



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ciências Fisiológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DUAS TOXINAS ISOLADAS DA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *TITYUS MATTOGROSSENSIS* (BORELLI, 1901)**

Natiela Beatriz de Oliveira

Orientador: Dr. Carlos Alberto Schwartz

Co-orientador: Dr. Osmino R. Pires Júnior

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Biologia Animal
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Animal



Toxinologia·UnB

Brasília, 2012.



Dissertação de Mestrado

Natiela Beatriz de Oliveira

Título:

“Caracterização parcial de duas toxinas isoladas da peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis* Borelli, 1901.”

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz
Presidente / Orientador
UnB

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UFMG

Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UFMG

Profa. Dra. Márcia Renata Mortari
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 15 de fevereiro de 2012.

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo Da Vinci

Dedicatória:

Dedico esse trabalho a minha rainha, heroína e mãe, Nadir. Ao meu maravilhoso e carinhoso pai, Marino. Aos meus irmãos Marino, Mônica e Marina. E dedico também aos amores da minha vida Maylon, Jimmy, Pirata, Sofia, Meg, Joey e Chandler.

Agradecimentos

É muito difícil agradecer porque tenho medo de esquecer alguém que não deixa de ser muito importante para mim. Mas, ao mesmo tempo, é muito fácil agradecer, porque tenho muitas pessoas boas ao meu lado e posso falar delas com muitas linhas de gratidão.

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado me mostrando o caminho que devo seguir.

Agradeço imensamente minha linda mãe Nadir Hilger, por ter me dado todo o carinho, compreensão, amizade, companheirismo, cumplicidade, dedicação e apoio. Além de ser esse exemplo de uma grande mulher.

À minha família, ao meu pai Marino, pelas conversas e motivação. Aos meus irmãos, Marino Jr., Mônica e Marina, por me aguentarem nos dias de estresse e desânimo.

Agradeço ao Diego Henrique pela companhia nas longas noites de HPLC e pelo companheirismo, incentivo e dedicação que teve por mim.

Agradeço aos meus grandes e maravilhosos amigos Thalita Soares, Édelyn Cristina, Janaína Starling, Caroline Barbosa e Jimmy Guerrero pela amizade que criamos. E por todo o apoio que vocês me deram nesses últimos anos. Sempre presentes e dispostos a ajudar com um grande sorriso no rosto e me fazendo sorrir também.

Aos meus grandes amigos e amigas do laboratório Fagner, Rafael, Osmino, Andréa, Solange, Jéssica, Harry, Cláudia, Rosa e César por tornarem os dias de bancada mais divertidos.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz e ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior pela orientação, apoio e paciência que tiveram comigo. Agradeço ao Rafael

Melani pelas conversas, opiniões e conselhos para o projeto. Além de estar presente em todas as coletas.

Agradeço aos meus anjos da guarda Éder Alves Barbosa e Anita Oliveira Silva por me ajudarem imensamente e de coração aberto. Vocês permitiram que os resultados desse trabalho fossem além do esperado.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Bloch por me permitir o acesso ao Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa-Cenargen. E me ajudar no direcionamento das sequências obtidas. E agradeço a todos do Laboratório de Espectrometria de Massa que me receberam e aguentaram todo o tempo que estive lá, em especial ao Eduardo Fernandes pelo carinho e pelas nossas conversas musicais e, também, a Prof. Dra. Maura Vianna Prates.

Agradeço, novamente, ao Éder pelas nossas conversas, dedicação, dias divertidos que tivemos e por ter um coração maravilhoso, solidário e bondoso que atualmente é difícil de encontrar. Só tenho a dizer a você, Muito Obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão por abrir as portas do Laboratório de Membranas Excitáveis da Universidade Federal de Minas Gerais a mim e por dedicar o seu tempo precioso para tirar minhas dúvidas e me orientar nesse trabalho. Também o considero como um anjo na minha vida.

