntico ao previamente descrito.

Em Silva *et al.*, (2009), a sequência parcial de um precursor que codifica para uma escorpina-like foi identificada e chamada de OcyC7. No entanto, as sequências obtidas por degradação de Edman (Schwartz *et al.*, 2008) e por sequenciamento *de novo* não se complementam à sequência do precursor previamente descrito. Assim é possível que existam diferentes peptídeos escorpina-like em *O. cayaporum*, como já foi demonstrado para *Opisthophthalmus carinatus*, que possui quatro peptídeos dessa família, as Opiscorpinas1-4 (Q5WR03, Q5WQZ7, Q5WQZ9, Q5WR01). A expressão dessas moléculas similares pode ocorrer por um mecanismo de co-evolução entre bactérias e toxinas, uma vez que alguns mecanismos de resistência bacteriana podem burlar até mesmo a interação de peptídeos (Peschel & Sahl, 2006).

Os estudos com as escorpinas-like mostram que essas moléculas possuem um potencial antimicrobiano interessante para o desenvolvimento de fármacos. mesmo mosquitos transgênicos que expressem a toxina e dessa forma quebrem o ciclo de vida de um protozoário (malária) (Conde *et al.*, 2000; Zhu & Tytgat, 2004; Diego-Garcia *et al.*, 2005; Uawonggul *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2007). As moléculas escorpina-like possuem uma natureza híbrida, pois possuem similaridade com toxinas bloqueadoras de canais para K⁺ e regiões similares a diferentes peptídeos antimicrobianos, as dermaseptinas e as cecropinas (Zhu & Tytgat, 2004). Moléculas híbridas aparentam vantagem funcional, e a até mesmo energética, uma vez que o indivíduo que a sintetiza obterá maiores vantagens com apenas uma molécula, que pode alcançar seu objetivo em diferentes formas de ação em apenas um composto. Essa característica pode ser bastante interessante para o desenvolvimento de novos fármacos que têm por finalidade driblar os mecanismos de resistência bacteriana, em combate a infecções.

7. Conclusões

Um novo peptídeo bloqueador de canal de K^+ , integrante da família das κ -KTxs, a família de canal para K^+ mais recentemente descrita, foi identificado e sua atividade biológica descrita. Este peptídeo de 3132,26Da foi chamado sistematicamente de κ -KTx 2.5. Possui atividade bloqueadora de canais para K^+ e possui conformação em α -hélice em água e diferentes concentrações de TFE. Assim como as toxinas com conformação $CS\alpha/\beta$, as κ -KTxs são capazes de alterar as propriedades eletrofisiológicas de canais iônicos dependentes de voltagem. Apesar de alterarem essas propriedades, é aceitável sugerir que o alvo biológico desses peptídeos ainda necessite de mais investigações. Por apresentarem similaridades quanto sua estrutura primária e secundária, assim como a baixa afinidade a canais de K^+ , essas toxinas com $CS\alpha/\alpha$ foram agrupadas em uma nova família de bloqueadores de canais de K^+ , as κ -KTxs. Apesar de possuírem conformação $CS\alpha/\alpha$, diferentemente das outras KTxs ($CS\alpha/\beta$), as κ -KTxs são capazes de reconhecer e provocar bloqueio em canais para K^+ .

Prováveis peptídeos antimicrobianos, da família dos NBDPs, de 1173,69 e 1285,74Da (OcCT2f), foram identificados. O peptídeo OcCT2f foi seqüenciado e possui identidade com os peptídeos IsCTs. Uma escorpina-*like* foi identificada e parcialmente caracterizada. Um fragmento de 2473,30Da foi seqüenciado, correspondente à porção N-terminal. O estudo de peptídeos antimicrobianos se faz necessário frente às novas teorias de co-evolução de peptídeos antimicrobiano/bactérias, a fim de melhor conhecer os mecanismos de resistência desses microrganismos e dessa forma desenhar fármacos mais eficientes. Além disso, essas moléculas podem trazer indícios sobre relações filogenéticas.

