



Caracterização da atividade eletrofisiológica da toxina Ts17, isolada da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, em canais de sódio dependentes de voltagem

Luis Felipe Santos Menezes

Orientadora: Prof. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília

2019

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia

Caracterização da atividade eletrofisiológica da toxina Ts17, isolada da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, em canais de sódio dependentes de voltagem.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília para aquisição do título de Mestre em Biologia Animal.

Aluno: Luis Felipe Santos Menezes
Orientadora: Prof. Dra: Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília
2019

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha família, à minha namorada, ao meu afilhado, à minha orientadora, aos meus companheiros de laboratório e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me abençoar com a realização do mestrado. Gostaria também de agradecer aos meus pais George W. Menezes e Maria D. Santos Menezes pela minha criação e educação desde criança, sempre me incentivando a querer ser alguém, me apoiando em minhas decisões e me dando tudo do melhor para que eu pudesse me dedicar às coisas de meu interesse, obrigado por serem meus exemplos como pessoa tanto no âmbito pessoal como no profissional. Tenho muito orgulho e honra de ser filho de vocês. Agradecer à minha irmã Maria Carolina Santos Menezes por me apoiar, me ajudar nas horas de dificuldade e me inspirar a ser uma pessoa melhor, você é a melhor irmã que eu poderia ter. Amo muito vocês e tenho muita gratidão por tudo que vocês fazem por mim. Tenho muita sorte em compartilhar minha vida com vocês.

Gostaria de agradecer a minha namorada Sarah Torres T. de Mello por sempre estar comigo nas horas boas e ruins, por escutar minhas preocupações, me acalmar quando necessário, me incentivar cada dia mais, ser um exemplo para mim. Obrigado por acreditar em mim e por me fazer muito feliz e realizado sempre. Obrigado por apoiar minhas decisões e me fazer acreditar nelas. Você me inspira cada dia mais e tenho muito orgulho de você. Você é o amor da minha vida. Te amo muito meu amor. Gostaria de agradecer também à sua família, em especial à sua mãe Sônia Torres, ao seu pai José Waldemar e à sua irmã Maryam Torres.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Elisabeth F. Schwartz que aceitou meu pedido de orientação sem mesmo termos trabalhado juntos antes, por acreditar em meu potencial e me dar a possibilidade de crescer profissionalmente e pessoalmente. Agradecer pelas horas de conversas sempre estimulantes e positivas e por dividir comigo suas experiências e demonstrar sua gratidão pelos meus esforços. Tenho total respeito e admiração por você, sua família e por tudo que contribuiu para o crescimento científico.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros de laboratório (NeuroPharma), local onde passei grande parte do mestrado. Pelas ajudas científicas, pelas brincadeiras, descontrações e pelos ensinamentos. Pessoas que me acolheram desde o início e que se tornaram meus amigos. Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus amigos Adolfo Carlos B. de Souza, Diogo Tibery, Beatriz E.

Sarmiento, Daniel Mata, Mariza M. Maranhão, Leandro A. Campos, Márcia R. Mortari, Francielly B. N. Francisco, Alessa Bembom, Harry Morales, Solange C. Rego, Thalita S. Camargos, Caroline B.F. Mourão, Elias Sabiá, Danilo Gustavo e Ana Carolina Orlandi que me ajudaram desde o início e que me integraram ainda mais ao grupo.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares que sempre me deram força e me mostravam que eu era uma referência para eles fazendo com que eu me motivasse ainda mais.

Gostaria de agradecer em especial aos meus primos Renato A. B de Menezes, Guilherme L. Menezes de Araújo, Lucas G. Menezes de Araújo, Clara Nolasco G. Santos, Anna Luiza V. de Menezes, Stephany Queiroga, Patrícia, Nelson, Marcos e Luana. Às minhas tias Vânia, Luciana, Quézia, Cassia, Gemimar, Ester, Sunamita e Gilceli e aos meus tios José e Silvío. E ainda mais especial à minha madrinha Sara G. Santos, ao meu padrinho Valter, aos meus avós Jorge Menezes, Messias F. dos Santos, Joana G. Barbosa e Sônia A. Menezes e ao meu afilhado Caetano.

Gostaria de agradecer em especial também, aos meus grandes amigos João Pedro C. Cunha, Babeky N'Debi dos Santos Thito, Mario P. da Silva Neto, Matheus Tavares, Nicolas B. Scarpa, Lucas A. de Araújo, Davi Assunção Rosa, André A. Nascimento, Barbara P. de Araújo e Lara R. Peçanha de Araújo, Matheus Passos, Thamara Macedo, Sarah Regina, Matheus Fernandes, Saulo Henrique, João Gabriel Corassa, Pedro Cardoso, Lucas Mattos e Marcos Dórea.

Gostaria de agradecer também às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelos recursos que me ajudaram a desenvolver minha pesquisa e em especial à CAPES pela bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

RESUMO

Peçonhas de escorpiões são misturas ricas que compreendem compostos como enzimas, proteínas e peptídeos. A família Buthidae é a mais estudada dentre as famílias de escorpião devido aos envenenamentos de importância médica e ao seu potencial biotecnológico. Dentre as espécies conhecidas, pode-se destacar o escorpião *Tityus serrulatus*. Os peptídeos destas peçonhas podem ser classificados em dois grupos, os peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBP), que podem ter ação antimicrobiana e os peptídeos com pontes dissulfeto (DBP), que se caracterizam pela ação em canais iônicos de membranas celulares como sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os peptídeos que atuam em canais de sódio são denominados NaScTxs. Canais de sódio estão distribuídos por todo o corpo e são responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação. Estruturalmente, esses canais possuem quatro domínios transmembrânicos, contendo cada um seis α -hélice (S1-S6) e duas ou três subunidades β . Existem nove isoformas de canais de sódio em mamíferos (Nav1.1 a Nav1.9), sendo que cada isoforma possui distribuição e função características. Mutações nesses canais podem acarretar em doenças conhecidas como canalopatias. A busca por compostos capazes de agir neles são importantes visando o desenvolvimento de futuros fármacos. Diversas toxinas do *Tityus serrulatus* já foram identificadas e isoladas, sendo que algumas já possuem caracterização eletrofisiológica em canais de sódio e/ou potássio. A Ts17 é um peptídeo que ainda não foi estudado, sendo conhecido apenas seu precursor. Essa toxina apresenta grande similaridade com peptídeos da classe das α -NaScTxs, indicando uma possível ação nos canais Nav afetando sua inativação rápida. Sendo assim, o objetivo do estudo é isolar e caracterizar eletrofisiologicamente (*patch-clamp*) a toxina Ts17 em canais de sódio voltagem dependentes de humanos (Nav1.1 a Nav1.7). Para purificação da toxina a partir da peçonha bruta de *T. serrulatus*, foram necessárias três etapas de fracionamento cromatográfico em coluna de fase reversa. O peptídeo Ts17 eluiu a 32% de acetronitrila na cromatografia da peçonha bruta. O sequenciamento parcial e a massa monoisotópica $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram obtidos em MALDI-TOF. Obteve-se a sequência de 43 resíduos de aminoácidos dos 64 totais e a massa monoisotópica $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 7234,4212 Da. Os testes eletrofisiológicos foram feitos a uma concentração de 100 nM para todos os subtipos (Nav1.1-Nav1.7). A Ts17 alterou a probabilidade de abertura dos canais para potenciais mais hiperpolarizados, tanto

na ativação quanto na inativação, sendo Nav1.2 a isoforma mais afetada para ativação e a isoforma Nav1.5 para inativação. Não foram observadas diferenças entre os testes com e sem pré pulso. Em relação a recuperação da inativação lenta dos canais, a maior alteração na variação do tau foi do subtipo Nav1.5, por fim, não foram observadas alterações na inativação rápida dos canais, prolongando-os. Dito isso, apesar de ter alta porcentagem de identidade com α -NaScTxS, a toxina possui características eletrofisiológicas de β -NaScTxS, pois altera o *shift* de voltagem dos subtipos de canais de sódio, além de reduzir a amplitude de corrente, podendo essa atividade oposta ao esperado ser devido à similaridade tridimensional de α e β -NaScTxS e orientação de ligação similares.

Palavras chaves: Escorpião, *Tityus serrulatus*, toxinas de escorpião, canais de sódio voltagem dependentes e *Patch clamp*.

ABSTRACT

Scorpion venoms are rich mixtures that comprise compounds as enzymes, proteins and peptides. The Buthidae family is the most studied of the scorpion families due to the poisonings and their biotechnological potential. Among the known species, we can highlight the scorpion *Tityus serrulatus*. The peptides of these venoms can be classified into two groups, no disulfide bridges peptide (NDBP) with antimicrobial action and disulfide bridges peptide (DBP) that are characterized by the action on ion channels of cellular membranes like Na⁺ and K⁺. Peptides that act on sodium channels are called NaScTxS. Sodium channels are distributed throughout the body and are responsible for the initiation and propagation of the action potential. Structurally, these channels have four transmembrane domains each containing six α -helices (S1-S6) and two or three β -subunits. There are nine isoforms of sodium channels in mammals (Nav1.1 to Nav1.9), each isoform with characteristic distribution and function. Mutations in these channels can lead to diseases known as channelopathies. The search for compounds capable of acting on them is important for the development of future drugs. Several toxins of *Tityus serrulatus* have already been identified and isolated, some with electrophysiological characterization in sodium and / or potassium channels. Ts17 is a peptide without studies about your function, only its precursor being known. This toxin presents great similarity with peptides of the class of α -NaScTxS, indicating a possible action in the Nav channels affecting its rapid inactivation. The aim of the study is to isolate and characterize electrophysiologically (*Patch-clamp*) the Ts17 toxin in human-dependent voltage sodium channels (Nav1.1 to Nav1.7). The purification of the toxin from the crude venom of *T. serrulatus* occurred in three steps of reverse phase chromatographic fractionation, Ts17 eluted at 32% acetonitrile on crude venom chromatography. Partial sequencing and monoisotopic mass [M + H]⁺ were obtained in MALDI-TOF. The results showed 43 amino acid residues of 64 and the monoisotopic mass [M + H]⁺ of 7234.4212 Da. Electrophysiological tests were done at a concentration of 100 nM. The toxin altered the open probability of channels in activation and inactivation states, with Nav1.2 being the most affected isoform for activation and the Nav1.5 isoform for inactivation. No differences were observed between prepulse and non-prepulse tests. To the recovery (slow inactivation), the major tau variance was of the Nav1.5 subtype. Finally, no change in the rapid inactivation was evaluated. the toxin has high percentage of identity

with α -NaScTxS, but functionally the toxin has characteristics of β -NaScTxS, because change the open probability of sodium channels, besides to reduce current amplitude. This opposite to expected activity can be by three-dimensional similarity between alfa and beta toxins and similar binding orientation of both.

Key Word: Scorpion, *Tityus serrulatus*, Scorpion toxins, Voltage-gate sodium channels and *Patch clamp*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Tityus serrulatus</i> . Foto por Menezes L.F.S.....	21
Figura 2. Estrutura aberta do canal de sódio voltagem dependentes. A subunidade alfa composta pelos seus domínios ilustrados cada um de uma cor, além de seus respectivos segmentos transmembrânicos. Domínio I (marrom); domínio II (rosa); domínio III (cinza); domínio IV (roxo), subunidade beta em amarelo e o sitio de inativação rápida (losango azul).....	25
Figura 3. Sequência provável de aminoácidos da toxina Ts17. Peptídeo sinal destacado em cinza e peptídeo maduro em negrito com destaque em azul para os três últimos aminoácidos GKK	28
Figura 4. Fluxograma metodológico	31
Figura 5. Protocolo de estimulação de voltagem sem (A) e com (B) pré pulso.	37
Figura 6. Protocolo de avaliação da recuperação da inativação lenta.....	37
Figura 7. Perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> por CLAE em fase reversa com destaque para o intervalo de interesse. A fração em destaque (seta) tem o tempo de retenção e porcentagem de ACN de 32 minutos e 32% respectivamente. Fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de absorção de 216nm.....	39
Figura 8. Perfil cromatográfico da cromatografia, usando o segundo método cromatográfico, da fração selecionada na cromatografia da peçonha bruta do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> . A fração em destaque (seta) tem o tempo de retenção e porcentagem de ACN de 26 minutos e 26% respectivamente. Fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de absorção de 216nm.	40
Figura 9. Perfil cromatográfico, usando o terceiro método cromatográfico, da fração selecionada na re-cromatografia da peçonha do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> . A fração em destaque (seta) tem o tempo de retenção e porcentagem de ACN de 49 minutos e 23% respectivamente. Fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de absorção de 216nm.	41
Figura 10. Espectro de massa média do íon molecular da amostra purificada. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA).....	42
Figura 11. Sequenciamento parcial do peptídeo Ts17. Sequenciamento por ISD (Ion Source Decay), utilizando a matriz de DAN. Linha de cima (*) na direção C-terminal para a N-terminal e linha de baixo (**) na direção N-terminal para o C-terminal.....	43
Figura 12. Alinhamento entre a sequência da Ts17 (primeira linha) e a sequência parcial obtida por ISD (segunda linha).	43
Figura 13. Espectro da massa molecular monoisotópica do íon molecular $[M+2H]^+$ do peptídeo Ts17 purificado. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA).....	44
Figura 14. Espectro da massa molecular monoisotópica do íon molecular $[M+6H]^+$ do peptídeo Ts17 purificado. Diluição da amostra feita em solução de ácido fórmico 0,1% em água Milli-Q.	45
Figura 15. Sequência de aminoácidos do peptídeo Ts17 sem os três últimos aminoácidos (GKK).	45
Figura 16. Alinhamento de toxinas similares a Ts17.	46
Figura 17. Gráfico de corrente (I)/voltagem (V) com pré pulso de todos os subtipos testados. Média das células com a corrente normalizada de cada subtipo. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).	48

Figura 18. Gráfico de corrente (I)/voltagem (V) sem pré pulso de todos os subtipos testados. Média das células com a corrente normalizada de cada subtipo. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).	49
Figura 19. Traços brutos da corrente de sódio com pré pulso. Cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).	50
Figura 20. Traços brutos da corrente de sódio sem pré pulso. Cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).	51
Figura 21. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de ativação (com pré pulso) dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).	53
Figura 22. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de ativação (sem pré pulso) dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construído a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).	55
Figura 23. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de inativação dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construído a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).	57
Figura 24. Gráficos da recuperação da inativação lenta dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construído a partir da função de ExpDec1. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).	60
Figura 25. Alinhamento entre a Ts17 e duas das mais potentes alfa toxinas. O primeiro destaque (retângulo sem preenchimento de borda preta) indicam os domínios NC, core e linker, e seus respectivos resíduos de aminoácidos, o segundo destaque indica a região do C-terminal e seus respectivos resíduos de aminoácidos. Os números acima indicam a posição dos resíduos de aminoácidos. Quantidade de resíduos de aminoácidos (Aa) e porcentagem de identidade (%Id).....	62
Figura 26. Alinhamento da Ts17 com betas toxinas, analisando as regiões farmacofórica e resíduos aromáticos. O primeiro destaque (retângulo sem preenchimento de borda preta) indica a região farmacofórica e seus respectivos resíduos de aminoácidos, o segundo destaque indica a região dos resíduos aromáticos e seus respectivos resíduos de aminoácidos. Os números acima indicam a posição dos resíduos de aminoácidos. Quantidade de resíduos de aminoácidos (Aa) e porcentagem de identidade (%Id).	63
Figura 27. Representação da estrutura terciária de duas NaScTxs. Toxina AahII (α -NaScTxs) isolada do escorpião <i>Androctonus australis</i> e a Ts1 (β -NaScTxs) isolada do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> . UniProtKB - P01484 e UniProtKB - P15226, respectivamente. PDB: 1PTX (AahII) e 1B7D (Ts1).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fração não inibida da corrente (I_{Na}) com pré pulso. Média das células de cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula e seu respectivo erro padrão.....	47
Tabela 2. Fração não inibida da corrente (I_{Na}) sem pré pulso. Média das células de cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula e seu respectivo erro padrão.....	47
Tabela 3. $V_{1/2}$ da fase de ativação dos canais de sódio voltagem dependentes com pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)	52
Tabela 4. $V_{1/2}$ da fase de ativação dos canais de sódio voltagem dependentes sem pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)	54
Tabela 5. $V_{1/2}$ da fase de inativação dos canais de sódio voltagem dependentes e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)	56
Tabela 6. Sensibilidade à voltagem dos subtipos testados ou inclinação da reta (k) na ativação com pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*).....	58
Tabela 7. Sensibilidade à voltagem dos subtipos testados ou inclinação da reta (k) na ativação sem pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*).....	58
Tabela 8. Sensibilidade à voltagem dos subtipos testados ou inclinação da reta (k) na inativação e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*).....	58
Tabela 9. Valores de tau da inativação lenta dos subtipos de Nav testados e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Neurotoxinas descritas do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> e os respectivos alvos moleculares dessas toxinas avaliadas em eletrofisiologia em canais iônicos..	23
Quadro 2. Método cromatográfico peçonha bruta	32
Quadro 3. Método cromatográfico recromatografia	33
Quadro 4. Método cromatográfico rerecromatografia.....	33
Quadro 5. Componentes da solução de banho extracelular.....	35
Quadro 6. Componentes da solução da pipeta intracelular.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: Acetonitrila

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

DAN: 1,5diaminonaftaleno

DBP: *Disulfide-bridged peptides*

DmNav: *Drosophila melanogaster* sodium channel

HCCA: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico

HEK: *Human Embryonic Kidney*

HPLC: High performance liquid chromatography

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ISD: *Ion Source Decay*

Kv: Canais de potássio voltagem dependente

NaScTx: Toxina escorpiônica de canais de sódio voltagem dependentes

Nav: Canais de sódio voltagem dependente

NDBP: *Non-disulfide-bridged peptides*

SNC: Sistema nervoso central

Tb: *Tityus bahiensis*

TFA: Ácido Trifluoroacético

To: *Tityus obscurus*

TOF: *Time of flight*

Tpa: *Tityus pachyurus*

Ts: *Tityus serrulatus*

Tst: *Tityus stigmurus*

Tx: Toxina

VNa: Potencial de reversão de sódio

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A: Alanina

C: Cisteína

D: Aspartato ou ácido aspártico

E: Glutamato ou ácido glutâmico

F: Fenilalanina

G: Glicina

H: Histidina

I: Isoleucina

K: Lisina

L: Leucina

M: Metionina

N: Asparagina

P: Prolina

Q: Glutamina

R: Arginina

S: Serina

T: Treonina

V: Valina

W: Triptofano

Y: Tirosina

Sumário

I. INTRODUÇÃO.....	19
1. Escorpião	19
2. Escorpiões no Brasil.....	19
3. <i>Tityus serrulatus</i>	20
3.1) Estrutura corporal	20
3.2) Envenenamento.....	21
3.3) Tratamento	21
4. Toxinas de escorpião	22
5. Canais iônicos	23
5.1) Canais de sódio voltagem dependentes.....	24
5.2) Cinética dos canais de sódio	25
5.3) Subtipos de canais de sódio.....	26
6. Doenças relacionadas aos canais de sódio	26
7. Toxinas escorpiônicas com atividade em canais de sódio	27
8. Peptídeo Ts17	28
9. <i>Patch-clamp</i>	28
II. JUSTIFICATIVA.....	29
III. OBJETIVO.....	30
1. Objetivo geral	30
2. Objetivos específicos.....	30
IV. Material e Métodos	31
1. Coleta dos escorpiões	31
2. Extração e quantificação da peçonha bruta	31
3. Soluções para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	32
4. Purificação do peptídeo	32
5. Busca por similaridade	34
6. <i>Patch-clamp</i>	35
6.1) Cultura de células.....	35
6.2) Soluções para registro fisiológico	35
6.3) Ensaios eletrofisiológicos	36
V. Resultados.....	39
1. Purificação da toxina Ts17 da peçonha do <i>Tityus serrulatus</i>	39
1.2. Alinhamento da Ts17 com toxinas com alta porcentagem de identidade	46

2. Caracterização eletrofisiológica da toxina Ts17 em canais de sódio voltagem dependentes de humanos.....	46
2.1. Fração não inibida da corrente (F_u) e I/V	46
2.2. Avaliação da probabilidade de abertura ou <i>Shift</i> de voltagem	51
2.3. Recuperação da inativação lenta.....	59
2.4. Inativação rápida.....	60
VI. Discussão	61
VII. Conclusão	65
VIII. Perspectivas	66
IX. Referências	66

I. INTRODUÇÃO

1. Escorpião

Atualmente cerca de 2000 espécies de escorpião já foram descobertas (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016; PUCCA et al., 2015a), entretanto, nem todas são consideradas perigosas para os seres humanos, reduzindo esse número para menos de 50 espécies com importância médica (LOURENÇO, 2015). Os escorpiões estão compreendidos no reino animalia, filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones, sendo eles um dos animais mais antigos de sua classe (aranhas, ácaros, opiliões e etc) encontrados na natureza (CAO et al., 2014). Estudos demonstram que os escorpiões existem há cerca de 400 milhões de anos, apresentando habitat bastante variado, como por exemplo savanas, florestas tropicais, cavernas e ambientes urbanos (BRAZIL et al., 2010; CRUZ et al., 1995; MARCUSSI et al., 2011; SOARES; SCHETINI DE AZEVEDO; DE MARIA, 2002). Seu hábito, normalmente, é noturno e discreto, permanecendo embaixo de entulhos, tijolos e galhos de árvore (CRUZ et al., 1995; MARCUSSI et al., 2011; SILVA et al., 2005). Estruturalmente, o corpo do escorpião é dividido em 2 partes, o prossoma e o opistossoma. O prossoma constitui a cabeça e o tórax do escorpião e o opistossoma, dividido também em mesossoma e metassoma, o abdômen, o telson contendo a glândula de peçonha e a agulha inoculadora (MARCUSI et al., 2011; SILVA et al., 2005). Devido ao aparato inoculador, os escorpiões, vespas, serpentes e aranhas possuem peçonha, já os sapos e algumas aves possuem veneno, pois não apresentam esse aparato, sendo necessário o contato com a mucosa do ser vivo para ação das toxinas (HADDAD JUNIOR et al., 2015). Devido ao vasto território e à variedade de ambientes, o Brasil é um dos principais países com grande diversidade de escorpiões, principalmente a região norte e nordeste. Dentre as famílias encontradas temos Chactidae, Bothriuridae, Liochelidae e Buthidae (BRAZIL; PORTO, 2010).