Agradeço imensamente a todos do Laboratório de Membranas Excitáveis da Universidade Federal de Minas Gerais pela hospitalidade e festinhas que fizemos. Em especial a Anita que, mesmo com muitas coisas para fazer, dedicou o seu tempo a mim sempre com o sorriso no rosto, carinho e por ter me incluído na sua corrente do bem. A Daiana que estava sempre presente me ensinando e aprendendo junto comigo. E a Natália Fontana por me ensinar toda a parte de eletrofisiologia em células de baratas.

Agradeço a Fazenda Jatobá pela hospitalidade e estadia. Ao Dr. André Mendonça e Adriana Bocchiglieri por ajudar nas coletas dos escorpiões. E ao grande amigo Fagner Neves pela ajuda nas longas tardes de extração de peçonha, com muitas conversas divertidas e positivas.

Agradeço enormemente aos meus irmãos de coração Mariana Aquino, Daniel Ferreira, Mariana Gomes, Tomás Macedo, João Alberto e Paulo Alexandre por todo o apoio, incentivo e por estarem do meu lado nos momentos de alegria e tristeza. Agradeço também ao Thiago Kanashiro por me acalmar nos momentos de tensão pré-banca.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo fornecida e ao Cnpq pelo financiamento do projeto.

Por fim, agradeço a todos que passaram na minha vida e deixaram algo de bom!

Índice Geral

1.	Introdução.....	1
1.1	Os Escorpiões	1
1.2	Canais iônicos.....	5
2.	justificativa	20
3.	Objetivos.....	21
3.1	Objetivo Geral.....	21
3.2	Objetivos específicos	21
4.	Material e métodos.....	22
4.1	Coleta:.....	22
4.2	Extração e quantificação da peçonha:.....	22
4.3	Fracionamento em Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):.....	22
4.4	Espectrometria de Massa:	23
4.5	Sequenciamento:.....	24
4.6	Ensaio eletrofisiológicos:.....	25
5.	Resultados.....	38
5.1	Fração 2	41
5.2	Fração 5	43
5.3	Fração 6	51

6.	Discussão.....	59
7.	Conclusão	65
8.	Referencias bibliográficas.....	67

Lista de Figuras

- Figura 1** Foto representativa de um espécime de *Tityus mattogrossensis* (Foto: Natiela Beatriz de Oliveira)..... 5
- Figura 2** Representação esquemática da subunidade α de um canal de K^+ dependente de voltagem mostrando os seis segmentos transmembrana (S1-S6), sendo o segmento S4 a região que contém o sensor de voltagem do canal (MILLER, 2000).
..... 7
- Figura 3** Representação esquemática das subunidades α_1 (com os quatro domínios – I a IV), β , α_2 , δ e γ do canal Ca_v de músculo esquelético. O segmento 4, em verde, identifica a região sensível à voltagem (modificado de: CATTERALL *et al.*, 2005).
..... 11
- Figura 4** Desenho esquemático da subunidade α do canal para Na^+ dependente de voltagem. (I-IV) indicam os quatro domínios homólogos e os números de 1-6 mostram os seis segmentos transmembrana de cada domínio. Os segmentos 4 de cada domínio (em amarelo) destacam as regiões carregadas do canal, e em verde os segmentos 5 e 6 que formam o poro (Adaptado de: YU & CATTERALL, 2003).
..... 13
- Figura 5** Desenho esquemático dos sítios de ligação para as neurotoxinas nos canais para Na^+ dependentes de voltagem. Os sítios de ação das neurotoxinas estão ilustrados em cores diferentes (Modificado de: CATTERALL *et al.*, 2007). 16
- Figura 6** Modelo esquemático do ensaio eletrofisiológico (“sucrose-gap”) com nervo ciático isolado da rã *L. catesbeianus*. O nervo foi colocado na canaleta da cubeta (D) que percorre as cinco câmaras, que foram isoladas com selos de vaselina. A estimulação é feita nas câmaras 1 e 2 e registrada nas câmaras 3 e 5. A câmara 4 está preenchida por solução de sacarose 216 mM. As amostras são aplicadas na