8. Perspectivas

Dentre a grande diversidade de moléculas presentes na peçonha de *O. cayaporum*, apenas uma pequena quantidade dessas moléculas foram caracterizadas, restando ainda elucidar a atividade biológica de moléculas como a OcCT2f e dos outros peptídeos OcCT1, OcCT1f, OcCT2. Destaca-se dentre os peptídeos e precursores previamente descritos (Schwartz *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), as toxinas com atividades antimicrobiana e bloqueadores de canais iônicos, sendo necessários maiores estudos sobre a Cayaporina, uma molécula de 4675Da; estudos sobre a molécula de 5090Da, eluída juntamente com a κ -KTx2.5, que é uma provável β -KTx; estudos sobre a molécula 2545Da, cujo precursor foi chamado Ocy9, que é provavelmente mais um membro das κ -KTx.

9. Referência Bibliográfica

- ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J., SCHWEDE, T. (2006) The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* **22**: 195–201.
- BARNES, R.D. (2005) *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª edição: ed. Roca. 1168 págs. 2005.
- BONTEMS, F., GILQUIN, B., ROUMESTAND, C., MENEZ, A., TOMA, F. (1992) Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry*, **31**: 7756-7764.
- CARBALLAR-LEJARAZÚ, R., RODRÍGUEZ, M.H., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.C., RAMOS-CASTAÑEDA, J., POSSANI, L. D., ZURITA-ORTEGA, M., REYNAUD-GARZA, E., HERNÁNDEZ-RIVAS, R., LOUKERISE, T., LYCETT, G. , LANZ-MENDOZA, H. (2008) Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**: 3081 – 3092.
- CHAGOT B., PIMENTEL C., DAI L., PIL J., TYTGAT J., NAKAJIMA T., CORZO G., DARBON H., FERRAT G. (2005) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Journal*, **388**:263-271.
- CONDE, R., ZAMUDIO, F.Z., RODRÍGUEZB, M.H., POSSANI L.D. (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters* **471**: 165-168.
- DAI, L., CORZO, G., NAOKI, H., ANDRIANTSIFERANA, M., NAKAJIMA, T. (2002) Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **293**: 1514-1522.
- DAI, L., YASUDA, A., NAOKI, H., CORZO, G., ANDRIANTSIFERANA, M., NAKAJIMA, T. (2001) IsCT, a Novel Cytotoxic Linear Peptide from Scorpion *Opisthacanthus*

madagascariensis. Biochemical and Biophysical Research Communications, **286**: 820-825.

DEBIN, J. A. & G. R. STRICHARTZ (1991) Chloride channel Inhibition by the venom of the scorpion *Leirus quinquestriatus*. Toxicon, **29**: 1403-1408.

DESHANE, J., GARNER, C. C., SONTHEIMER, H. (2003) Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. Journal of Biological Chemistry, **278**: 4135–4144.

DIEGO-GARCIA E., BATISTA C.V.F., GARCIA-GOMEZ B.I., LUCAS S., CANDIDO D.M., GOMEZ-LAGUNAS F., POSSANI L.D. (2005) The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. Toxicon, **45**:273-283.

DIEGO-GARCIA, E., ABDEL-MOTTALEBB, Y., SCHWARTZ, E. F., RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C., TYTGAT, J., POSSANI, L. D. (2007b) Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. Cellular and Molecular Life Sciences, **65**: 187-200.

DIEGO-GARCIA, E., SCHWARTZ, E. F., D_SUZE,G., GONZALEZ, S. A., BATISTA, C. V., GARCIA, B. I., RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C., POSSANI, L. D. (2007a) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of "orphan" components. Peptides, **28**: 31–37.

EITAN, M., FOWLER, E., HERMANN, R., DUVAL, A., PELHATE, M., ZLOTKIN, E. (1990) A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affect sodium current inactivation: purification, primary structure and mode of action. Biochemistry, **29**: 5941-5947.