2. Escorpiões no Brasil

No Brasil existem 4 famílias de escorpiões. A família Chactidae está distribuída na região Nordeste, Centro-Oeste e principalmente na região Norte, possuindo espécies como *Brotheas jourdani*, *Chactopsis burhnheimi* e *Teuthraustes amazonicus*. A família Bothriuridae, distribuída pelo Brasil inteiro, possui espécies como *Brazilobothriurus*

pantanalensis e *Thestylus signatus*. A família Liochelidae, localizada apenas na região Norte com duas espécies, *Opisthacanthus borboremai* e *Opisthacanthus cayaporum* (BORTOLUZZI; QUEROL; QUEROL, 2007; BRAZIL; PORTO, 2010). Já família Buthidae, a de maior relevância, compreende a grande maioria das espécies com potencial letal para o ser humano (HMED; SERRIA; MOUNIR, 2013), entre elas, *Tityus serrulatus*, *Tityus obscurus*, *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis*, entre outras são consideradas importantes para estudos tanto biotecnológicos, pelo potencial farmacológico, quanto pelos envenenamentos causados por sua peçonha (BATISTA et al., 2007; DIEGO-GARCÍA et al., 2005; PUCCA et al., 2012).

3. *Tityus serrulatus*

3.1) Estrutura corporal

O escorpião *Tityus serrulatus* apresenta tronco escuro, porém, partes do seu corpo como cauda, pedipalpos e patas são amareladas, originando seu nome popular de escorpião amarelo, além de serrilhas no dorso da cauda, dando origem ao nome *serrulatus* (**Figura 1**) (LOURENÇO, 2015; MARCUSSI et al., 2011; PUCCA et al., 2015a). Possui reprodução por partenogênese (LOURENÇO; CLOUDSLEY-THOMPSON, 1999) e seu tamanho, em média, varia de 5 a 7 centímetros, com distribuição geográfica no Distrito Federal e entre os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, entre outros (LOURENÇO, 2015; SOARES; SCHETINI DE AZEVEDO; DE MARIA, 2002). Essa espécie é considerada a mais perigosa da América do Sul, tendo vários casos de envenenamentos principalmente no estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2013; SOARES; SCHETINI DE AZEVEDO; DE MARIA, 2002).



Figura 1. *Tityus serrulatus*. Foto por Menezes L.F.S

3.2) Envenenamento

Com o crescimento urbano e a entrada do ser humano no habitat natural dos escorpiões, ataques desses animais se tornaram mais frequentes com o passar dos anos, sendo o *Tityus serrulatus* um dos maiores responsáveis pelos acidentes considerados graves no Brasil (BUCARETCHI et al., 1995; FIALHO et al., 2011; KOTVISKI; BARBOLA, 2013). Apesar dessa espécie ser considerada a mais perigosa da América do Sul (CRUTTENDEN et al., 2008; PUCCA et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2004), os sintomas, no geral, causados pelo ataque são de efeitos leve e moderados como dores, vômitos, sudorese, hipertensão, entre outros. Sintomas mais graves como falha cardíaca, edema pulmonar, convulsão, coma e morte são menos frequentes, porém podem ocorrer, sendo crianças, idosos ou pessoas com problemas cardíacos mais propensos a esses efeitos (BENVENUTI; DOUETTS; CARDOSO, 2002; BUCARETCHI et al., 1995; DE AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; LIRA-DA-SILVA; AMORIM; BRAZIL, 2000; SILVA et al., 2015; TORRES et al., 2002).

3.3) Tratamento

Normalmente, não é necessário tratamento com medicamentos antiveneno, e sim, monitoramento da saúde do paciente por 4 a 6 horas e administração de anestésicos para aliviar a dor, reidratação em caso de vômitos, entre outros. Já em pacientes com efeitos moderados e graves, o monitoramento deve ser de pelo menos 24 horas e com probabilidade de administração do antiveneno (2 ou 3 ampolas para os estados moderados e 4 a 6 ampolas para os estados graves) visando a melhor manutenção e o suporte para os órgãos vitais do paciente (COLOGNA et al., 2009;

DE AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994; MARCUSSI et al., 2011; TORRES et al., 2002).

4. Toxinas de escorpião

A composição da peçonha de escorpião é bastante rica e diversificada, tendo como componentes, por exemplo, aminas bioativas, muco, lipídeos, enzimas, proteinases, hipotensinas, proteínas e peptídeos (BATISTA et al., 2004; POSSANI et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2007). Os peptídeos provenientes de peçonhas podem ser classificados em dois grupos: os peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBPs), que podem ter atividade antimicrobiana, imunomoduladora ou hipotensora (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; ZENG; CORZO; HAHIN, 2005); e os peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs) que atuam em canais iônicos de membranas celulares, como os canais permeáveis a Na⁺ e K⁺ (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; RATES et al., 2008). Geralmente, as toxinas consideradas de cadeia longa, com cerca de 60 a 70 aminoácidos, dos quais 8 cisteínas formando 4 pontes dissulfeto, atuam nos canais de sódio voltagem dependentes (Nav) (VASCONCELOS et al., 2005). Já as toxinas consideradas de cadeia curta, com cerca de 23 a 42 aminoácidos, 6 cisteínas formando 3 pontes dissulfeto, atuam em canais de potássio voltagem dependentes (Kv) (BATISTA et al., 2002). As que atuam em Nav são também denominados por NaScTxS (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005).

Devido à sua importância médica, estudos relacionados à peçonha do *Tityus serrulatus* vem crescendo, encontrando-se em sua peçonha vários componentes neurotóxicos (PUCCA et al., 2016). Diversas toxinas já estão descritas na literatura e algumas com estudos eletrofisiológicos (**Quadro 1**) (ARANTES et al., 1994; BORDON; COLOGNA; ARANTES, 2014; BORGES et al., 2004) como a Ts1 (CONCEIÇÃO et al., 2005) e Ts6 (ZOCCAL et al., 2013), com ações em canais de sódio e potássio, respectivamente. As nomenclaturas das toxinas desse escorpião ainda geram confusões devido à variedade de possibilidades de nomes para uma mesmo componente (COLOGNA et al., 2009; PIMENTA et al., 2001). O presente estudo baseia-se na nomenclatura feita pelo grupo do professor doutor Possani, utilizando-se as iniciais do nome da espécie *Tityus serrulatus* (Ts) (BECERRIL et al., 1996; COLOGNA et al., 2009).

Quadro 1. Neurotoxinas descritas do escorpião *Tityus serrulatus* e os respectivos alvos moleculares dessas toxinas avaliadas em eletrofisiologia em canais iônicos.

Toxinas	Massa molecular	Alvo(s) moleculares	Referências
Ts1	6879 Da	DmNav1/Nav1.2/Nav1.3/Nav1.4/Nav1.5/Nav1.6	(PEIGNEUR et al., 2015) (COELHO et al., 2014)
Ts2	6998 Da	Na 1.2/ 1.3/1.5/1.6/1.7	(COLOGNA et al., 2012)
Ts3	7227 Da	--	(ALVARENGA et al., 2012)
Ts4	6704 Da	Nav1.6	(PUCCA et al., 2015b)
Ts5	7187 Da	Nav1.2/1.3/1.4/1.5/1.6/1.7 e DmNav1	(PUCCA et al., 2015c)
Ts6	4514 Da	Kv1.2/Kv1.3 e Shaker	(CERNI et al., 2014) (PUCCA et al., 2014)
Ts7	3939 Da	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6 e Shaker	(CERNI et al., 2014)
Ts8	6712 Da	Kv4.2	(PUCCA et al., 2016)
Ts9	3776 Da	Kv11.1/KCa2.2/KCa2.3	(SHAKKOTTAI et al., 2001) (ABDEL-MOTTALEB et al., 2008)
Ts10	1603 Da	--	(FERREIRA et al., 1993)
Ts11	2936 Da	Kv1.2, Kv1.3, Kv4.2, Kv10.1, hERG e Shaker IR	(CREMONEZ et al., 2016)
Ts12	2991 Da	Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, hERG e Shaker IR	(CREMONEZ et al., 2016)
Ts13	3017 Da	--	(CREMONEZ et al., 2016)
Ts14	2723 Da/2724 Da/2652 Da/2653 Da	--	(ALVARENGA et al., 2012)
Ts15	3956 Da	Kv1.2/Kv1.3/Kv1.6/Shaker IR	(COLOGNA et al., 2011)
Ts16	3300 Da	--	(ALVARENGA et al., 2012)
Ts17	7547 Da	--	(ALVARENGA et al., 2012)
Ts18	5971 Da	--	(ALVARENGA et al., 2012)
Ts19	7354 Da/6575 Da/5519 Da	Kv1.2	(ALVARENGA et al., 2012) (CERNI et al., 2016) (PUCCA et al., 2016) (LIMA et al., 2015)
Ts20	1231 Da	--	--

5. Canais iônicos

Canais iônicos são macromoléculas capazes de formar poros em membranas celulares, tem como principal função a excitabilidade de membranas de células excitáveis, como neurônios (JENTSCH; HÜBNER; FUHRMANN, 2004). Existem diversos tipos de canais com características variáveis de estrutura, modo de ativação e sensibilidade a agentes internos e externos, sendo sua seletividade, iônica ou não, o primeiro critério para sua classificação (BEZANILLA, 2008). Dentre os principais canais existentes, destacam-se os canais de potássio, canais de cálcio, canais de sódio e canais de cloreto (HÜBNER; JENTSCH, 2002).

5.1) Canais de sódio voltagem dependentes

Distribuídos por todo o corpo, os canais de sódio podem ser encontrados em neurônios, músculos, miócitos, entre outras células excitáveis (NAMADURAI et al., 2015). Esses canais são responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação, além de interferir nos potenciais graduados (BOSMANS, 2005; CATTERALL, 2000). Ademais, são proteínas que formam poros na membrana das células excitáveis com seletividade para Na^+ , conseqüentemente gerando um influxo de íon sódio para dentro da célula (BOSMANS; TYTGAT, 2007; CAMPOS et al., 2008). Estruturalmente, os Navs são compostos por dois tipos de subunidades, α e β (CESTÉLE et al., 1998; NAMADURAI et al., 2014). A subunidade α possui 260 kDa, sendo ela dividida em 4 domínios homólogos transmembrânicos (CATTERALL et al., 2007; NAMADURAI et al., 2015). Cada um desses domínios possui seis α -hélices, denominadas de S1 a S6 (CAMPOS; CORONAS; BEIRÃO, 2004; TSAI et al., 2013; ZHANG et al., 2012). As subunidades β , geralmente uma ou duas, estão associadas a essas α -hélices e possuem de 33 a 36 kDa (CLARE et al., 2000) (**Figura 2**). O segmento S4 apresenta de quatro a oito resíduos de aminoácidos de carga positiva intercalados (arginina e lisina) distanciados por três diferentes resíduos de aminoácidos, formando os sensores de voltagem fazendo com que alterações no potencial de membrana provoque a movimentação de S4 e conseqüentemente resultando na abertura do canal (BAGAL et al., 2015; CATTERALL, 2010; PAYANDEH et al., 2012). Além disso, o movimento do S4 do domínio IV resulta na inativação rápida dos canais de sódio voltagem dependentes (BOSMANS; MARTIN-EAUCCLAIRE; SWARTZ, 2008). Como são canais para sódio, existe um poro iônico seletivo para íon Na^+ formado pelos segmentos S5 e S6 de cada domínio. Essa seletividade é alta e importante para fisiologia humana, porém outros íons também podem ser conduzidos, como o lítio (CATTERALL, 2012; LENAËUS et al., 2017).

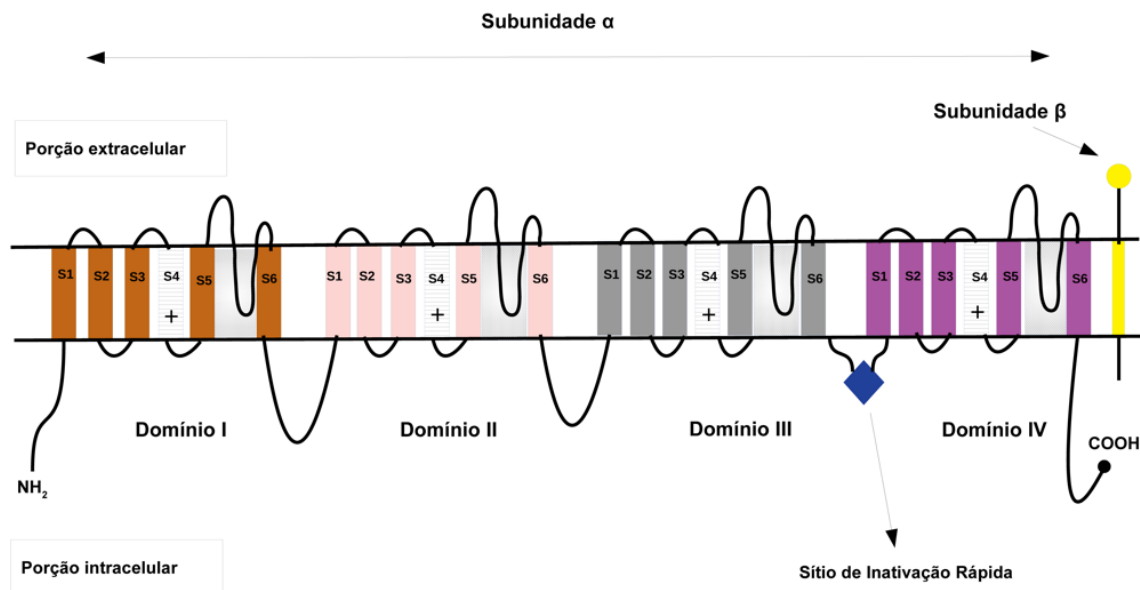


Figura 2. Estrutura aberta do canal de sódio voltagem dependentes. A subunidade alfa composta pelos seus domínios ilustrados cada um de uma cor, além de seus respectivos segmentos transmembrânicos. Domínio I (marrom); domínio II (rosa); domínio III (cinza); domínio IV (roxo), subunidade beta em amarelo e o sítio de inativação rápida (losango azul).

5.2) Cinética dos canais de sódio

A cinética dos canais de sódio interfere diretamente em sua funcionalidade. Existem três principais estados: o fechado, o aberto e o inativado. O estado fechado é encontrado quando a membrana das células excitáveis está em repouso, conseqüentemente, os Nav_s estão fechados e bloqueando a passagem do íon Na^+ . Nesse estado, os quatro segmentos S4, um de cada domínio, estão voltados para a porção intracelular do canal. Já o estado aberto ocorre após a despolarização, fazendo com que ocorra condução do íon Na^+ para o interior da membrana celular e a propagação do potencial de ação nas células. Nesse estado, os segmentos S4 dos domínios I, II e III estão voltados para porção extracelular e o segmento S4 do domínio IV, por ser mais lento, ainda não está completamente voltado para cima. O terceiro estado, chamado inativado, ocorre quando o segmento S4 do domínio IV também está voltado completamente para cima (porção extracelular) fazendo com que a alça intracelular que liga os domínios III e IV obstrua a passagem do íon Na^+ (Portão de inativação) ocorrendo assim, a inativação conhecida como inativação rápida dos canais de sódio. No terceiro estado, a condução de íon Na^+ é bloqueada e os canais

entram em processo de recuperação da inativação que é a volta do estado inativo para o estado fechado (AHERN et al., 2016; FERNANDES; BLEICHER; BEIRÃO, 2018). Os canais não ficam no estado aberto todos ao mesmo tempo, conseqüentemente, na despolarização pode-se encontrar canais abertos e canais ainda fechados. Devido a esse fenômeno podemos calcular um parâmetro conhecido como V_{half} , voltagem onde encontramos metade dos canais abertos e metade dos canais fechados em um determinado tempo (GOLDSCHEN-OHM et al., 2013).

5.3) Subtipos de canais de sódio

Existem 9 diferentes subunidades alfa para canais de sódio voltagem dependentes de mamíferos descritos na literatura, conseqüentemente 9 isoformas de Navs conhecidas, Nav1.1 a Nav1.9. As isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.6 são expressas em maior abundância no sistema nervoso central (SNC), os subtipos Nav1.4 e Nav1.5 nos músculos esquelético e cardíaco, respectivamente (BILLEN; BOSMANS; TYTGAT, 2008; GOLDIN, 2002; GOLDIN et al., 2000). O subtipo Nav 1.7 é encontrado em neurônios dos gânglios da raiz dorsal da medula envolvidos em várias modalidades sensoriais e em células neuroendócrinas (ESTACION et al., 2008). Já Nav1.8 e Nav1.9 estão presentes tanto em gânglios da raiz dorsal como em terminações nervosas, relacionados à nocicepção (BILLEN; BOSMANS; TYTGAT, 2008; FANG et al., 2002; SHIELDS et al., 2012; YU; CATTERALL, 2003).

6. Doenças relacionadas aos canais de sódio

Como já mencionado, canais de sódio voltagem dependentes estão distribuídos por todo o corpo desempenhando papéis importantes na fisiologia humana. Sendo assim, mutações na estrutura e/ou função desses canais podem acarretar em doenças, as canalopatias. Por exemplo, diversos tipos de epilepsia relacionadas a mutações nos genes SCN1A, SCN2A e SCN3A, as quais geram disfunções nos canais Nav1.1, Nav1.2 e Nav1.3, respectivamente (EIJKELKAMP et al., 2012). Mutações no gene SCN4A podem gerar disfunções em canais Nav1.4, acarretando em doenças como paralisia periódica hipercalcêmica, conhecida por sintomas de fraqueza nos membros (SOKOLOV; SCHEUER; CATTERALL, 2007). A síndrome do QT longo, caracterizada por mutações dos canais Nav1.5 (gene SCN5A), gera um retardo na repolarização do ventrículo (TFELT-HANSEN et al., 2010). Mutações no gene SCN8A acarretam na perda de função dos canais Nav1.6, gerando ataxia cerebral e retardo mental (ENGLAND; DE GROOT, 2009), e mutações nos canais

Nav1.7 (SCN9A), Nav1.8 (SCN10A) e Nav1.9 (SCN11A) podem acarretar em doenças relacionadas a dor (EIJKELKAMP et al., 2012; ENGLAND; DE GROOT, 2009; YUAN et al., 2011). Artigos como de Habbout et al. (2015), relacionaram a doença paralisia periódica, ocasionada pela mutação do resíduo R1454W, com estudos eletrofisiológicos. Os resultados demonstraram alterações na cinética do canal Nav1.4, fazendo com que o canal tenha uma probabilidade de abertura na inativação voltada para potenciais mais hiperpolarizados, inativação lenta e inativação rápida retardadas (HABBOUT et al., 2015).