câmara 3 que possui sistema de perfusão podendo ser constantemente lavada, assim como a câmara 4 (Retirado de: FERNANDES, 2010).....	27
Figura 7 Desenho esquemático do sistema de “Patch Clamp” (A) configuração “Whole Cell”; (B) “set up” para os registros eletrofisiológicos (retirado de: WILLIAM, 2003).	28
Figura 8 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula HEK. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.....	31
Figura 9 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula HEK com pulso despolarizante de +50 mV antes do pulso teste. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.	31
Figura 10 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula DRG. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.....	34
Figura 11 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula DUM. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.....	37
Figura 12 Efeito da peçonha bruta de <i>T. mattogrossensis</i> (0,264 mg) sobre o potencial de ação composto do nervo ciático de rã, na técnica de “Single Sucrose-Gap”. (C) Controle; (PB) Redução do potencial após 1 minuto da aplicação da peçonha bruta; (PL) após 8 minutos de lavagem, mostrando que a ação é irreversível (n=1).	38
Figura 13 – Cromatografia preliminar da peçonha bruta de 1 mg <i>T. mattogrossensis</i> com o gradiente de acetonitrila crescente até 100%. O perfil mostra a eluição das frações com até 70 min.....	39
Figura 14 Cromatograma da peçonha bruta (0,6 mg) de <i>Tityus mattogrossensis</i> . São indicadas as 7 frações cromatográficas mais abundantes usadas nesse trabalho. As corridas foram realizadas em coluna analítica C18 Phenomenex Sinergi Hidro	

(4,60 x 250 mm) e as frações detectadas a 216 nm, com fluxo de 1 ml/min e gradiente de acetonitrila de acordo com a metodologia descrita no texto (linha pontilhada).....	40
Figura 15 Ensaio eletrofisiológico de “Single Sucrose-Gap” mostra o potencial de ação composto de nervo ciático de rã. (C) Controle; (F2) atividade da fração 2 de <i>T. matogrossensis</i> após 40 min da aplicação da fração. O teste mostra um retardo na repolarização do potencial de ação composto, atividade característica de α -NaScTx, essa atividade não foi reversível após a lavagem.....	42
Figura 16 Recromatografia da fração 2 mostrando dos picos abundantes, sub-fração A e B (CLAE-FR coluna analítica C18 Phenomenex Luna 4,60 x 150 mm, 3 micron, leitura a 216 nm). O gradiente de acetonitrila está indicado com a linha pontilhada.....	42
Figura 17 Análise eletrofisiológica da fração cromatográfica 5 (54 μ M) em “Sucrose-Gap” em nervo de rã, após 40 min de aplicação da fração. Mostra a uma redução de 40% do potencial de ação composto. (C) Controle; (F5) Atividade após a aplicação da Fração 5.	43
Figura 18 (A) Recromatografia da fração 5 e (B) um novo passo de recromatografia da F5 em CLAE-FR coluna analítica Luna, leitura a 216 nm, fluxo de 1 ml/min, com gradiente otimizado de acetonitrila (linha pontilhada).	44
Figura 19 Espectro de massa linear positivo em Maldi/TOF da F5, mostrando o grau de pureza relativo e a massa média do peptídeo.	44
Figura 20 Sequenciamento “de novo” da fração 5 pura da peçonha de <i>T. matogrossensis</i> por MALDI/Tof com fragmentação na fonte (ISD); matriz DAN. Foram obtidos 8 resíduos de aminoácidos na série C.....	45