FERREIRA, L.A., ALVES E.W., HENRIQUES, O.B.(1993) Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, **31**: 941–947.

FET, V. & M.E. SOLELAD. (2005). Contributions to scorpion systematics. I. On recent changes in high level taxanomy. Euscorpius, **31**: 1-13.

- FULLER, M. D., THOMPSON, C.H., ZHANG, Z. R., FREEMAN, C. S., SCHAY, E., SZAKÁCS, G., BAKOS, É., SARKADI, B., MCMASTER, B., FRENCH, R. J., POHL, J., KUBANEK, J., MCCARTY, N. A. (2007) State-dependent Inhibition of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channels by a Novel Peptide Toxin. *The journal of biological chemistry*, **282**: 37545–37555.
- GIANGASPERO A., SANDRI, L., TOSSI, A. (2001) Amphipathic α -helical antimicrobial peptides- A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *European Journal of Biochemistry*, **268**: 5589 – 5600.
- INCEOGLU, B., LANGO, J., JING, J., CHEN, L., DOYMAZ, F., PESSAH, I.N., HAMMOCK, B. D. (2003) One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *PNAS*, **100**: 922–927.
- LEBRUN, B., ROMI-LEBRUN, R., MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F., YASUDA, A., ISHIGURO, M., OYAMA, Y., PONGS, O., NAKAJIMA, T. (1997) A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage gated K^+ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochemical Journal*, **328**: 321–327.
- LEGROS, C., CEARD, B., BOUGIS, P. E., MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. (1998) Evidence for a new class of scorpion toxins active against K^+ channels. *FEBS Letters* **431**: 375–380.
- LORET, E., SAMPIERI, F., MIRANDA, F., GRANIER, C., ROCHAT, H. (1992) Scorpion toxins active on insects. *Methods in Neuroscience*, **8**: 381-395.
- LOURENÇO, W. R. (1981) Sur la distribution géographique et l'écologie de *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones, Scorpionidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **41**: 343-349.
- LOURENÇO, W.R. (2003) *Scorpions of Brazil*. Museum national d'histoire naturelle, Paris: Les éditions de l'If, Paris-França. 306 págs.

- LOURENÇO, W. R. & FÉ, N. F. (2003) description of a new species of *Opisthacanthus* Peters (scorpiones, Liochelidae) to Brazilian Amazonia. *Revista Ibérica de Aracnologia*, **8**: 81-88.
- MEKI, A.R., NASSAR, A.Y., ROCHAT, H. (1995) A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides*, **16**: 1359–1365.
- MILLER, C. (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, **1**: 4.1– 4.5
- MILLER, C., MOCZYDLOWSKI, E., LATORRE, R., PHILLIPS, M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^+ -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*, **313**: 316-318
- MOERMAN L.F.A., BOSTEELS S., NOPPE W., WILLEMS J., CLYNEN E., SCHOOFS L., THEVISSSEN K., TYTGAT J., VAN ELDERE J., VAN DER WALT J., VERDONCK F. (2002) Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry*, **269**: 4799-4810.
- MOORE, A. J., BEAZLEY, W. D., BIBBY, M.C., DEVINE, D. A. (1996) Antimicrobial activity of cecropins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **37**: 1077-1089.
- MOUHAT, S., JOUIROU, B., MOSBAH, A., DEWAARD, M., SABATIER, J.M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochemistry Journal*. **378**: 717–726.
- NIRTHANAN S., PIL J., ABDEL-MOTTALEB Y., SUGAHARA Y., GOPALAKRISHNAKONE P., JOSEPH J.S., SATO K., TYTGAT J. (2005) Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochem. Pharmacol.* **69**:669-678.
- POLIS, G. A. (1990) *The Biology of Scorpions*, ed. Polis, G. A. (Stanford Univ. Press, Stanford, CA), pp. 247–293, em Inceoglu, B., Lango, J., Jing, J., Chen, L.,