7. Toxinas escorpiônicas com atividade em canais de sódio

Existem duas famílias de toxinas de escorpião que afetam os canais de sódio voltagem dependentes, as α -toxinas (α -NaScTxS) e as β -toxinas (β -NaScTxS) (CATTERALL et al., 2007; MARTIN-EAUCLAIRE et al., 1994; POSSANI et al., 1999). As α -NaScTxS estão relacionadas ao prolongamento do potencial de ação de células excitáveis inibindo a inativação rápidas dos canais (CAMARGOS et al., 2015; CESTÈLE; CATTERALL, 2000), atuam no sitio 3, *loop* S3-S4, do domínio IV dos Navs (CAMPOS; CORONAS; BEIRÃO, 2004). Existem 3 grupos dentro dessa família, as α -NaScTxS clássicas, anti-inseto e *like*, dependendo de sua característica farmacológica. As α -clássicas afetam os canais de sódio voltagem dependentes de células de mamífero e possuem pouca ou nenhuma ação em células de inseto, as α -anti-insetos atuam de forma oposta, tendo maior ação de células de inseto e menor ação em células de mamífero, já as α -*like* possuem ação tanto em células de mamíferos quanto em células de inseto (GUERRERO-VARGAS et al., 2012; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005). As β -toxinas estão relacionadas a alteração na ativação voltagem dependente, levando a ativação dos canais para potenciais mais hiperpolarizados e reduzindo a amplitude de corrente, atuando no sítio 4 do domínio II (CAMPOS et al., 2007; GONÇALVES et al., 2003). Essa família também possui uma classificação interna, sendo dividida em β -NaScTxS anti-mamífero, depressoras anti-insetos, excitatórias anti-insetos e *like*. As β -anti-mamífero possuem ação em células de mamífero, as β -depressoras e excitatório anti-inseto atuam em células de inseto e as β -*like* atuam tanto em células de mamíferos quanto em células de inseto (BOSMANS; MARTIN-EAUCLAIRE; TYTGAT, 2007; GORDON et al., 2003; GUERRERO-VARGAS et al., 2012; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005).

conhecidas são *cell-attached* (aderida a célula), *inside-out* (lado interno para fora), *perforated patch* (*Patch* perfurado), *outside-out* (lado externo para fora) e *whole-cell* (célula inteira) (CAHALAN; NEHER, 1992).

II. JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores demonstram que peçonhas e venenos de animais como escorpião, serpentes, vespas, sapos, aranhas, entre outros, são importantes objetos de estudo na busca de componentes com potenciais biotecnológicos como por exemplo os peptídeos.

Estudos como Housley et al., 2016 demonstraram o potencial farmacológico de diversas toxinas de escorpiões em canais iônicos, com ação por exemplo nos canais de sódio e potássio (HOUSLEY et al., 2016). Chen et al., 2012 descreveram um peptídeo com potencial antiviral (CHEN et al., 2012). Além de pesquisas com peptídeos de outros animais, como estudos com veneno de anfíbios na busca de peptídeos antimicrobianos (RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, 2009).

A Ts17 não possui estudos na literatura, tanto em relação a sua caracterização estrutural quanto sua caracterização funcional, sendo assim, uma toxina com diversas características a serem pesquisadas. Pelo alinhamento com peptídeos de outras espécies de escorpiões, infere-se que o peptídeo Ts17 atuará em canais iônicos de membranas de células excitáveis, mais precisamente em Navs, sendo esse um estudo com o objetivo de caracterizar a toxina eletrofisiologicamente nos subtipos Nav1.1 a 1.7.

Diversos fármacos foram desenvolvidos tendo como referência compostos provenientes da natureza, usando como referência sua forma, composição química, ação, entre outros. Por exemplo, os fármacos Captopril usado para tratar hipertensão arterial e o Ziconotide usado como analgésico, foram obtidos a partir da peçonha da *Bothrops jararaca* (SCIANI; PIMENTA, 2017) e do *Conus magus* (MCGIVERN, 2007), respectivamente.

Pesquisas como essa poderão ser usadas para estudos de canais iônicos, além de auxiliar e beneficiar a área industrial, tendo em vista que o potencial neurofarmacológico da toxina pode subsidiar projetos visando a busca de fármacos contra doenças neurológicas no futuro, por exemplo.

III. OBJETIVO

1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar a atividade da toxina Ts17 da peçonha do *Tityus serrulatus* em canais Nav1.1 a Nav1.7 por ensaios eletrofisiológicos (*Patch-clamp*).

2. Objetivos específicos

- Isolar e purificar o peptídeo Ts17 da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Identificar a massa monoisotópica experimental do peptídeo Ts17 isolado da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF.
- Confirmar a sequência da toxina Ts17 por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF.
- Caracterizar eletrofisiologicamente o peptídeo Ts17 em canais de sódio voltagem dependentes, utilizando a técnica de *Patch-clamp* no modo *Whole-cell*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

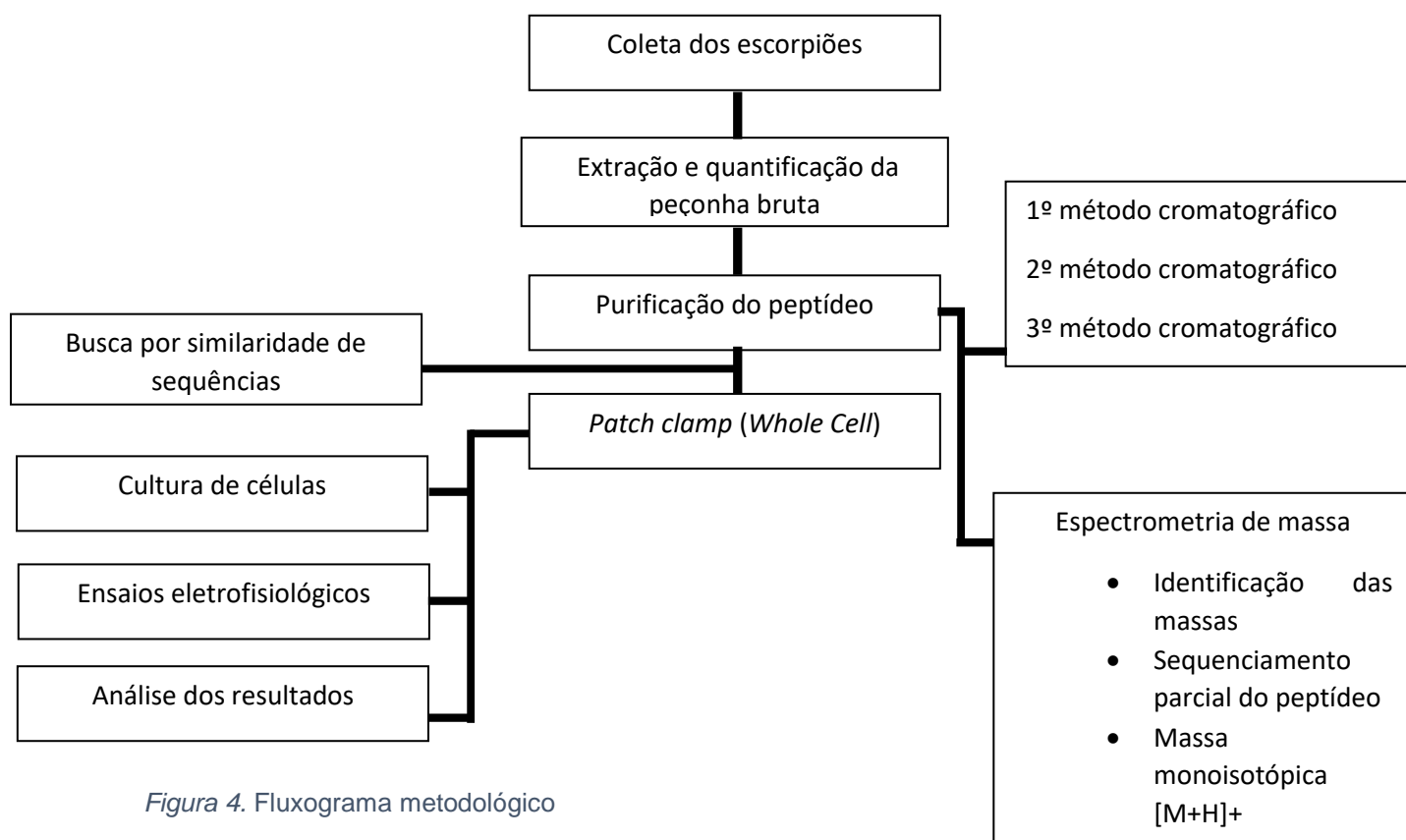


Figura 4. Fluxograma metodológico

1. Coleta dos escorpiões

Os escorpiões foram coletados na Universidade de Brasília (UnB), mais especificamente, no Instituto de Ciências Biológicas (IB) e Instituto de Química (IQ) no *Campus* Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF, sob a licença do IBAMA nº 048/2007-CGFAU. Os escorpiões foram mantidos em cativeiro no biotério do IB, com água a vontade e alimentação uma vez ao mês com baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

2. Extração e quantificação da peçonha bruta

A extração foi feita no próprio biotério, utilizando-se um eletroestimulador. A voltagem usada para liberação da peçonha foi de 12 Volts, sendo realizados cinco contatos próximo à região do telson. A peçonha foi coletada em um tubo *ependorf* de 1,5 mL estéril. A extração era realizada uma vez ao mês e a alimentação era feita, pelo menos, duas semanas antes da extração.

Após a extração, a peçonha era ressuspensa em 1,0 mL de água deionizada (Milli-Q) e centrifugada a 20.000g por 14 minutos a 4°C. O sobrenadante era coletado e dele retirado uma alíquota para quantificação no espectrofotômetro nos comprimentos de onda 280nm e 260nm (I) para calcular a concentração proteica total de peçonha.

$$C \left(\frac{mg}{mL} \right) = (1,55(A_{280})) - (0,76(A_{260})) \quad (I)$$

Por fim, eram feitas alíquotas contendo 1mg de peçonha bruta em *eppendorfs* estéreis. Os tubos eram secados a vácuo e posteriormente mantidos no freezer a temperatura de -20°C.

3. Soluções para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Solução A: Água Milli-Q e ácido Trifluoroacético (TFA) 0,12% (v/v)

Solução B: Acetonitrila (ACN) e TFA 0,10% (v/v)

4. Purificação do peptídeo

Foram realizadas cromatografias de peçonha bruta. Cada alíquota, contendo 1 mg de proteína presente na peçonha, foi ressuspensa em 200µL de solução A e centrifugada por 3,5 minutos a 16.000g. Após a centrifugação, o sobrenadante era aplicado em uma coluna de fase reversa analítica C₁₈ (Phenomenex Synergi 4µ Fusion-RP 80Å, dimensão: 250x4,6mm) equilibrada com o solvente A, e submetida a um gradiente linear de 0% a 60% por 60 minutos da solução B (**Quadro 2**), com um fluxo de 1 mL/min e absorbância monitorada a 216 nm.

Quadro 2. Método cromatográfico peçonha bruta

Tempo (minutos)	Porcentagem de solução B
0	0
60	60
65	100
70	100
75	0

Além desse método cromatográfico, foram realizados outros dois métodos diferentes com suas respectivas frações de interesse. O 2º método cromatográfico

(recromatografia) de gradiente com inclinações de 0,5% e 0,25% de solução B (**Quadro 3**), sendo que as amostras foram ressuspensas em solução A.

Quadro 3. Método cromatográfico recromatografia

Tempo (minutos)	Porcentagem de solução B
0	0
5	20
10	20
20	25
80	40
85	100
90	100
95	0

Já o 3º método cromatográfico (**Quadro 4**) utilizou-se gradiente com inclinações de 0,33% e 0,25% de solução B, e amostras ressuspensas em uma solução de 5% de ACN e 95% de água Milli-Q.

Quadro 4. Método cromatográfico rerecromatografia.

Tempo (minutos)	Porcentagem de solução B
0	5
10	15
20	15
35	20
75	30
80	100
85	100
90	0

Nesse terceiro método a coluna também era substituída por uma coluna de fase reversa analítica C₁₈ (Phenomenex Kinetex 5µ EVO 100Å, dimensão: 250x4,6mm). Todas as amostras, independentemente do método empregado, foram coletadas manualmente em *ependorfs* de 1,5 mL, secas a vácuo e mantidas a -20°C para futuras utilizações.

Ao final de todos os métodos cromatográficos, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI Autoflex Speed TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) utilizando os *softwares* FlexControl versão 3.4 e o FlexAnalysis versão 3.4 Build 76 (Bruker Daltonics), visando observar a pureza e as massas moleculares dos componentes contidos na amostra. Para espectrometria de massa utilizou-se a matriz ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA) tanto no modo linear quanto no refletivo. A amostra foi dissolvida em uma solução de 30% de ACN em água Milli-Q e aplicada (2µL da amostra + 2µL da matriz) em uma placa do tipo MTP 384 *ground steel*. Após a purificação do provável peptídeo Ts17, foi realizado o sequenciamento parcial da amostra, a qual foi diluída e aplicada na placa (2µL da amostra + 2µL da matriz). O sequenciamento foi realizado por *Ion Source Decay* (ISD), utilizando a matriz 1,5-diaminonaftaleno (DAN). Para obter o espectro do tipo ESY-MS/MS, a amostra foi diluída em uma solução de ácido fórmico 0,1% em água Milli-Q e adquiridos no Microtof-Q II (Bruker Daltonics, Alemanha). Para a quantificação final do peptídeo purificado foi utilizado o equipamento NanoVue Plus (Healthcare Bio-Sciences AB). A amostra foi diluída em 200µL de água Milli-Q e analisado no comprimento de onda de 280nm, tendo como parâmetros base para realizar o cálculo a massa do peptídeo oxidado, em KDa, e seu coeficiente de extinção molar (em) (II).

$$C \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{(A_{280} * KDa * 1000)}{em} \quad (II)$$

5. Busca por similaridade

O alinhamento foi realizado inicialmente buscando as sequências similares à toxina Ts17 depositadas no banco de dados BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após a identificação dessas sequências, foi realizado uma busca no banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>) para obter as sequências no formato FASTA e por fim, o alinhamento foi realizado pelo programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), no qual foi possível observar as regiões conservadas entre as toxinas escolhidas e a porcentagem de identidade. Buscas como essa são importantes pois a estrutura do peptídeo está relacionada com sua função podendo assim, inferir uma provável função para a Ts17.

6. Patch-clamp

6.1) Cultura de células

O Laboratório de Peptídeos Neuroativos possui um banco de células para ensaios eletrofisiológicos, com as linhagens de células *Human Embryonic Kidney* 293 (HEK) que expressam, separadamente, cada uma das seis isoformas de Navs (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5 e Nav1.6), e uma linhagem de *Chinese Hamster Ovary* (CHO) que expressa Nav 1.7. Para os ensaios no *Patch-clamp* as células HEK e CHO eram cultivadas em seus respectivos meios de cultura. As células eram incubadas a temperatura constante de 37°C e atmosfera umedecida com 5% de CO₂.

6.1.1) Meio de cultura (células HEK)

As células HEK foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de aminoácidos não essenciais (MEM), 4,5% de Glicose e antibiótico G418 (0,4mg/mL, Sigma).

6.1.2) Meio de cultura (célula CHO)

As células CHO foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 4,5% de Glicose e antibiótico G418 (0,4mg/mL, Sigma).

6.2) Soluções para registro fisiológico

6.2.1) Solução de banho extracelular

Quadro 5. Componentes da solução de banho extracelular.

	nM
NaCl	130
KCl	5
CaCl ₂ .H ₂ O	2
MgCl ₂ .6H ₂ O	2
HEPES	10
Glicose	10

* pH 7,4 ajustado com NaOH

6.2.2) A solução da pipeta intracelular

Quadro 6. Componentes da solução da pipeta intracelular.

	nM
CsF	105
CsCl	27
NaCl	5
MgCl ₂	2
EGTA	10
HEPES	10

* pH 7,3 ajustado com CsOH.

6.3) Ensaios eletrofisiológicos

As células contendo as isoformas de Navs foram plaqueadas e banhadas em solução externa (item 6.2.1) na cubeta de experimentação. Os registros eletrofisiológicos foram feitos no modo *Whole-cell* (HEKA Patch clamp EPC 10) em temperatura ambiente. Foi registrado a somatória de correntes de sódio (mensuração de macrocorrentes - I_{Na}). Pipetas de borossilicato foram confeccionadas de modo a apresentarem aproximadamente 1,5-2,5 MOhms de resistência, sendo elas preenchidas com solução interna (item 6.2.2). As células foram avaliadas em um protocolo de estimulação de voltagem a partir de um potencial de repouso de -100 mV. Para avaliar a probabilidade de abertura do canal durante a ativação, inativação e inibição de corrente foi utilizado um protocolo no qual a célula, a partir do potencial de repouso, foi estimulada por uma sequência de despolarizações (-100 ou -90 mV até 30 mV) durante 30ms, além de um estímulo final, imediatamente após a sequência de despolarização, com um pulso de -10 mV durante 10 ms para avaliar a inativação lenta do canal (SSI). Também foi avaliado o efeito do pré-pulso, sendo ele de 30 mV por 5 ms precedendo a sequência de despolarização. O intervalo entre o pré-pulso e a sequência de despolarização foi de 20 a 50 ms dependendo das condições necessárias de cada subtipo (**Figura 5**). A resistência em série foi compensada em pelo menos 70%, e as correntes capacitivas foram compensadas em um protocolo p/4.

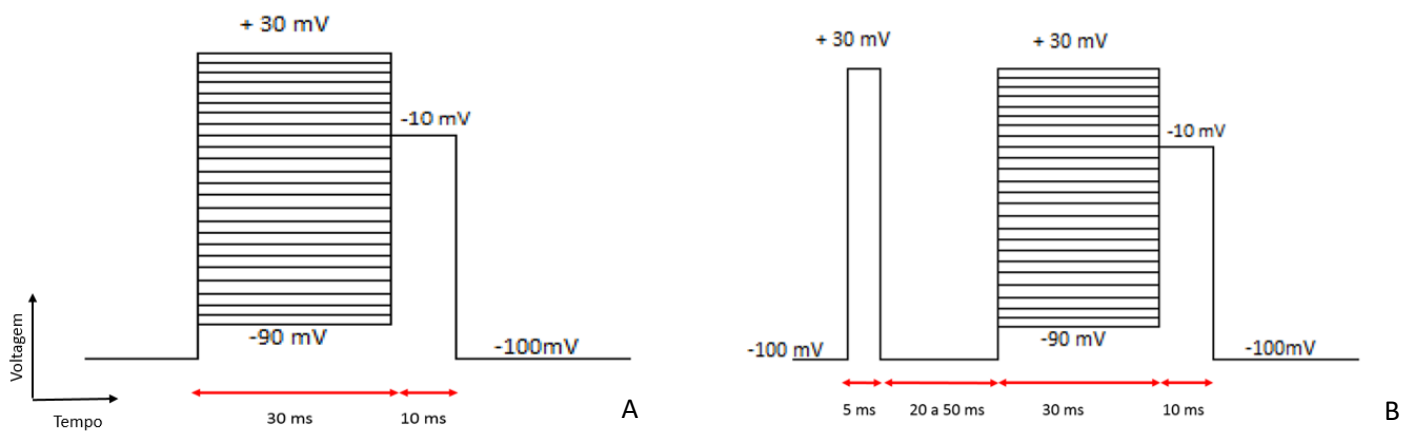


Figura 5. Protocolo de estimulação de voltagem sem (A) e com (B) pré pulso.

Para o protocolo de avaliação da recuperação da inativação lenta foram realizados dois pulsos de -10 mV por 20 ms em 40 até 80 ciclos. A cada ciclo mais dois milissegundos foram adicionados, resultando em um intervalo máximo entre os pulsos de cerca de 80 ms até 160 ms (**Figura 6**).

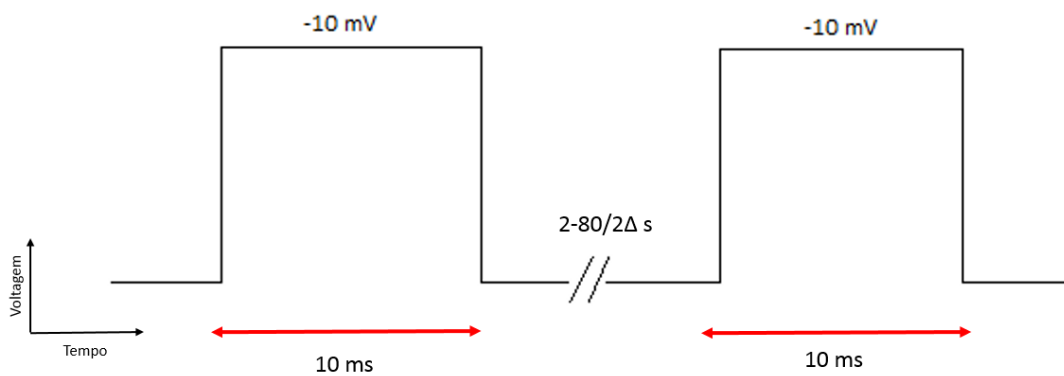


Figura 6. Protocolo de avaliação da recuperação da inativação lenta

Os registros foram obtidos pelo amplificador EPC 10 Heka que é comandado por meio do *software* PatchMaster. Os protocolos de estimulação avaliaram as relações corrente/voltagem, as cinéticas da inativação rápida e inativação lenta (h^∞) na ausência e na presença da Ts17. Para avaliação do efeito da Ts17 na condutância de Na^+ (g_{Na}), picos de I_{Na} foram convertidos em condutância pela fórmula (III):

$$g_{Na} = g_{max}^{-1} \left(\frac{I}{(V - V_{Na})} \right) \quad (III)$$

Onde V = voltagem que deflagrou o pico de corrente I e V_{Na} = potencial de reversão de sódio. Com base no alinhamento realizado, foi avaliado se a Ts17 realmente apresentava a atividade típica de alfa toxinas, selecionando traços brutos de correntes de sódio de onde foi recortado a porção que caracteriza a inativação rápida de I_{Na} (trecho entre o pico de I_{Na} e o estado estacionário da inativação). Esse trecho foi ajustado na função exponencial (IV):

$$y(t) = Amp_0 + \sum_{i=1}^3 Amp_i \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_i}}\right) \quad (IV)$$

Onde Amp_i corresponde a porção linear da curva e os demais termos são não lineares. Desse ajuste, obteve-se a constante de tempo tau (τ) que foi usada para determinar possíveis alterações na inativação rápida. Como a Ts17 apresentou atividade típica de beta toxina foi analisado dois fatores principais, sendo eles, a alteração na probabilidade de abertura (shift de voltagem) utilizando a equação de Boltzmann (V) e a inibição de macrocorrente (VI). Para a equação de Boltzmann temos $V_{1/2}$ sendo o V_{half} e o K_h o fator de inclinação da reta. Para recuperação da inativação lenta o ajuste foi feito pela função exponencial (IV) para obtenção da constante de tempo tau.

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

$$Fração\ não\ inibida\ (Fu) = \left(\frac{I/I_{maxToxina}}{I/I_{maxControle}} \right) \quad (VI)$$

Foram realizados testes estatísticos, teste t pareado two-tailed, para avaliar se havia diferença significativa entre os grupos controle e após aplicação da toxina.

V. RESULTADOS

1. Purificação da toxina Ts17 da peçonha do *Tityus serrulatus*

Ao total foram realizadas 10 análises cromatográficas de peçonha bruta utilizando o primeiro método cromatográfico (**Quadro 2**), obtendo-se uma média de 50 frações em cada corrida. Baseando-se nos estudos realizados por Oliveira et al. (2013), que reportaram o *fingerprinting* da peçonha bruta do *Tityus serrulatus* indicando os tempos de retenção das frações e as massas moleculares dos respectivos componentes, foram selecionadas as frações cromatográficas que eluíram entre 31 a 42 minutos no perfil cromatográfico (31 a 42% de ACN). Nesse intervalo, foram obtidas doze frações cromatográficas. Essas foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF para identificação das massas moleculares dos componentes presentes em cada fração. A massa molecular mais próxima da Ts17 foi encontrada na fração com eluição a 32% de ACN (**Figura 7**).

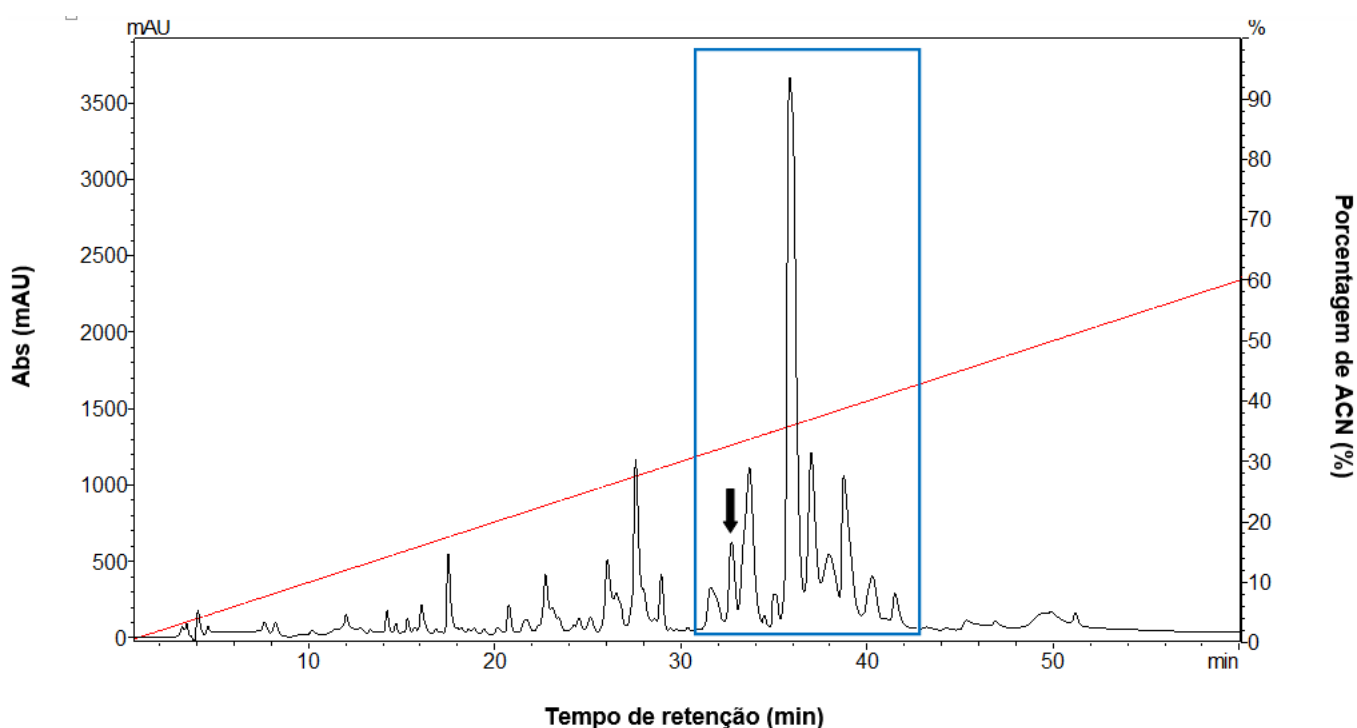


Figura 7. Perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus* por CLAE em fase reversa com destaque para o intervalo de interesse. A fração em destaque (seta) tem o tempo de retenção e porcentagem de ACN de 32 minutos e 32% respectivamente. Fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de absorção de 216nm.

Com a identificação da fração de interesse na peçonha bruta e no intuito de se obter a toxina pura, esta fração foi submetida a outra corrida cromatográfica usando

um segundo método (**Quadro 3**). Foram feitas três corridas cromatográficas com esse método, sendo obtidos seis frações em cada corrida. A amostra de interesse teve eluição em 26% de ACN, sendo essa fração a de maior abundância no perfil cromatográfico (**Figura 8**). Após análise por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, foi observado nessa fração um componente de massa molecular próxima à da Ts17 junto com outros componentes, sendo necessário um terceiro método de cromatografia.

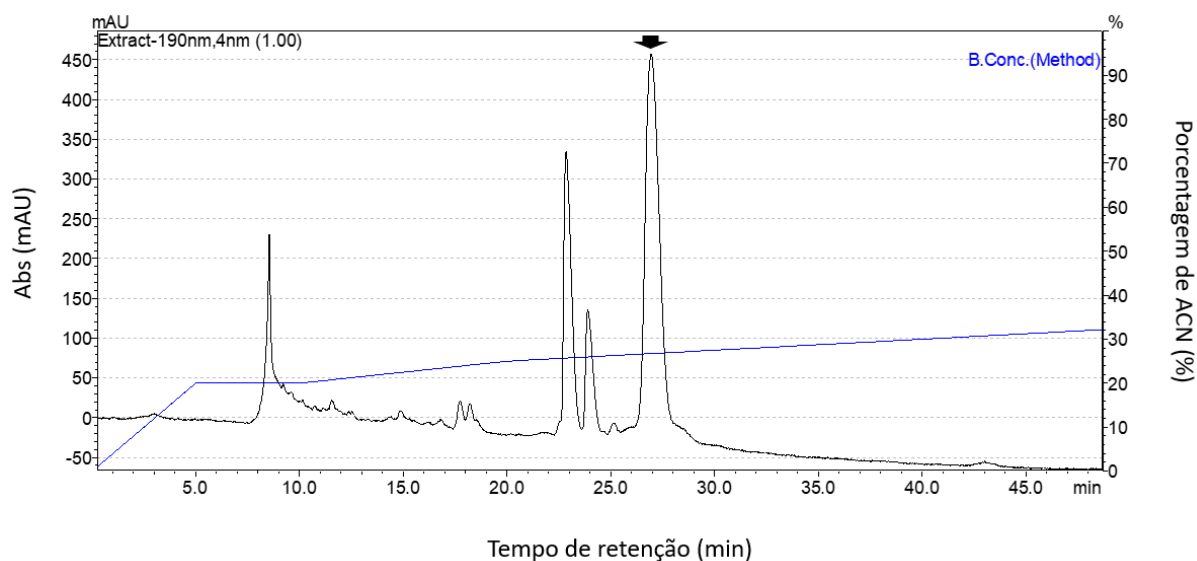


Figura 8. Perfil cromatográfico da cromatografia, usando o segundo método cromatográfico, da fração selecionada na cromatografia da peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus*. A fração em destaque (seta) tem o tempo de retenção e porcentagem de ACN de 26 minutos e 26% respectivamente. Fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de absorção de 216nm.

Para realizar essa purificação, foram feitas duas corridas cromatográficas com o terceiro método cromatográfico (**Quadro 4**) e foram isoladas dez frações em cada corrida. Na fração cromatográfica com eluição a 23% de solução B foi encontrado um peptídeo cuja massa molecular foi próxima à massa molecular da Ts17 (**Figura 9**).

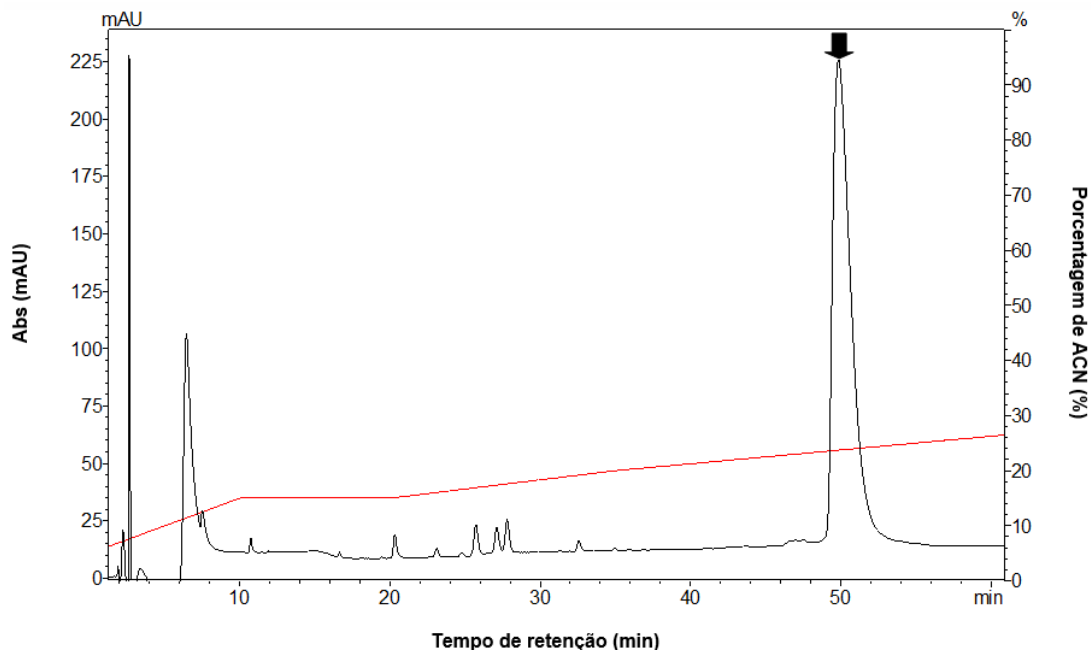


Figura 9. Perfil cromatográfico, usando o terceiro método cromatográfico, da fração selecionada na re-cromatografia da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. A fração em destaque (seta) tem o tempo de retenção e porcentagem de ACN de 49 minutos e 23% respectivamente. Fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de absorção de 216nm.

Toxinas de escorpião estão descritas na literatura como toxinas com possíveis modificações pós-traducionais como por exemplo a amidação na porção C-terminal de sua sequência, conferindo-as uma melhor atividade biológica, como uma maior toxicidade e melhor estabilidade contra agentes externos (COELHO et al., 2014). Essa amidação ocorre devido a certas enzimas que são responsáveis por reconhecer e clivar a tríade de aminoácidos GKK na porção C-terminal, sendo a glicina o aminoácido responsável pela formação da amida. Devido a essa possibilidade, utilizando-se o *software* Compass IsotopePattern (Bruker Daltonics, Alemanha), inferiu-se duas prováveis massas moleculares experimentais para a toxina oxidada, uma não amidada, com os resíduos de aminoácidos GKK e massa molecular monoisotópica teórica de 7548,39 Da, e uma amidada, sem os três últimos aminoácidos GKK, de massa molecular monoisotópica teórica de 7234,19 Da.

Com a fração de interesse coletada, a amostra foi analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF no modo linear, tendo como resultado um único componente de massa molecular média de 7241,54 Da e seu $[M+2H]^{2+}$ de 3622,46 Da (**Figura 10**).

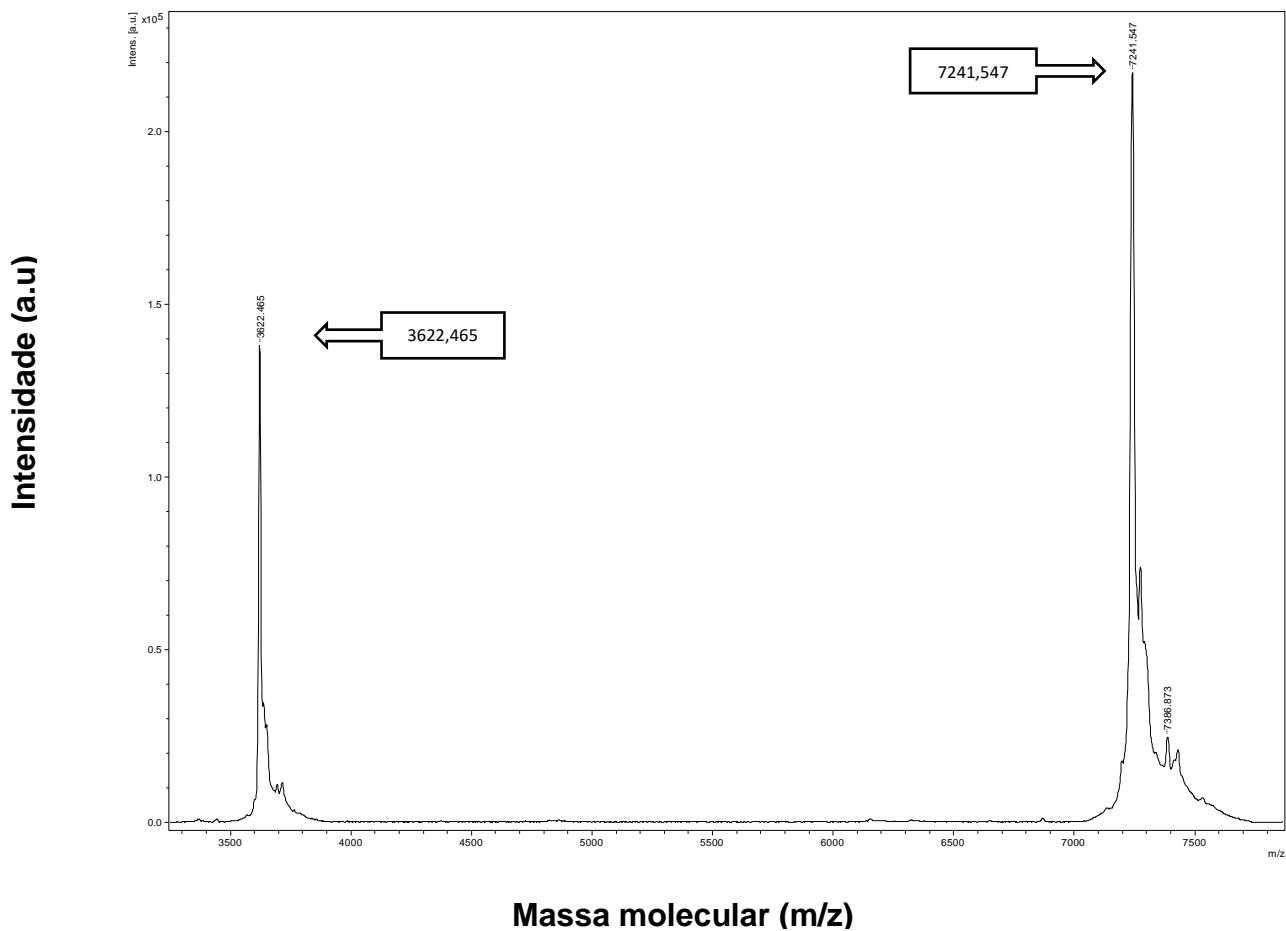


Figura 10. Espectro de massa média do íon molecular da amostra purificada. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA).

Para o sequenciamento, utilizou-se o espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF utilizando-se a matriz 1,5-diaminonaftaleno (DAN) e obteve-se os íons da série-c. Foi possível identificar uma sequência de 43 resíduos de aminoácidos, que corresponde a 64,1 % da sequência da Ts17 (**Figura 11 e 12**).

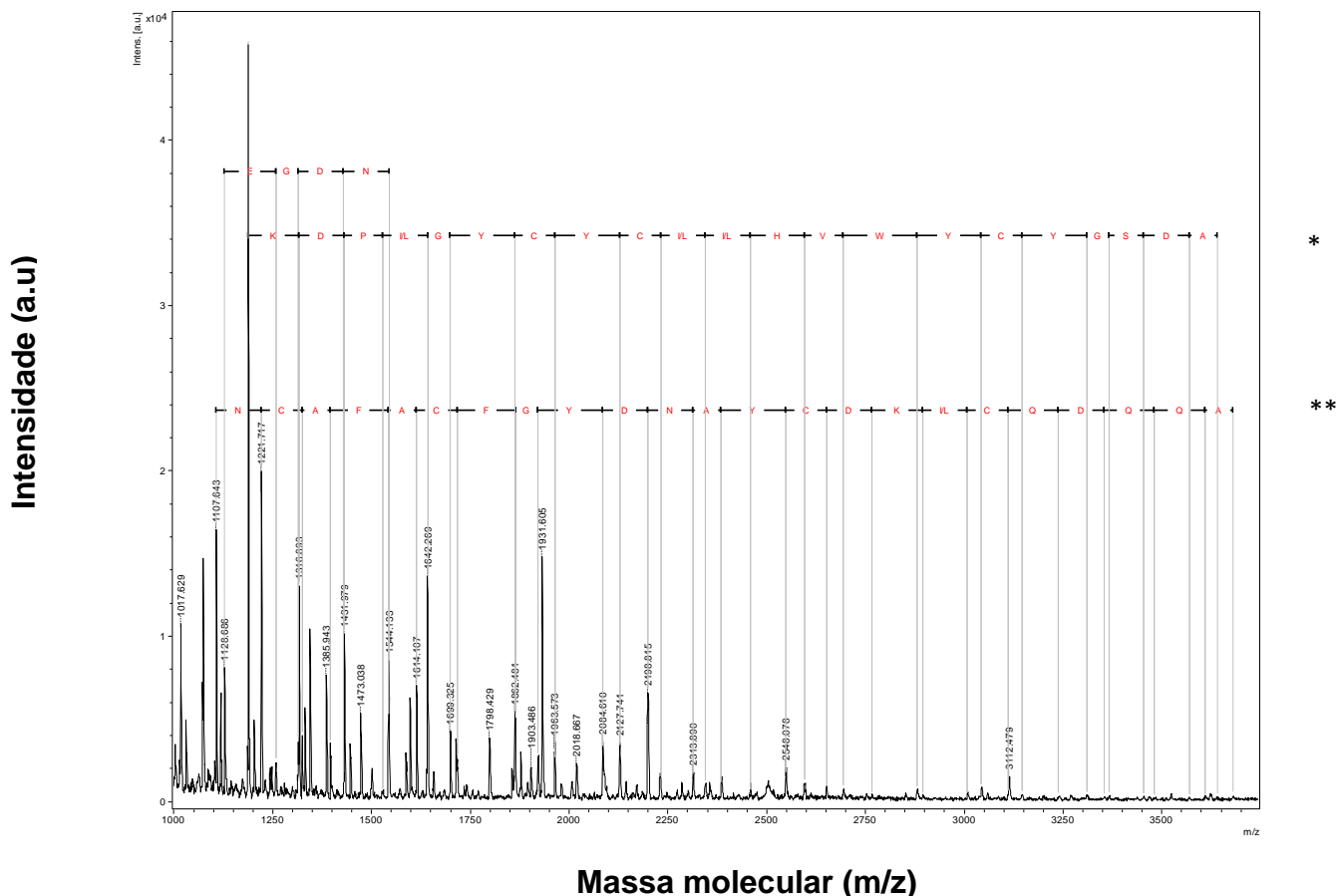


Figura 11. Sequenciamento parcial do peptídeo Ts17. Sequenciamento por ISD (*Ion Source Decay*), utilizando a matriz de DAN. Linha de cima (*) na direção C-terminal para a N-terminal e linha de baixo (**) na direção N-terminal para o C-terminal.