- Doymaz, F., Pessah, I.N., Hammock, B. D (2003) One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. PNAS, **100**: 922–927.
- POSSANI, L.D., MERINO, E., CORONA, M., BOLÍVAR, F., BECERRIL, B. (2000) Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochemie, **82**: 861-868.
- 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.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C, MERINO, E., BECERRIL, B., POSSANI, L. D. (2003) Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. Trends in Pharmacological Sciences, **24**: 222-227
- RODRÍGUEZ 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. & POSSANI, L. D. (2007) Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. Toxicon, **49**: 171-180.
- SCALONI, A., BOTTIGLIERI, C., FERRARA, L., CORONA, M., GURROLA, G. B., BATISTA, C., WANKE E., POSSANI, L. D. (2000) Disulfide bridges of Ergtoxin, a member of a new sub-family of peptide blockers of the ether-a-go-go-related K⁺ channel. FEBS Letters, **479** : 156-157.
- SCHWARTZ E.F., DIEGO-GARCIA E., RODRIGUEZ DE LA VEGA R.C., POSSANI L.D. (2007) Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). BMC Genomics, **8**:119-119.

- SCHWARTZ, E.F., CAMARGOS, T.S., ZAMUDIO, F.Z., SILVA, L.P., BLOCH JR, C., CAIXETA, F., SCHWARTZ, C.A., POSSANI, L.D. (2008) Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, **51**:1499-1508.
- SCHWARTZ, E.F., CAPES, E.M., DIEGO-GARCÍA, E., ZAMUDIO, F.Z., FUENTES, O., POSSANI, L.D., VALDIVIA, H.H. (2009) Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *British Journal of Pharmacology*, **157**:392-403.
- SILVA, E.C.N., CAMARGOS, T.S., MARANHÃO, A.Q., SILVA-PEREIRA, I., SILVA, L.P., POSSANI, L. D., SCHWARTZ, E.F. (2009) Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, **54**: 252-61
- SRINIVASAN K.N., SIVARAJA V., HUYS I., SASAKI T., CHENG B., KUMAR T.K.S., SATO K., TYTGAT J., YU C., SAN B.C.C., RANGANATHAN S., BOWIE H.J., KINI R.M., GOPALAKRISHNAKONE P. (2002) Kappa-hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:30040-30047.
- TORRES A.M., BANSAL P., ALEWOOD P.F., BURSILL J.A., KUCHEL P.W., VANDENBERG J.I. (2003) Solution structure of CnErg1 (Ergtoxin), a HERG specific scorpion toxin. *FEBS Letters*, **539**:138-142.
- 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.
- TYTGAT, J., GEORGE CHANDY, K., 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., ARKARAVICHIE N T., BUNYATRATCHATA W., RUANGJIRACHUPORN W., JEARRANAIPREPAME P., NAKAMURA T., MATSUDA M., KOBAYASHI M., HATTORI S., DADUANG S. (2007) Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*, **49**:19-29.
- VALDIVIA, 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.
- VERANO-BRAGA T., ROCHA-RESENDE C., SILVA D.M., IANZER D., MARTIN-EAUCCLAIRE M.F., BOUGIS P.E., DE LIMA M.E., SANTOS R.A.S., PIMENTA A.M.C.(2008) *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **371**: 515-520
- WICKENDEN, A. D.(2002) K⁺ channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*, **94**: 157-182.
- YAMAJI, N., DAI, L., SUGASE, K. , ANDRIANTSIFERANA, M, NAKAJIMA, T., IWASHITA, T. (2004). Solution structure of IsTX- A male scorpion toxin from *Opisthacanthus madagascariensis* (Ischnuridae) *European Journal of Biochemistry*, **271**: 3855–3864.
- YU, F. H. & CATTERALL, W. A. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, **4**:207.1 –6.
- ZENG, X.C., CORZO, G., HAHN, R. (2005) Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges. *IUBMB Life*, **57**:13-21.
- ZHU, S. & TYTGAT, J. (2004) The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**: 1751–1763.