KKDGYPVEGDNCAFACFGYDNAYCDKLKDKKADSGYCYWHILCYCYGLPDKEPTKTSGRCKPGK
 -----NCAFACFGYDNAYCDKLKDKKADSGYCYWHILCYCYGLPDK-----

Figura 12. Alinhamento entre a sequência da Ts17 (primeira linha) e a sequência parcial obtida por ISD (segunda linha).

Foram encontradas 7 ambiguidades entre a sequência obtida experimentalmente e a disponível nos bancos de dados públicos. As ambiguidades foram entre os resíduos de aminoácidos I e L por serem isômeros de posição e por isso apresentam a mesma massa molecular, e entre K e Q devido à proximidade das massas monoisotópicas dos aminoácidos (CANTÚ et al., 2008), consequentemente a precisão do equipamento não foi capaz de distingui-las.

Para confirmação da massa molecular monoisotópica, a amostra foi analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF no modo refletivo, tendo como

resultado apenas a massa média do $[M+2H]^{2+}$ de 3617,558 Da (**Figura 13**). Para uma melhor precisão utilizou-se o espectrômetro de massa do tipo ESI-MS/MS. A massa molecular monoisotópica experimental do íon $[M+6H]^{6+}$ encontrada foi de 1206,5702 Da, tendo sua massa molecular monoisotópica $[M+H]^+$ de 7234,4212 Da. (**Figura 14**).

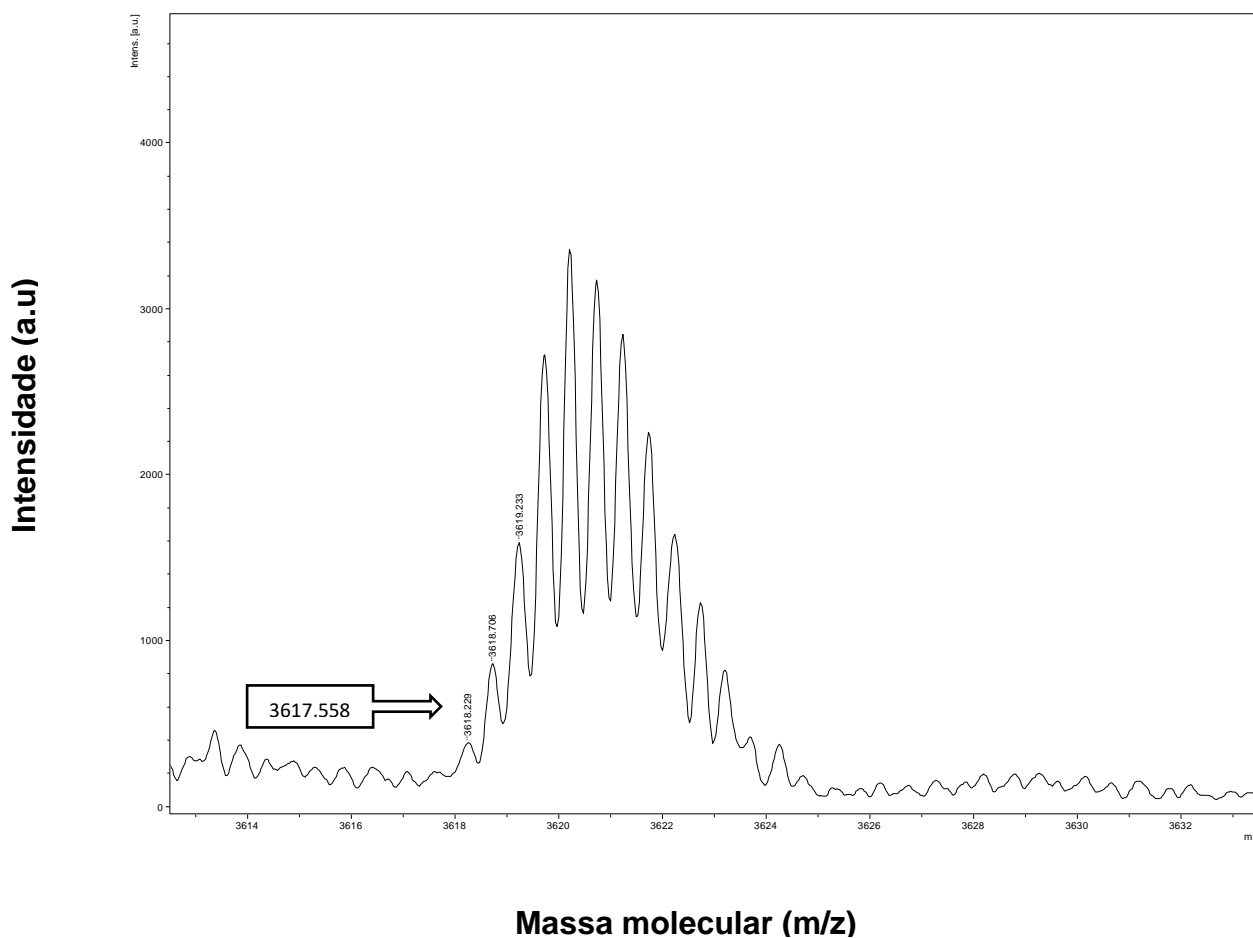


Figura 13. Espectro da massa molecular monoisotópica do íon molecular $[M+2H]^+$ do peptídeo Ts17 purificado. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA).

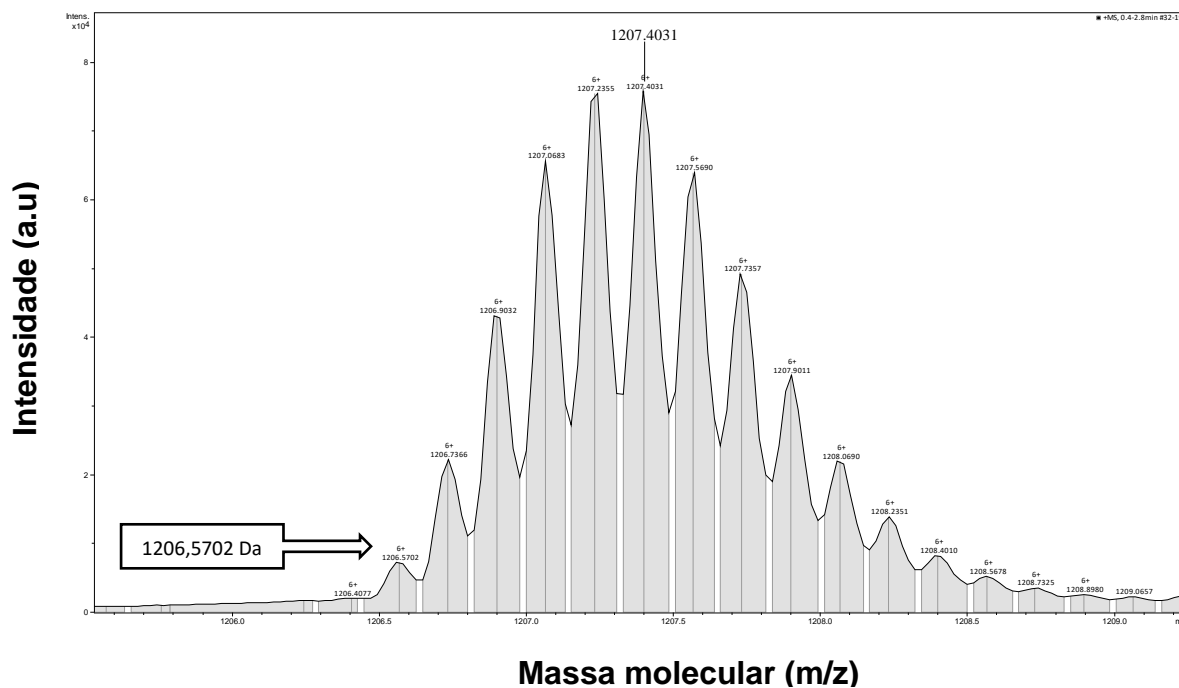


Figura 14. Espectro da massa molecular monoisotópica do íon molecular $[M+6H]^+$ do peptídeo Ts17 purificado. Diluição da amostra feita em solução de ácido fórmico 0,1% em água Milli-Q.

Considerando-se esses dois parâmetros, sequenciamento parcial e massa molecular monoisotópica, pode-se confirmar que o peptídeo em estudo se trata da toxina Ts17. Com os resultados obtidos pode-se inferir que a toxina não possui os três últimos aminoácidos GKK, sendo assim uma toxina amidada (**Figura 15**).

KKDGYPVEGDNCAFACFGYDNAYCDKLCCKKADSGYCYWVHILCYCYGLPDKEPTKTSGRCKP

Figura 15. Sequência de aminoácidos do peptídeo Ts17 sem os três últimos aminoácidos (GKK).

1.2. Alinhamento da Ts17 com toxinas com alta porcentagem de identidade

Após análises, infere-se que a Ts17 possui potencial neurofarmacológico, pois comparando sua sequência a de outros peptídeos, como TbTx5 e Tb3 do *Tityus bahiensis*, Ts5 do *Tityus serrulatus*, To9 e To10 do *Tityus obscurus*, Tpa4 do *Tityus pachyurus* e Tst3 do *Tityus stigmurus*, observa-se uma similaridade a α -toxinas que agem em canais iônicos de membranas celulares, mais especificamente em canais de sódio voltagem dependentes (**Figura 16**) (NENCIONI et al., 2018).

		Aa	% Id
sp H1ZZH9 20-81 To10	KKDGYPV-EGSCAFPC-GYDNEYCDKLCERKADSGYCYWVNIILCYCYGLPD---NAAIK GYGRCKP	62	79.03
sp H1ZZH8 20-82 To9	KKDGYPVKEGDCAFPCC-GYDNEYCDKLCERKADSGYCYWGNILCYCYGLPD---KAAIK GYGRCRP	63	74.60
sp P46115 1-64 Ts5	KKDGYPVEGDNCAFAFCFYDNEYCDKLCDDKADSGYCYVWSP-DCYCYGLPEHILKEPTK TSGRC--	64	90.16
sp H1ZZI5 20-83 Tpa4	KKDGYPLEYDNCAYDCLGYDNYKCDKLCDDKADSGYCYWAHILCYCYGLPD---NEPIK TSGRCRP	64	82.81
sp P0C8X5 1-64 Tst3	KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNEYCDKLCDDKADSGYCYWAHITCYCYGLPD---SEPTK TNGKCKS	64	82.81
sp P56608 1-62 Tb3	KKDGYPVEADNCAVFCFYDNEYCDKLCGDKKADSGYCYWVHILCYCYGLPD---NEPTK TNGKC--	62	90.32
sp Ts17	KKDGYPVEGDNCAFAFCFYDNEYCDKLCDDKADSGYCYWVHILCYCYGLPD---KEPTK TSGRCRP	64	100.00
sp P0C5K8 20-83 TbTx5	KKDGYPVEGDNCAVFCFYDNEYCDKLCDDKADSGYCYWVHILCYCYGLPD---KEPTK TNGRCRP	64	96.88
	*****: ..*: * .*** ***** :;*** ** * *****: . * *;*		

Figura 16. Alinhamento de toxinas similares a Ts17.

2. Caracterização eletrofisiológica da toxina Ts17 em canais de sódio voltagem dependentes de humanos

O número amostral dos experimentos foi de até 8 células para cada subtipo de Nav testado. A concentração final da toxina foi 100 nM para todas as células. Para os experimentos relacionados à ativação, foram testados com e sem pré pulso.

2.1. Fração não inibida da corrente (Fu) e I/V

A fração não inibida da corrente foi avaliada na fase de ativação em todos os subtipos. Foi observada a inibição de corrente na presença da Ts17 em todos os subtipos testados, com exceção do subtipo Nav 1.3. Para os experimentos com pré pulso, a variação da Fu foi de aproximadamente 0,47 até 0,95, sendo que os menores Fu foram observados nos subtipos 1.5 e 1.6, com valores de 0,47 e 0,54 respectivamente (**Tabela 1**). Para os experimentos sem pré pulso, a variação foi similar, sendo de aproximadamente 0,59 a 0,98. Os menores Fu foram observados nos subtipos Nav 1.6 e 1.5, com valores de 0,59 e 0,75, respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 1. Fração não inibida da corrente (F_u) com pré pulso. Média das células de cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula e seu respectivo erro padrão.

Fração não inibida da corrente INa (F_u)		
	Média	n
hNav1.1	0,75±0,08	7
hNav1.2	0,84±0,03	5
hNav1.3	0,95±0,02	6
hNav1.4	0,87±0,09	6
hNav1.5	0,47±0,06	5
hNav1.6	0,54±0,05	8
hNav1.7	0,74±0,08	8

Tabela 2. Fração não inibida da corrente (F_u) sem pré pulso. Média das células de cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula e seu respectivo erro padrão.

Fração não inibida da corrente INa (F_u)		
	Média	N
hNav1.1	0,82±0,06	7
hNav1.2	0,89±0,03	5
hNav1.3	0,98±0,03	6
hNav1.4	0,84±0,11	7
hNav1.5	0,75±0,06	5
hNav1.6	0,59±0,06	8
hNav1.7	0,81±0,06	8

Conseqüentemente, as macrocorrentes de sódio foram inibidas pela Ts17 em maior grau nos subtipos Nav1.5 e Nav1.6 independente da aplicação ou não do pré pulso. Esses resultados são demonstrados nos gráficos de corrente/voltagem (I/V) e nos traços brutos dos experimentos realizados (**Figura 17, 18, 19, 20**).

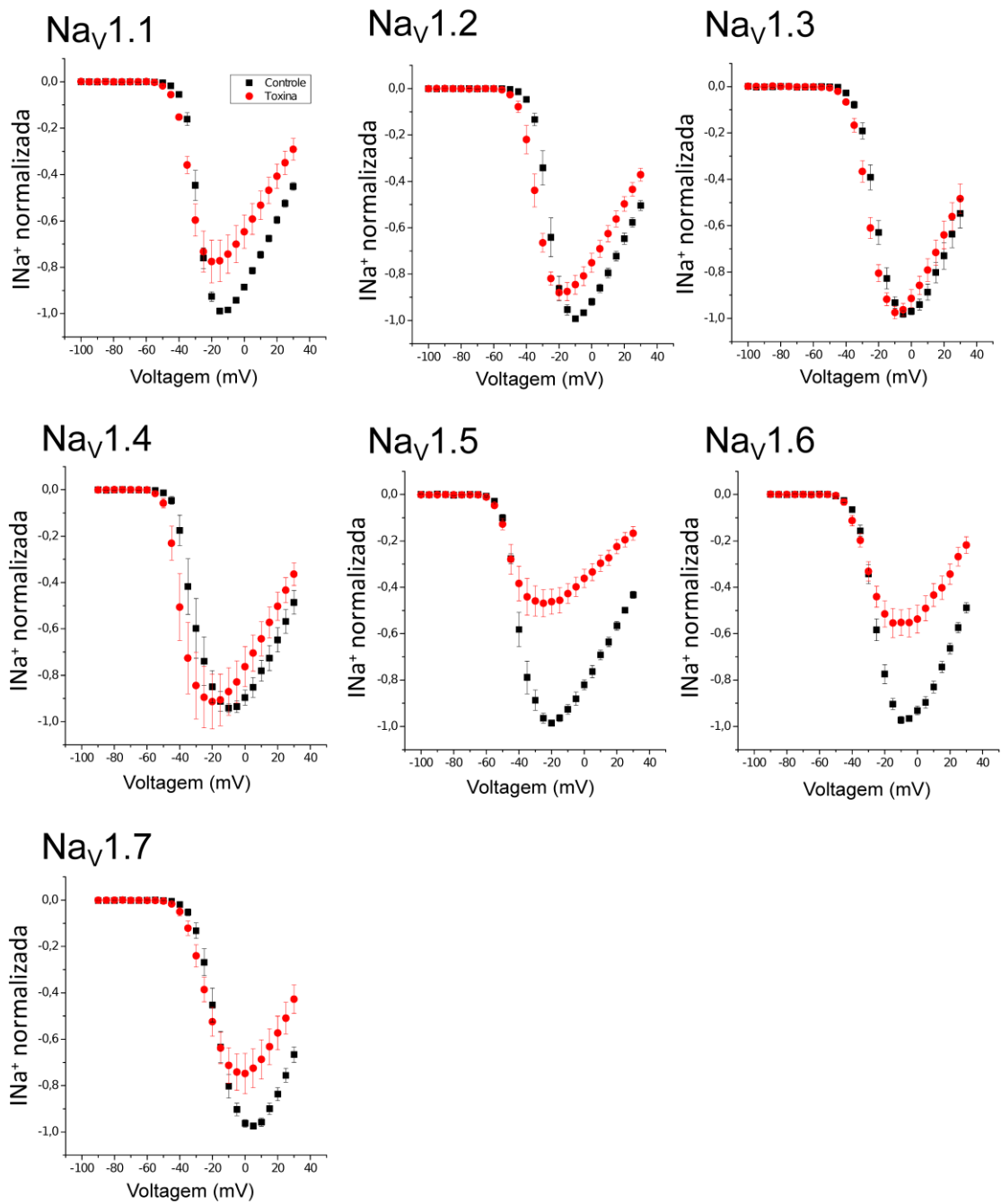


Figura 17. Gráfico de corrente (I)/voltagem (V) com pré pulso de todos os subtipos testados. Média das células com a corrente normalizada de cada subtipo. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).

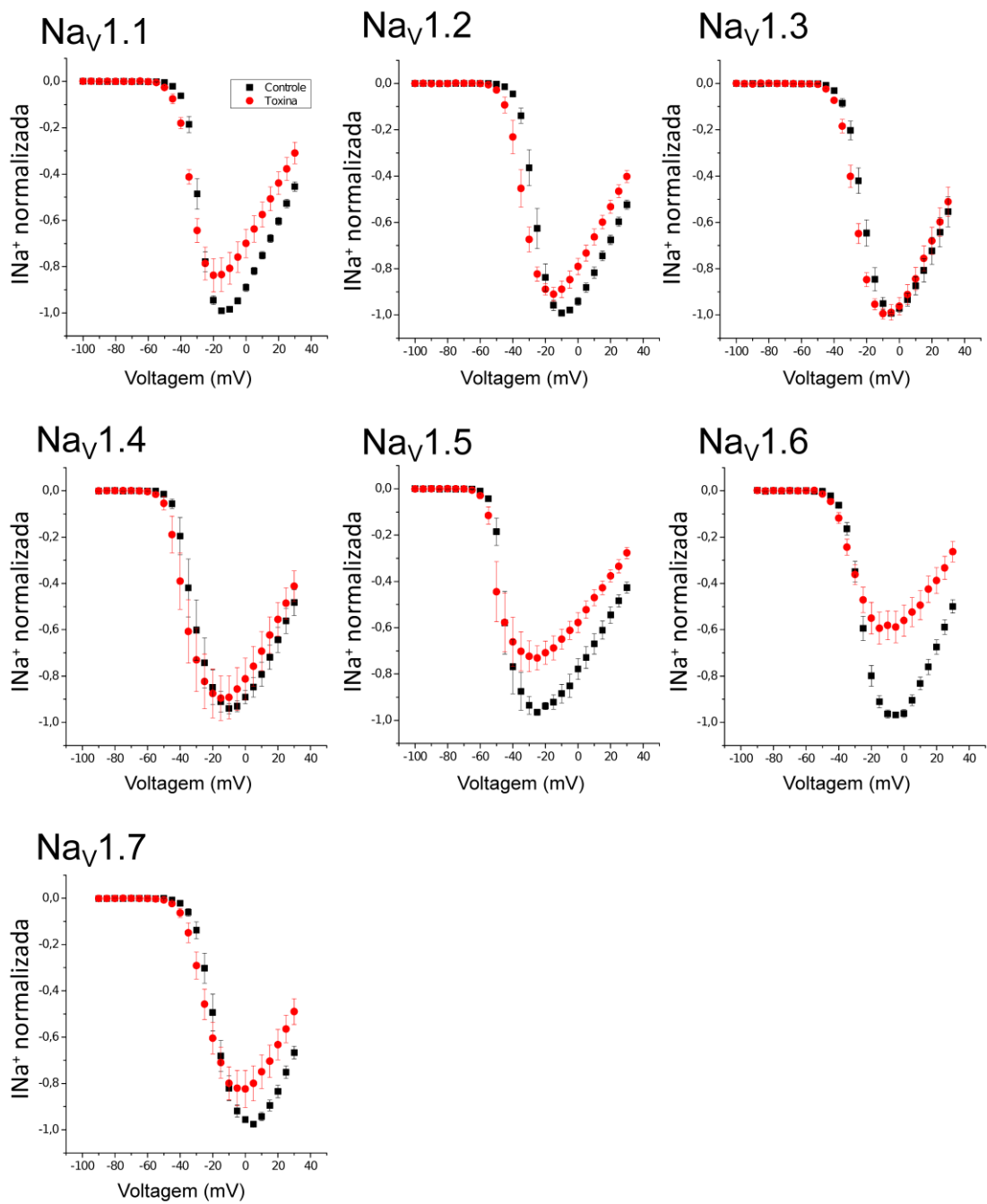


Figura 18. Gráfico de corrente (I)/voltagem (V) sem pré pulso de todos os subtipos testados. Média das células com a corrente normalizada de cada subtipo. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).

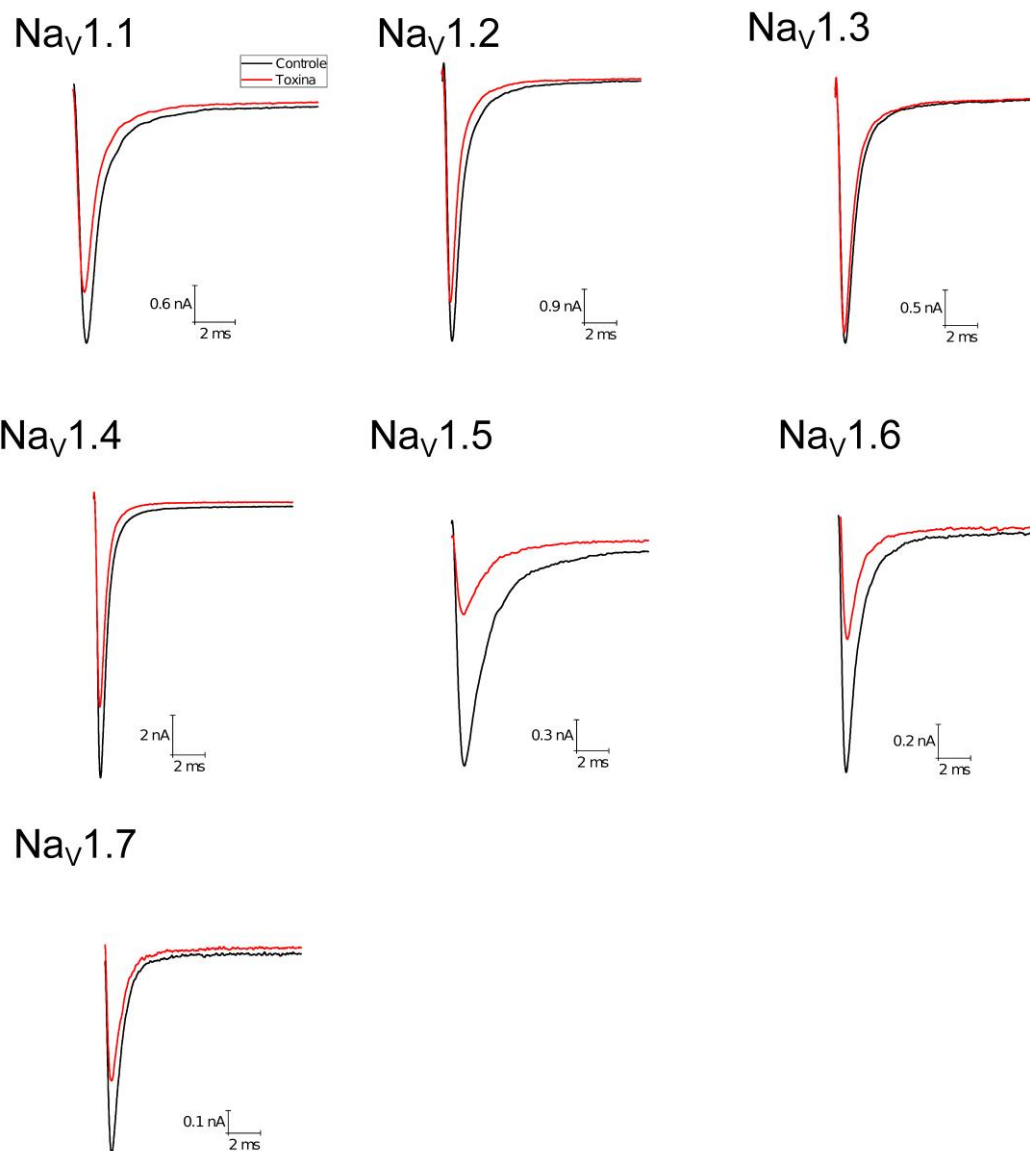


Figura 19. Traços brutos da corrente de sódio com pré pulso. Cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).

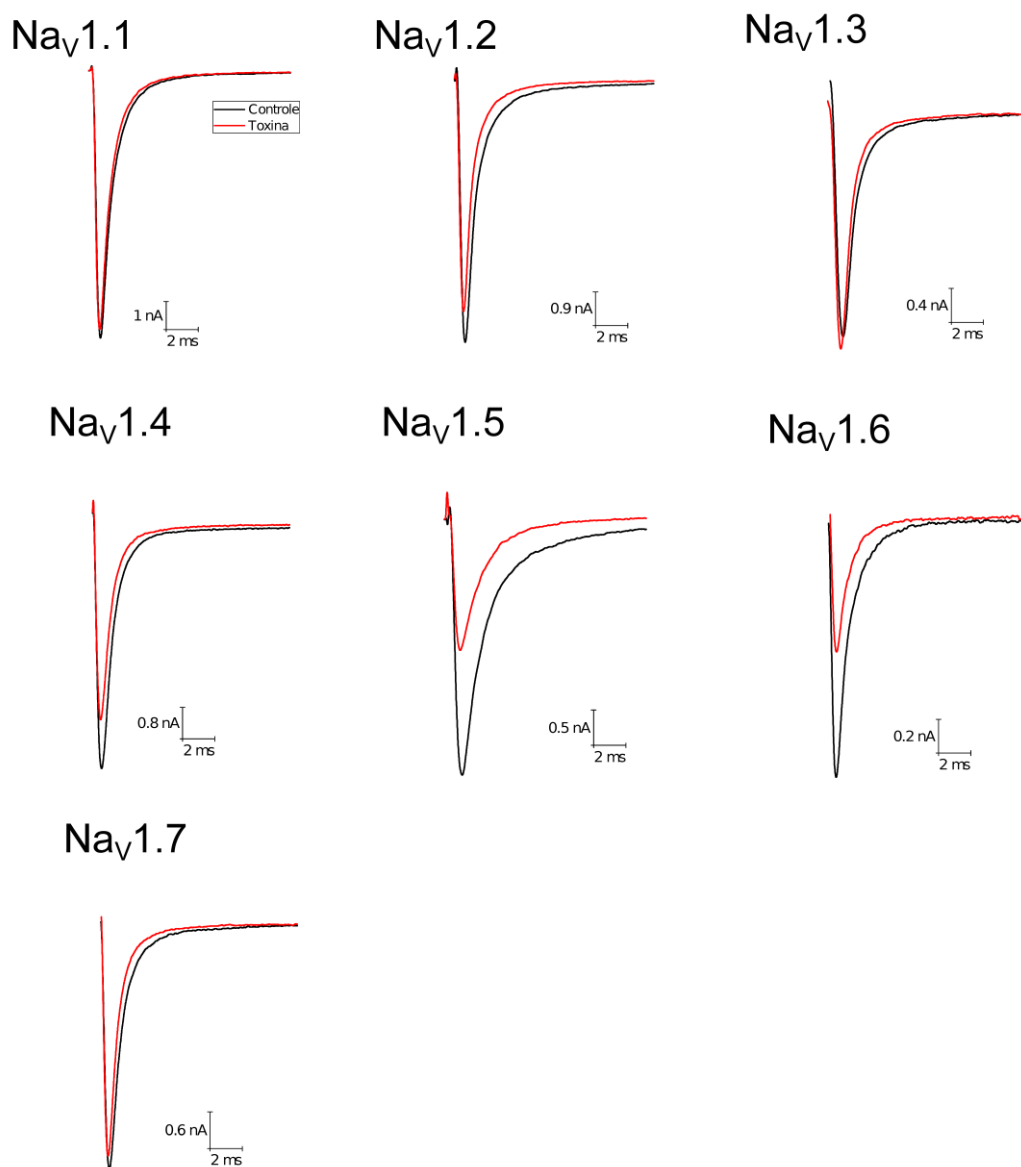


Figura 20. Traços brutos da corrente de sódio sem pré pulso. Cada subtipo utilizando valores de corrente máxima de cada célula. Preto: controle; Vermelho: Toxina (100 nM).

2.2. Avaliação da probabilidade de abertura ou *Shift* de voltagem

Visando observar a influência que a presença da toxina tem na abertura dos canais, foi analisado o deslocamento da curva de probabilidade de abertura na ativação e na inativação dos canais na presença e na ausência da Ts17, por meio dos $V_{1/2}$ gerados pela função de Boltzmann (Função V). Todos os subtipos tiveram alterações na probabilidade de abertura, tanto para ativação com e sem pré pulso, quanto para a inativação. Sendo as curvas, na presença da toxina, deslocadas para a esquerda, conseqüentemente para potenciais mais negativos. Tanto para a ativação

com e sem pré pulso, quanto para a inativação foram observadas diferenças significativas em todos os subtipos.

Para os experimentos de ativação com pré pulso, a variação do *shift* de voltagem foi de aproximadamente -5,48 até -8,24 mV. Sendo que no subtipo Nav1.2, observou-se a maior alteração, com valor de $-8,24 \pm 0,80$ mV. Seguido pelos subtipos Nav1.7, Nav1.1, Nav1.6, Nav1.5 e Nav 1.4 com valores de $-7,60 \pm 0,79$ mV; $-6,23 \pm 0,50$ mV; $5,72 \pm 0,73$ mV; $5,71 \pm 0,51$ mV e $-5,62 \pm 1,06$ mV, respectivamente. Por fim, o subtipo Nav1.3 com a menor alteração na probabilidade de abertura, de $-5,4 \pm 0,78$ mV (**Tabela 3) (Figura 21)**.

Tabela 3. $V_{1/2}$ da fase de ativação dos canais de sódio voltagem dependentes com pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística ()*

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	N
hNav1.1	$-28,24 \pm 0,86$	$-34,48 \pm 0,90$	$-6,23 \pm 0,50$	7*
hNav1.2	$-25,93 \pm 1,48$	$-34,17 \pm 1,70$	$-8,24 \pm 0,80$	5*
hNav1.3	$-20,24 \pm 1,76$	$-25,72 \pm 1,42$	$-5,48 \pm 0,78$	6*
hNav1.4	$-31,51 \pm 2,72$	$-37,14 \pm 2,65$	$-5,62 \pm 1,06$	6*
hNav1.5	$-39,09 \pm 1,33$	$-44,80 \pm 1,43$	$-5,71 \pm 0,51$	5*
hNav1.6	$-24,65 \pm 1,14$	$-30,37 \pm 3,06$	$-5,72 \pm 0,73$	8*
hNav1.7	$-14,71 \pm 2,07$	$-22,31 \pm 1,85$	$-7,60 \pm 0,79$	8*

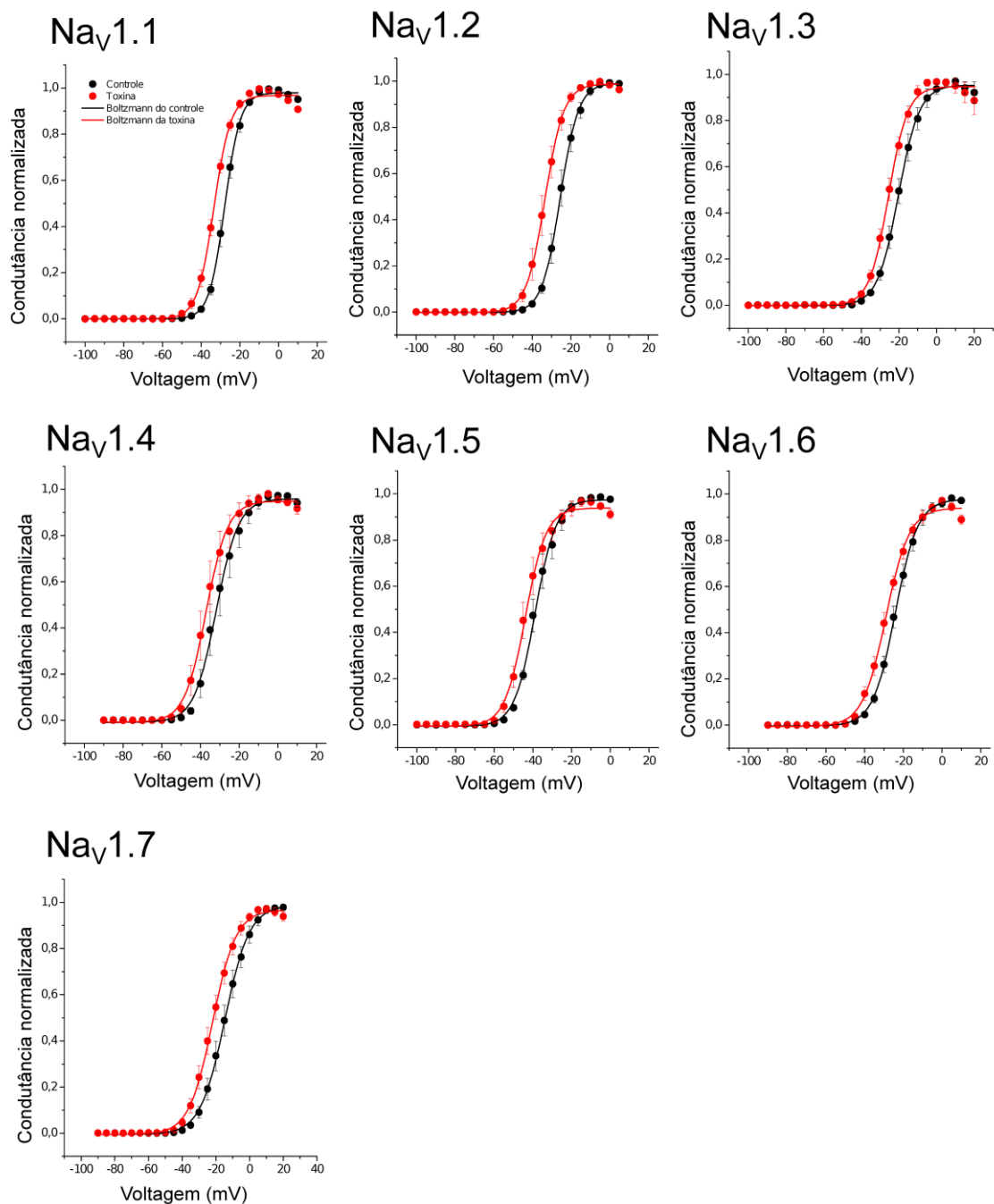


Figura 21. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de ativação (com pré pulso) dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).

Nos experimentos de ativação sem pré pulso, foram obtidos resultados semelhantes aos com pré pulso. O subtipo Nav1.2 apresentou a maior alteração no *shift* de voltagem, sendo seu valor de $-8,16 \pm 0,91$ mV. Seguido pelos subtipos Nav1.7, Nav1.1, Nav1.4, Nav1.6 e Nav1.3, com valores de $-6,85 \pm 0,80$ mV; $-6,13 \pm 0,60$ mV; $-5,86 \pm 0,73$ mV; $-5,24 \pm 0,90$ mV e $-5,1 \pm 0,73$ mV. Ademais, o subtipo Nav1.5 foi o de menor alteração, sendo seu valor de $-4,35 \pm 0,50$ mV (Tabela 4) (Figura 22).

Tabela 4. $V_{1/2}$ da fase de ativação dos canais de sódio voltagem dependentes sem pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	-28,67±0,91	-34,81±1,09	-6,13±0,60	7*
hNav1.2	-25,54±1,63	-33,70±1,84	-8,16±0,91	5*
hNav1.3	-20,72±1,88	-25,83±1,33	-5,10±0,73	6*
hNav1.4	-28,86±3,42	-34,72±3,29	-5,86±0,73	7*
hNav1.5	-42,95±2,69	-47,30±2,64	-4,35±0,50	5*
hNav1.6	-23,99±1,32	-29,24±0,97	-5,24±0,90	8*
hNav1.7	-15,49±2,06	-22,34±1,92	-6,85±0,80	8*

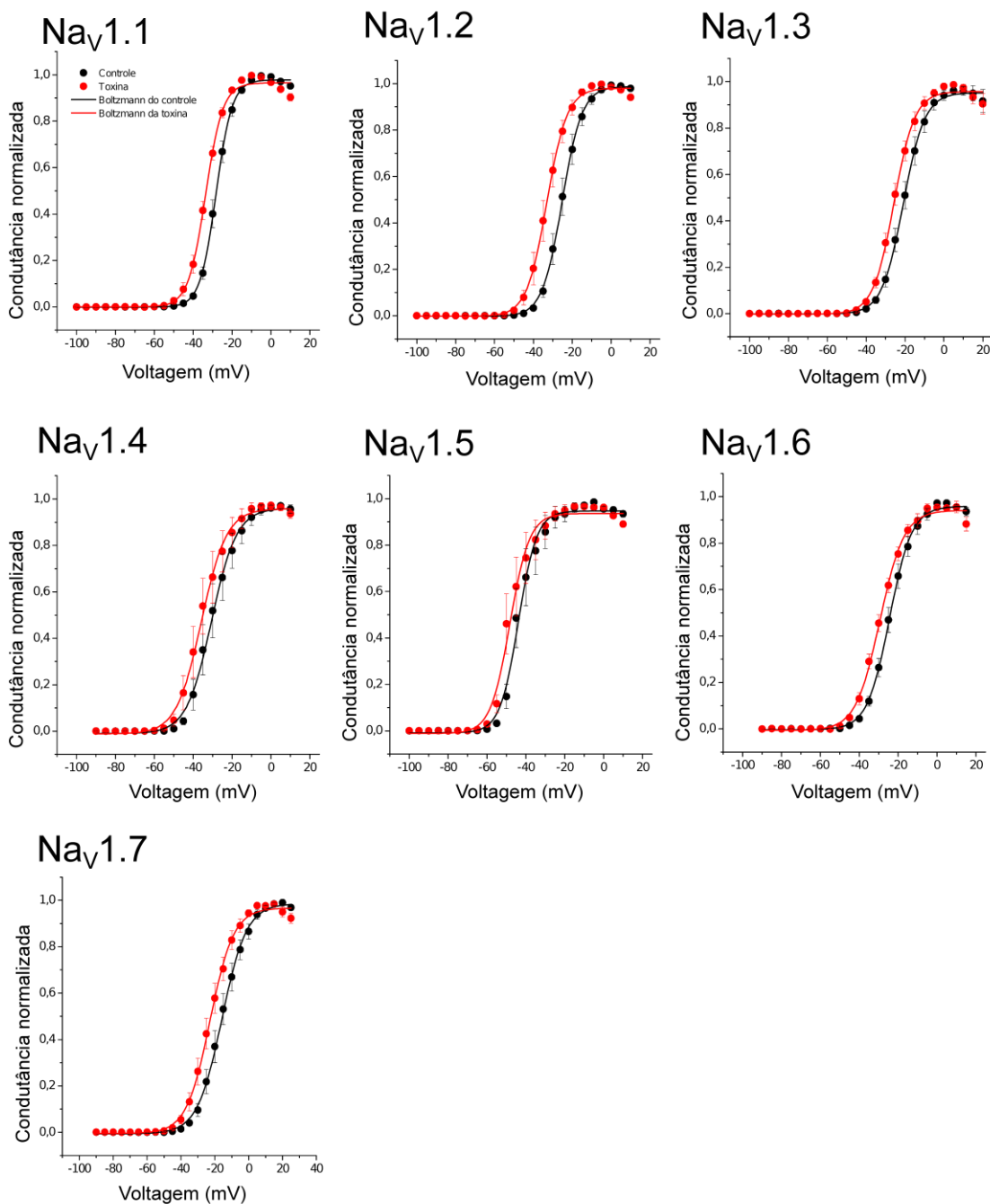


Figura 22. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de ativação (sem pré pulso) dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construído a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).

Os resultados referentes à inativação mostram que a variação foi de -2,85 até -15,80 mV, sendo que no subtipo Nav 1.5 foi observado o maior *shift* de voltagem, com valor de $-15,80 \pm 1,47$ mV. Nos subtipos Nav1.6, Nav1.7, Nav1.2, Nav1.1 e Nav1.4 foram obtidos valores de $-8,90 \pm 1,00$ mV; $-6,65 \pm 0,95$ mV; $-4,73 \pm 0,53$ mV; $-4,25 \pm 0,28$ mV; $-4,06 \pm 0,52$ mV. O subtipo Nav1.3 foi o de menor alteração na probabilidade de abertura, sendo seu valor de $-2,85 \pm 0,55$ mV (Tabela 5) (Figura 23).

Tabela 5. $V_{1/2}$ da fase de inativação dos canais de sódio voltagem dependentes e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	-48,83±1,28	-53,08±1,08	-4,25±0,28	6*
hNav1.2	-48,94±0,96	-53,67±1,22	-4,73±0,53	7*
hNav1.3	-47,11±0,77	-49,96±1,13	-2,85±0,55	5*
hNav1.4	-65,66±1,32	-69,72±1,37	-4,06±0,52	7*
hNav1.5	-63,78±1,98	-79,59±2,38	-15,80±1,47	5*
hNav1.6	-58,44±1,80	-67,35±1,50	-8,90±1,00	7*
hNav1.7	-45,00±1,24	-51,66±1,91	-6,65±0,95	8*

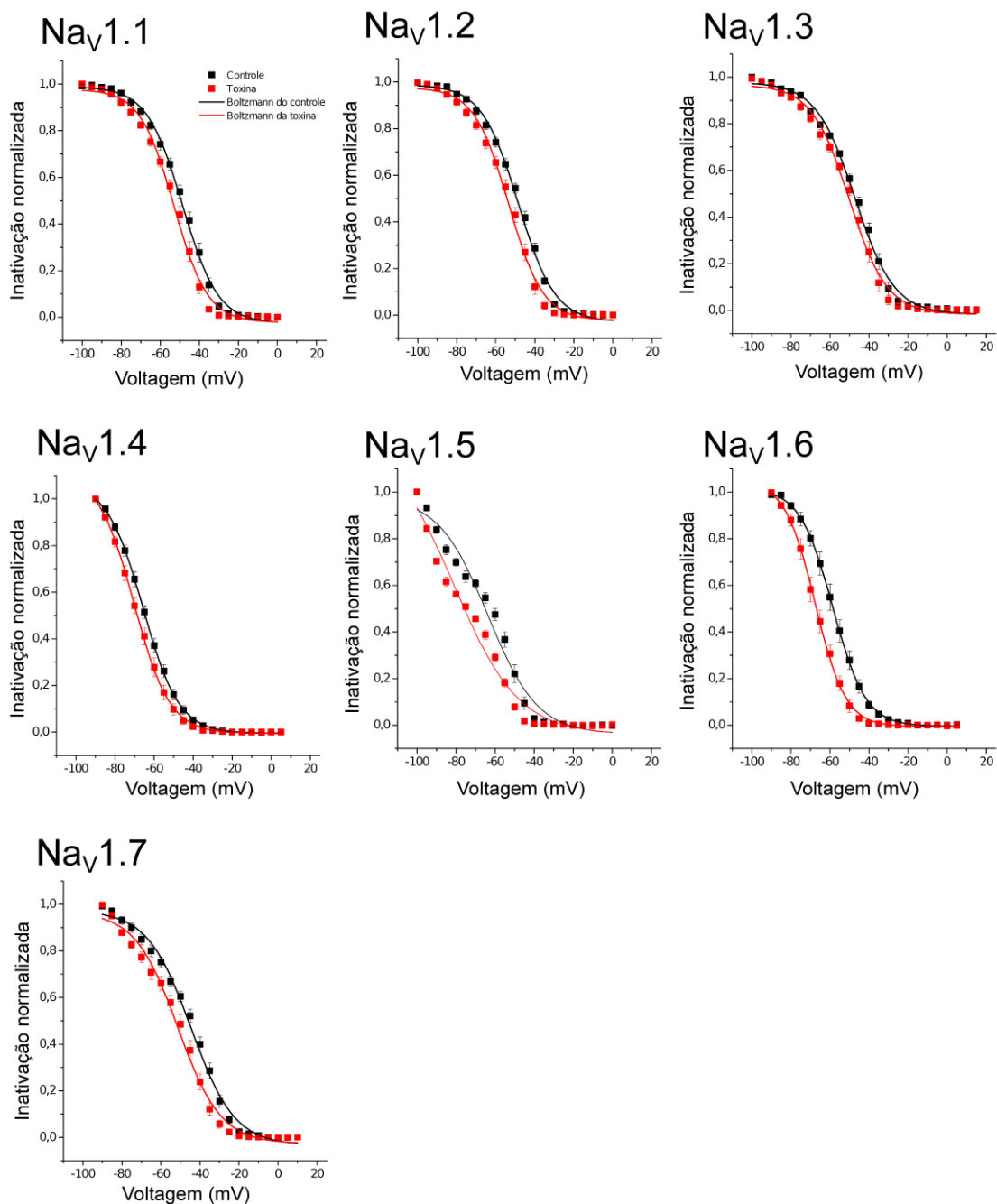


Figura 23. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de inativação dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construído a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).

Em relação à sensibilidade do canal à voltagem (Δk), nenhum subtipo tanto nas ativações, com e sem pré pulso, quanto na inativação demonstraram diferenças significativas entre controle e na presença da Ts17, com exceção do subtipo Nav1.3 na ativação com pré pulso e dos subtipos Nav1.1, Nav1.2 e Nav1.5 na inativação. Variando de -0,45 até 0,22 para ativação com pré pulso, -0,28 até 0,68 para ativação sem pré pulso e -0,53 até 3,20 para inativação (**Tabelas 6, 7, 8**).

Tabela 6. Sensibilidade à voltagem dos subtipos testados ou inclinação da reta (k) na ativação com pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)

	k Controle	k Toxina	Δk	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	3,37±0,25	3,59±0,30	0,22±0,25	7
hNav1.2	3,94±0,20	3,79±0,10	-0,14±0,17	5
hNav1.3	5,29±0,58	4,85±0,55	-0,43±0,09	6*
hNav1.4	4,18±0,68	4,00±0,55	-0,18±0,22	6
hNav1.5	4,52±0,63	4,06±0,44	-0,45±0,39	5
hNav1.6	5,04±0,46	5,01±0,47	-0,01±0,46	8
hNav1.7	6,42±0,30	6,22±0,46	-0,19±0,35	8

Tabela 7. Sensibilidade à voltagem dos subtipos testados ou inclinação da reta (k) na ativação sem pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)

	k Controle	k Toxina	Δk	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	3,46±0,29	3,67±0,23	0,22±0,21	7
hNav1.2	4,33±0,20	4,19±0,12	-0,13±0,15	5
hNav1.3	5,23±0,58	5,07±0,57	-0,15±0,06	6
hNav1.4	4,92±0,71	4,63±0,62	-0,28±0,13	7
hNav1.5	3,70±0,92	3,82±0,95	0,12±0,23	5
hNav1.6	5,55±0,51	6,23±0,42	0,68±0,41	8
hNav1.7	6,52±0,31	6,47±0,39	-0,04±0,36	8

Tabela 8. Sensibilidade à voltagem dos subtipos testados ou inclinação da reta (k) na inativação e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística (*)

	k Controle	k Toxina	Δk	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	8,64±0,21	8,22±0,25	-0,41±0,11	6*
hNav1.2	8,93±0,32	8,41±0,26	-0,51±0,12	7*
hNav1.3	9,88±0,66	9,53±0,53	-0,34±0,16	5
hNav1.4	8,99±0,28	8,71±0,32	-0,27±0,31	7
hNav1.5	11,70±0,46	14,95±0,50	3,20±0,32	5*

hNav1.6	7,85±0,26	7,31±0,58	-0,53±0,53	7
hNav1.7	10,60±0,44	10,26±0,50	-0,36±0,29	8

2.3. Recuperação da inativação lenta

Para estarem aptos a abrirem novamente, os canais de sódio necessitam de um tempo de recuperação após um estímulo, devido à necessidade de passarem do estado inativo para o fechado. Dito isso, se faz necessário avaliar o tempo de recuperação dos canais e o efeito causado pela toxina nessa recuperação, analisando o *tau* na ausência e na presença da Ts17. Todos os subtipos tiveram diferenças significativas entre controle e toxina, com exceção das isoformas Nav 1.4, Nav 1.6 e Nav1.7.

As variações foram pequenas entre o controle e na presença da toxina, demonstrando assim, baixa influência da Ts17 na recuperação dos canais de sódio, com exceção do subtipo 1.5, que obteve valor de ΔT de 26,05±3,72 ms. **(Tabela 9) (Figura 24).**

Tabela 9. Valores de tau da inativação lenta dos subtipos de Nav testados e seus respectivos erros padrões. Toxina: 100 nM. Possui diferença estatística ()*

	T Controle (ms)	T Toxina (ms)	ΔT (ms)	
	Média	Média	Média	N
hNav1.1	4,00±0,21	5,98±0,19	1,97±0,29	7*
hNav1.2	4,35±0,29	6,64±0,51	2,29±0,42	7*
hNav1.3	13,84±1,53	16,15±1,48	2,30±0,36	6*
hNav1.4	8,45±0,47	10,27±0,75	1,81±0,78	7
hNav1.5	32,36±2,66	58,41±5,00	26,05±3,72	4*
hNav1.6	8,13±1,02	11,39±2,41	3,26±1,87	8
hNav1.7	22,65±1,10	23,63±1,79	0,97±0,95	8

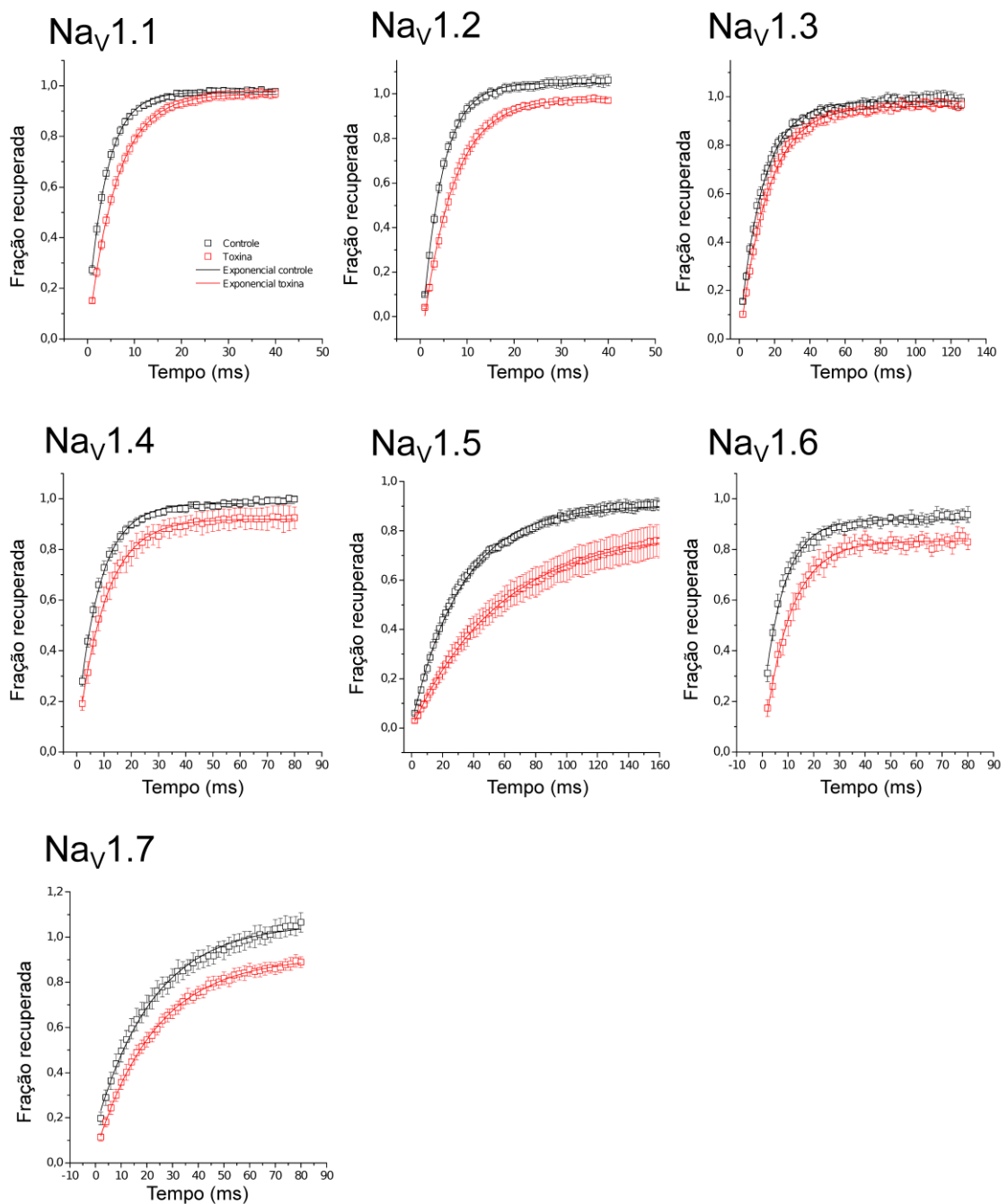


Figura 24. Gráficos da recuperação da inativação lenta dos subtipos de canais de sódio voltagem dependentes testados. Gráficos construído a partir da função de ExpDec1. Preto: controle; Vermelho: toxina (100 nM).

2.4. Inativação rápida

Devido ao alinhamento realizado previamente pôde-se inferir que a toxina teria um efeito de α -toxina, conseqüentemente, interferiria na inativação rápida dos canais de sódio voltagem dependentes, prolongando-o (**Figura 16**). Porém após os experimentos, os resultados demonstraram que a Ts17 não interfere na inativação

rápida, visto que não houve o prolongamento do potencial de ação em todos os subtipos testados, tanto na ativação com pré pulso como na sem o pré pulso (**Figuras 19 e 20**).

VI. DISCUSSÃO

Em virtude de uma porcentagem de identidade de mais de 90% com a TbTx5 e Tb3, ambas do *Tityus bahiensis*, e Ts5 do *Tityus serrulatus*, e de mais de 80% com a toxinas Tpa4 do *Tityus pachyurus* e Tst3 do *Tityus stigmurus*, indicaram uma ação de alfa toxina do peptídeo Ts17, conseqüentemente, inibindo a inativação rápida dos canais de sódio (**Figura 16**). Por exemplo, o estudo de Arantes et al. (1994) demonstraram esse efeito de prolongamento em fibras nervosas (fibras B) ocasionado pela Ts5. A ação das outras toxinas, com porcentagem alta de identidade, foram inferidas apenas por similaridade, sem estudos eletrofisiológicos comprovando o efeito de α -NaScTxS. Dito isso, a possível ação, devido ao alinhamento, se torna pouco embasada de estudos, tornando o alinhamento na busca da provável ação insatisfatória, e colocando em dúvida a classificação baseada apenas no alinhamento.

Quando alinhada com as toxinas AahII e LqhII dos escorpiões *Androctonus australis* e *Leiurus hebraeus* respectivamente, duas das alfa toxinas mais potentes para Nav de mamíferos conhecidas (CHEN; CHUNG, 2012), sua identidade foi de apenas 50,82% com ambas. Contrapondo o esperado, o efeito encontrado para a Ts17, após a caracterização eletrofisiológica, foi similar ao das β -NaScTxS com a alteração na ativação dependente de voltagem levando a um *shift* de voltagem para potenciais mais hiperpolarizados e a redução da amplitude de corrente na maioria dos subtipos, além de não demonstrar efeito alfa de inibição da inativação rápida.

A superfície de interação das α -toxinas se dá pelo domínio NC que consiste em cinco resíduos nas posições 8-12 juntamente ao C-terminal nas posições 56-64, e um domínio *core* no resíduo 18, sendo esses dois domínios interconectados por um domínio *linker* (posição 8-18). A interação das β -toxinas se dá principalmente por quatro locais: a região farmacofórica, onde existem resíduos de aminoácidos carregados negativamente e resíduos hidrofóbicos (Glu26, Leu13, Tyr22 e Ile29), sendo essa região relacionada ao sítio de ligação do receptor; uma região entre as fitas β 2 e β 3 constituído de diversos resíduos aromáticos (Tyr4, Tyr36, Trp39, Tyr43,

Tyr45, Trp50 e Trp54), a região *N-groove* e a região de resíduos específicos encontrados na região C-terminal (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Após um alinhamento entre a Ts17 e as duas alfa-toxinas referência da literatura AahII e LqhII dos escorpiões *Androctonus australis* e *Leiurus hebraeus* respectivamente, foi observado pouca identidade entre elas e a Ts17, já o alinhamento apenas entre AahII e LqhII a porcentagem de identidade foi alta. Em relação as cisteínas, todos os resíduos estão conservados, sendo essa uma característica das NaScTxs (C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7) (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). A conservação das regiões de interação de uma α -NaScTx foi baixa entre a Ts17 e a AahII e LqhII. Tendo a Ts17, o resíduo 18 do domínio *core* diferente de ambas toxinas citadas a cima e apenas os resíduos Asn11 no domínio NC, Tre57, Lys58, Gli61 e Arg62 no C-terminal foram conservados. **(Figura 25)**.



Figura 25. Alinhamento entre a Ts17 e duas das mais potentes alfa toxinas. O primeiro destaque (retângulo sem preenchimento de borda preta) indicam os domínios NC, core e linker, e seus respectivos resíduos de aminoácidos, o segundo destaque indica a região do C-terminal e seus respectivos resíduos de aminoácidos. Os números acima indicam a posição dos resíduos de aminoácidos. Quantidade de resíduos de aminoácidos (Aa) e porcentagem de identidade (%Id).

O alinhamento entre beta toxinas (Ts1, Tf2 e Tb1) e a Ts17 também foi realizado, sendo observada baixa porcentagem de identidade entre a Ts17 e o grupo de beta-toxinas. Quando comparado as regiões de interação de uma β -NaScTx, não foi observado uma região farmacofórica conservada entre a Ts17 e essas toxinas, tendo apenas o Tyr22 conservado com a Ts1 e Tb1 e Phe13 com a Tf2, além das cisteínas. Porém a região de resíduos aromáticos apresentou maior similaridade, sendo composta pelos resíduos Tyr4, Tyr36, Trp39, Tyr43, Tyr45 e as cisteínas **(Figura 26)**. A Ts1 demonstrou ação nos canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5 e Nav1.6. Alterando a cinética de ativação para potenciais mais negativos nas isoformas Nav1.2-

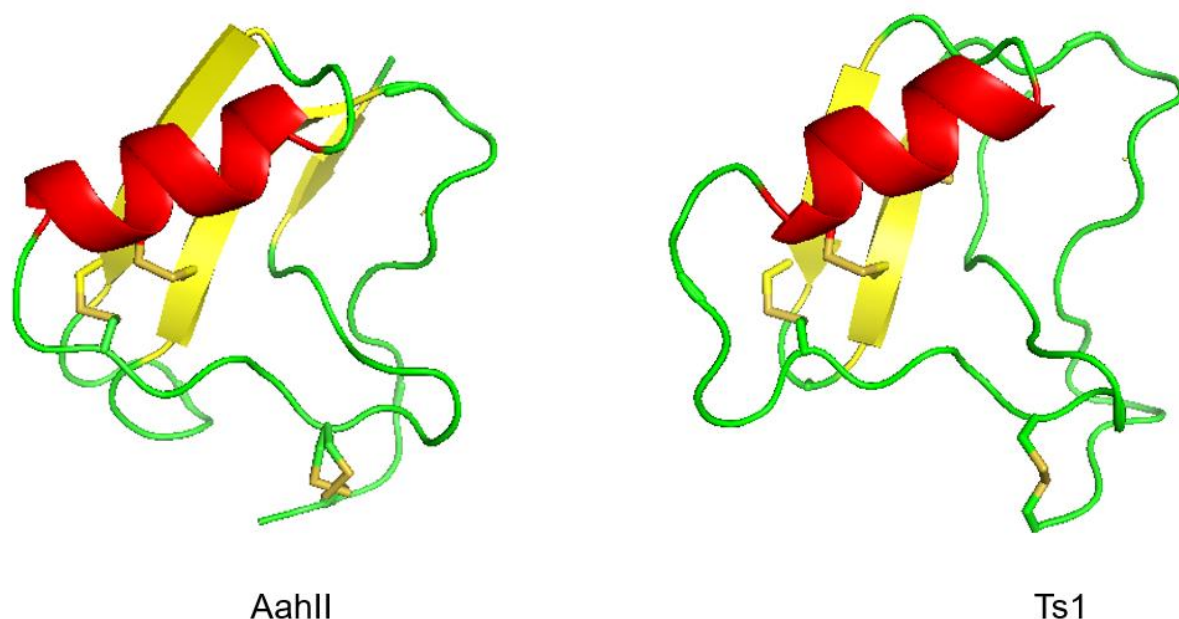


Figura 27. Representação da estrutura terciária de duas NaScTxs. Toxina AahII (α -NaScTxs) isolada do escorpião *Androctonus australis* e a Ts1 (β -NaScTxs) isolada do escorpião *Tityus serrulatus*. UniProtKB - P01484 e UniProtKB - P15226, respectivamente. PDB: 1PTX (AahII) e 1B7D (Ts1).

Estudos como Del Río-Portilla et al. (2004) já descreveram situações similares à da Ts17, sendo a toxina em questão a Cn12, peptídeo que por alinhamento possuía identidade a β -toxinas, porém, após caracterização eletrofisiológica foi observado efeito de α -toxina. Dentre as possibilidades para esse efeito não esperado, pode-se citar a necessidade de a interação toxina-canal depender da toxina inteira e a distribuição de cargas, podendo assim, outra face da estrutura molecular contribuir para esse efeito oposto ao esperado (DEL RÍO-PORTILLA et al., 2004). Demonstrando assim, a necessidade da caracterização farmacológica para confirmação do grupo pertencente e não basear a classificação do grupo (alfa ou beta) apenas pelo alinhamento, devido a possíveis não conservações de resíduos.

De acordo com Moraes et al. (2011) e Cèstele et al. (1998), a ação de algumas β -NaScTxs na ativação dos canais de sódio (*shift* de voltagem para potenciais mais negativos) são melhoradas quando precedido de um pré pulso (MORAES et al., 2011), porém os resultados obtidos com a Ts17 demonstram a independência do pré pulso visando essa melhoria na ação da toxina, sendo esse resultado semelhante aos trabalhos de Mata et al. (2018) com a toxina Tf1a (MATA et al., 2018) e Duque et al. (2017) com a To4 (DUQUE et al., 2017). Porém, para algumas toxinas, a falta de um

pré pulso enfraquece a potencialização de sua ação, como por exemplo para a toxina Tz1 do *Tityus zulianus* (LEIPOLD et al., 2006).

Baseando-se em Campos et al. (2007), a alteração da probabilidade de abertura na ativação e inativação, além da diminuição da macrocorrentes são devido ao aprisionamento do sensor de voltagem do domínio II no estado ativado, além de uma influência nos outros sensores de voltagem ajudando-os no deslocamento para a porção extracelular, visto que o canal tende a se reorganizar visando o equilíbrio, deixando o canal em um estado pré ativado, conseqüentemente, propiciando a abertura dos canais precocemente.

No modo *whole-cell* as correntes de sódio são mensuradas levando em conta todos os canais contidos na célula, sendo assim, mensura-se as macrocorrentes de sódio. Um dos possíveis efeitos da beta toxina é a redução da amplitude dessa macrocorrente. Quando a beta toxina aprisiona o sensor de voltagem na porção extracelular, além de tornar os canais pré ativos, também pode ocasionar a passagem de alguns canais do estado fechado diretamente para o estado inativo, sendo assim, quando mensurado as macrocorrentes na presença da toxina, pode-se observar, além do *shift* de voltagem, uma redução de amplitude de corrente (CÊSTELE et al., 1998).

A especificidade de cada subtipo de canal neuronal está compreendida no *loop* SS2 (C-terminal) do domínio III, sendo esse local importante para interação das toxinas com o canal de sódio. Compreendendo assim, dois sítios importantes, o já mencionado sitio de interação com o sensor de voltagem típico das beta toxinas, o domínio II; e o *loop* SS2, gerando especificidade ao canal, no domínio III. Tendo a toxina interação com os dois sítios simultaneamente. Dito isso, a variação de efeito da ação da Ts17 em cada subtipo pode ser explicada devido à diferença na sequência de cada isoforma nesse *loop* SS2, modificando a interação toxina-canal ligeiramente, afetando assim, o grau de toxicidade em cada subtipo (LEIPOLD et al., 2006).

VII. CONCLUSÃO

O objetivo do trabalho era a identificação e purificação de uma nova toxina (Ts17) isolada do escorpião *Tityus serrulatus*, o escorpião amarelo, e sua posterior caracterização eletrofisiológica em sete subtipos de canais de sódio voltagem dependentes (Nav1.1-Nav1.7), sendo esses objetivos concluídos. Não foram

observadas diferenças entre os protocolos com e sem pré pulso. A toxina foi capaz de alterar a probabilidade de abertura dos canais de sódio, sendo que no subtipo Nav1.2 foi observado o maior *shift* de voltagem para a ativação com e sem pré pulso, e no subtipo Nav1.5 para a inativação. Não foram observadas diferenças significativas entre controle e após aplicação da toxina na sensibilidade a voltagem, com exceção para os subtipos Nav1.3 (ativação) e Nav1.1, Nav1.2 e Nav1.5 (Inativação). Para a recuperação da inativação lenta do canal, apenas os subtipos Nav1.4, Nav1.6 e Nav1.7 não tiveram diferenças significativas entre controle e aplicação da toxina. Por fim, a Ts17 não mostrou efeito na inativação rápida do canal. Dito isso, pode-se concluir que o peptídeo Ts17 pertence ao grupo da β -NaScTx.

O trabalho caracterizou tanto estruturalmente quanto funcionalmente uma nova toxina, podendo assim, corroborar para estudos relacionados a interação toxina-canal, além de agregar conhecimento a área da toxinologia e corroborar com pesquisas visando potenciais biotecnológicos, como a busca de fármacos.

VIII.PERSPECTIVAS

- Realizar o sequenciamento completo da toxina;
- Realizar experimentos de dicroísmo circular;
- Realizar experimentos com os subtipos de canais de sódio (mamífero) restantes – Nav1.8 e Nav1.9;
- Realizar experimentos em outros canais de sódio como de aracnídeo, inseto e bactéria;
- Analisar outros parâmetros eletrofisiológicos como a constante de dissociação da toxina nos canais de sódio voltagem dependentes.

IX. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTTALEB, Y. et al. A common “hot spot” confers hERG blockade activity to α -scorpion toxins affecting K⁺channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 805–815, 2008.

AHERN, C. A. et al. The hitchhiker ’ s guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. **The Journal of general physiology**, p. 1–24, 2016.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.

ALVARENGA, E. R. et al. Transcriptome analysis of the Tityus serrulatus scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 02, n. 04, p. 210–220, 2012.

ARANTES, E. C. et al. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from tityus serrulatus scorpion venom which delays the inactivation of Na^+ channels. **BBA - General Subjects**, v. 1199, n. 1, p. 69–75, 1994.

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

BATISTA, C. V. F. et al. Scorpion toxins from Tityus cambridgei that affect Na^+ channels. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 557–562, 2002.

BATISTA, C. V. F. et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion Tityus cambridgei and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 803, n. 1, p. 55–66, 2004.

BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion Tityus stigmurus: Biochemical and physiological comparison with other Tityus species. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 147–157, 2007.

BECERRIL, B. et al. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions Tityus bahiensis and Tityus stigmurus. **The Biochemical journal**, v. 313 (Pt 3, n. 1996, p. 753–60, 1996.

BENVENUTI, L. A.; DOUETTS, K. V.; CARDOSO, J. L. Myocardial necrosis after envenomation by the scorpion Tityus serrulatus. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 275–276, 2002.

BEZANILLA, F. Ion Channels: From Conductance to Structure. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 456–468, 2008.

BILLEN, B.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Animal peptides targeting voltage-activated

sodium channels. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 24, p. 2492–2502, 2008.

BORDON, K. D. C. F.; COLOGNA, C. T.; ARANTES, E. C. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*. **Toxinology**, p. 1–25, 2014.

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

BORTOLUZZI, L. R.; QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil Luis. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 357–359, 2007.

BOSMANS, F. Four Novel Tarantula Toxins as Selective Modulators of Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 419–429, 2005.

BOSMANS, F.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F.; SWARTZ, K. J. Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 202–208, 2008.

BOSMANS, F.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; TYTGAT, J. Differential effects of five “classical” scorpion β -toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 218, n. 1, p. 45–51, 2007.

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

BRAZIL, T. K. et al. ESCORPIÕES : BIOLOGIA E ACIDENTES. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 1931, n. 91, p. 1–7, 2010.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. Os escorpiões. In: 1ª Edição ed. Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Campus de Ondina, 40170-115, Salvador-BA, Brasil: EDUFBA, 2010. p. 47–63.

BUCARETCHI, F. et al. A comparative study of severe scorpion envenomation in

children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* Estudo comparativo do envenenamento escorpionic grave em crianças provocado por *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 331–336, 1995.

CAHALAN, M.; NEHER, E. Patch clamp techniques: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 207, n. 1969, p. 3–14, 1992.

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

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

CAMPOS, F. V.; CORONAS, F. I. V.; BEIRÃO, P. S. L. Voltage-dependent displacement of the scorpion toxin Ts3 from sodium channels and its implication on the control of inactivation. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 7, p. 1115–1122, 2004.

CAMPOS, F. V et al. Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. **The Journal of general physiology**, v. 132, n. 2, p. 251–63, 2008.

CANTÚ, M. D. et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.

CAO, Z. et al. Overview of Scorpion Species from China and Their Toxins. **Toxins**, p. 796–815, 2014.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124–141, 2007.

CATTERALL, W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. **Neuron**, v. 67, p. 915–928, 2010.

CATTERALL, W. A. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms : The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron**, v. 26, p. 13–25, 2000.

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

CERNI, F. A. et al. Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K⁺ channel toxins isolated through an improved Tityus serrulatus venom purification procedure. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 892–913, 2014.

CERNI, F. A. et al. Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from Tityus serrulatus venom. **Peptides**, v. 80, p. 9–17, 2016.

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

CESTÈLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 883–892, 2000.

CHEN, R.; CHUNG, S. H. Binding modes and functional surface of anti-mammalian scorpion α -toxins to sodium channels. **Biochemistry**, v. 51, n. 39, p. 7775–7782, 2012.

CHEN, Y. et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2012.

CLARE, J. J. et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 11, p. 506–520, 2000.

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

COLOGNA, C. et al. Tityus serrulatus Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 920–932, 2009.

COLOGNA, C. T. et al. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 54–61, 2011.

COLOGNA, C. T. et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. **FEBS Journal**, v. 279, n. 8, p. 1495–1504, 2012.

CONCEIÇÃO, I. M. et al. Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 4, p. 519–527, 2005.

CREMONEZ, C. M. et al. Structural and Functional Elucidation of Peptide Ts11 Shows Evidence of a Novel Subfamily of Scorpion Venom Toxins. **Toxins**, v. 8, n. 288, p. 1–14, 2016.

CRUTTENDEN, K. et al. Reproductive toxic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 497–503, 2008.

CRUZ, E. F. S. et al. PROGRAMA DE CONTROLE DE SURTO DE ESCORPIÃO *TITYUS SERRULATUS*, LUTZ E MELLO 1922, NO MUNICÍPIO DE APARECIDA, SP (SCORPIONES, BUTHIDAE). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 2, p. 123–128, 1995.

DE AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, n. 2–4, p. 480–489, 2003.

DEL RÍO-PORTILLA, F. et al. NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* with a typical β -toxin sequence but with α -like physiological activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 12, p. 2504–2516, 2004.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: Genes, peptides and function. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 273–283, 2005.

DUQUE, H. M. et al. To4, the first *Tityus obscurus* β -toxin fully electrophysiologically characterized on human sodium channel isoforms. **Peptides**, v. 95, p. 106–115, 2017.

EIJKELKAMP, N. et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. **Brain**, v. 135, n. 9, p. 2585–2612, 2012.

ENGLAND, S.; DE GROOT, M. J. Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 6, p. 1413–1425, 2009.

ESTACION, M. et al. NaV1.7 Gain-of-Function Mutations as a Continuum: A1632E Displays Physiological Changes Associated with Erythromelalgia and Paroxysmal Extreme Pain Disorder Mutations and Produces Symptoms of Both Disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 43, p. 11079–11088, 2008.

FANG, X. et al. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7425–7433, 2002.

FERNANDES, J. R. C.; BLEICHER, L.; BEIRÃO, P. S. L. Closed- and open-state models of human skeletal muscle sodium channel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 506, n. 4, p. 826–832, 2018.

FERREIRA L. A. F.; Alves EW, Henriques OB. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from Tityus serrulatus scorpion venom. *Toxicon*. 1993;31(8):941–7.

FIALHO, E. M. S. et al. Immune cells recruitment and activation by Tityus serrulatus scorpion venom. **Toxicon**, v. 58, p. 480–485, 2011.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A.; AMARAL, C. F. S. APPROACHES TO THE TREATMENT OF SCORPION ENVENOMING. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1009–1014, 1994.

GOLDIN, A. L. et al. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365–368, 2000.

GOLDIN, A. L. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 575–584, 2002.

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

GONÇALVES, A. A. et al. Participation of Na⁺channels in the potentiation by Tityus serrulatus α-toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet β-cells. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1039–1045, 2003.

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

GORDON, D. et al. An “Old World” scorpion β-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels: A possible link towards diversification of β-toxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 12, p. 2663–2670, 2003.

GUERRERO-VARGAS, J. A. et al. Identification and phylogenetic analysis of Tityus pachyurus and Tityus obscurus novel putative Na⁺ - channel scorpion toxins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30478, jan. 2012.

HABBOU, K. et al. A recessive Nav1.4 mutation underlies congenital myasthenic syndrome with periodic paralysis. **Neurology**, v. 86, n. 2, p. 161–169, 2015.

HADDAD JUNIOR, V. et al. Venomous and poisonous arthropods: Identification, clinical manifestations of envenomation, and treatments used in human injuries. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 650–657, 2015.

HMED, B.; SERRIA, H. T.; MOUNIR, Z. K. Scorpion peptides: potential use for new drug development. **Journal of toxicology**, v. 2013, p. 958797, 2013.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 117, n. 1–2, p. 500–544, 1952.

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

HÜBNER, C. A.; JENTSCH, T. J. Ion channel diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 20, p. 2435–2445, 2002.

JENTSCH, T. J.; HÜBNER, C. A.; FUHRMANN, J. C. Ion channels : Function unravelled by dysfunction. **Nature cell biology**, v. 6, n. 11, p. 1039–1047, 2004.

KOTVISKI, B. M.; BARBOLA, I. DE F. Aspectos espaciais do escorpionismo em Ponta Grossa , Paraná , Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 9, p. 1843–1858, 2013.

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

LENAEUS, M. J. et al. Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1–10, 2017.

LIMA, P. C. et al. Partial purification and functional characterization of Ts19 Frag-I, a novel toxin from Tityus serrulatus scorpion venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2015.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; BRAZIL, T. K. Envenenamento por Tityus stigmurus (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 239–245, 2000.

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

LOURENÇO, W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. DISCOVERY OF A SEXUAL POPULATION OF TITYUS SERRULATUS , ONE OF THE MORPHS WITHIN THE COMPLEX TITYUS STIGMURUS (SCORPIONES , BUTHIDAE). **The Journal of Arachnology**, v. 27, p. 154–158, 1999.

MARCUSSI, S. et al. **Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de sua toxinas**. [s.l.] 1.ed. Ribeirão Preto, SP - FUNPEC Editora, 2011, 2011.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an α -toxin from the venom of the South American scorpion Tityus serrulatus. **FEBS Letters**, v. 342, n. 2, p. 181–184, 1994.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus (Lutz and Mello, 1922). **Toxicon**, v. 119, p. 253–265, 2016.

MATA, D. O. DA et al. Subtype Specificity of β -Toxin Tf1a from *Tityus fasciolatus* in Voltage Gated Sodium Channels. **Toxins**, v. 10, n. 339, p. 1–17, 2018.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 1, p. 69–85, 2007.

MORAES, E. R. et al. Differential Effects of *Tityus bahiensis* Scorpion Venom on Tetrodotoxin-Sensitive and Tetrodotoxin-Resistant Sodium Currents. **Neurotox Res**, v. 19, p. 102–114, 2011.

NAMADURAI, S. et al. Crystal Structure and Molecular Imaging of the Nav Channel Beta-3 Subunit Indicates a Trimeric Assembly. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 15, p. 10797–10811, 2014.

NAMADURAI, S. et al. A new look at sodium channel Beta subunits. **Open Biology**, v. 5, n. 1, p. 140192–140192, 2015.

NEHER, E.; SAKMANN, B.; STEINBACH, J. H. The Extracellular Patch Clamp: A Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes. **European Journal of Physiology**, v. 375, p. 219–228, 1978.

NENCIONI, A. L. A. et al. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 3, p. 1–11, 2018.

OLIVEIRA, F. N. et al. Another record of significant regional variation in toxicity of *Tityus serrulatus* venom in Brazil: A step towards understanding the possible role of sodium channel modulators. **Toxicon**, v. 73, p. 33–46, 2013.

PAYANDEH, J. et al. The Crystal Structure of a Voltage-Gated Sodium Channel. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 353–358, 2012.

PEIGNEUR, S. et al. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on NaV-type isoforms. **Neuropharmacology**, v. 95, p. 269–277, 2015.

PIMENTA, A. M. C. et al. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **rapid**

communications in mass spectrometry, v. 15, p. 1562–1572, 2001.

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

PUCCA, M. B. et al. Experimental Tityus serrulatus scorpion envenomation : age- and sex- related differences in symptoms and mortality in mice. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 325–332, 2011.

PUCCA, M. B. et al. Serrumab: A human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of Tityus serrulatus venom. **Journal of Immunotoxicology**, v. 9, n. 2, p. 173–183, 2012.

PUCCA, M. B. et al. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in Tityus serrulatus scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, n. 1, p. 326–336, 2014.

PUCCA, M. B. et al. Toxicon Tityus serrulatus venom e A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272–284, 2015a.

PUCCA, M. B. et al. Revealing the function and the structural model of Ts4: Insights into the “non-toxic” toxin from tityus serrulatus venom. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2534–2550, 2015b.

PUCCA, M. B. et al. Electrophysiological characterization of the first Tityus serrulatus alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8–16, 2015c.

PUCCA, M. B. et al. Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception in vivo. **Toxicon**, v. 119, p. 244–252, 2016.

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

RATES, B. et al. Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 611–618, 2008.

REGINA MARTINS SOARES, M.; SCHETINI DE AZEVEDO, C.; DE MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo Scorpionism in Belo Horizonte, MG: a retrospective study. **Medicina Tropical**, v. 35, n. 49, p. 359–363, 2002.

RIVAS, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; ANDREU, D. Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: Lessons from parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1570–1581, 2009.

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

SCHWARTZ, E. F. et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). **BMC Genomics**, v. 8, p. 119–128, 2007.

SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 45, p. 1–8, 2017.

SHAKKOTTAI, V. G. et al. Design and Characterization of a Highly Selective Peptide Inhibitor of the Small Conductance Calcium-activated K⁺ Channel, SkCa2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 43145–43151, 2001.

SHIELDS, S. D. et al. Nav1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system. **Pain**, v. 153, p. 2017–2030, 2012.

SILVA, S. T. DA et al. **Escorpiões, Aranhas e Serpentes: aspectos gerais e espécies de interesse médico no Estado de Alagoas**. [s.l.] Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2005.

SILVA, T. M. A. S. DA et al. EPIDEMIOLOGY OF ACCIDENTS FOR SCORPIONS IN CEARÁ, BRAZIL, IN THE PERIOD 2009 TO 2012. **Revista Saúde.com**, v. 11, n. 3, p. 314–323, 2015.

SOARES, M. R. M.; SCHETINI DE AZEVEDO, C.; DE MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo Scorpionism in Belo Horizonte, MG: a retrospective study. **Medicina Tropical**, v. 35, n. 49, p. 359–363, 2002.

SOKOLOV, S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 76–78, 2007.

TFELT-HANSEN, J. et al. Inherited cardiac diseases caused by mutations in the nav1.5 sodium channel. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 21, n. 1, p. 107–115, 2010.

TORRES, J. B. et al. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul An accident involving *Tityus serrulatus* and its epidemiological implications in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 631–633, 2002.

TSAI, C. et al. Two Alternative Conformations of a Voltage-Gated Sodium Channel. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 4074–4088, 2013.

VASCONCELOS, F. et al. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 385–392, 2004.

VASCONCELOS, F. et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 85–92, 2005.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome biology**, v. 4, n. 3, p. 207, 2003.

YUAN, R. et al. Two Novel SCN9A Gene Heterozygous Mutations May Cause Partial Deletion of Pain Perception. **Pain Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1510–1514, 2011.

ZENG, X.-C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB life**, v. 57, n. 1, p. 13–21, 2005.

ZHANG, D. Patch Clamp: A Powerful Technique for Studying the Mechanism of Acupuncture. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2012, p. 7, 2012.

ZHANG, X. et al. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 130–135, 2012.

ZOCCAL, K. F. et al. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 2013.