- Figura 21** Alinhamento da sequência parcial de F5 com as sequências de alta identidade de outras toxinas escorpiônicas já conhecidas. Os resíduos de aminoácidos em destaque mostram a alta conservação do padrão de cisteínas.....46
- Figura 22** Teste representativo de “patch clamp” em modo “whole-cell” em célula HEK Nav 1.3, com 1 μ M de F5 (n=1). (A) Atividade da toxina F5 (vermelho) em relação ao controle (preto), mostra uma redução de 71,5% da corrente; (B) Porcentagem de inibição da corrente de acordo com o tempo quando adicionada a toxina F5 (vermelho).....48
- Figura 23** Teste representativo de “patch clamp” no modo “whole-cell” com 1 μ M de F5 em células HEK Nav 1.6. Gráfico representativo da atividade da toxina F5 de $63,3\pm 7\%$ (n=3) de redução da corrente de sódio de canais Nav 1.6.49
- Figura 24** Registro representativo da atividade da toxina F5 (1 μ M) de redução da corrente de sódio em $35\pm 4,1\%$ (n=5). Teste eletrofisiológico de “patch clamp” no modo “whole-cell” sobre células dissociadas do gânglio do cordão abdominal (DUM) da barata *Periplaneta americana*.49
- Figura 25** Resultado representativo de “patch clamp” em modo “whole-cell” realizado em células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). (A) Gráfico representativo da atividade, $13,2\pm 7\%$ (n=2), da toxina F5 sobre a corrente de sódio de células DRG; (B) Gráfico de curso temporal que mostra a atividade da toxina F5 sobre a porcentagem de corrente de acordo com o tempo, a linha vermelha indica o momento da perfusão da toxina.50
- Figura 26** Registro representativo da análise eletrofisiológica da fração 6 (não quantificada) em “Sucrose-Gap” em nervo de rã, após 40 min de aplicação da fração. Mostra a uma redução de 62,5% do potencial de ação composto.51

- Figura 27** Segundo passo de Recromatografia da fração 6 da peçonha de *T. mattogrossensis*. Esta apresenta uma fração mais abundante, CLAE-FR coluna analítica Luna, leitura a 216 nm, fluxo de 1 ml/min . Com gradiente otimizado de acetonitrila (linha pontilhada).52
- Figura 28** Espectro de massa linear positivo em Maldi/TOF de F6, mostrando o grau de pureza e a massa média do peptídeo.52
- Figura 29** Sequenciamento da F6 por Maldi-TOF com fragmentação na fonte (ISD). Foram obtidos 37 resíduos de aminoácidos.53
- Figura 30** Alinhamento da sequência de F6 com as sequências de alta identidade de outras toxinas escorpiônicas já conhecidas no banco de dados. Com o intuito de mostrar a alta conservação do padrão dos resíduos de cisteínas, esses foram destacados em cinza.54
- Figura 31** Teste eletrofisiológico de “patch clamp” em modo “whole-cell” em célula HEK Nav 1.3 da toxina F6 (1 μ M). (A) Célula representativa da atividade da toxina F6 sobre a corrente de sódio de canais Nav 1.3. Mostra uma redução da corrente quando aplicada a toxina (vermelho) em relação ao controle (preto). Em azul, mostra a lavagem parcial da toxina. A F6 foi novamente perfundida (verde) e lavada (cinza); (B) Porcentagem de corrente de acordo com o tempo de registro. Os traços em vermelho indicam os momentos de perfusão do toxina, que mostrou uma atividade de redução de $35,81 \pm 10,2\%$ (n=5).56
- Figura 32** Teste eletrofisiológico em “patch clamp” no modo “whole-cell” em célula HEK Nav 1.3 da toxina F6 (1 μ M) no protocolo com pulso despolarizante de +50 mV por 1 ms. (A) Registro de corrente de sócio, em preto está a corrente controle, em vermelho a atividade de $95,15 \pm 3,65\%$ (n=2) da toxina F6 e azul a lavagem parcial

da toxina; (B) Porcentagem de corrente em relação ao tempo de registro. A linha vermelha mostra o momento da perfusão de F6.....57

Figura 33 Resultado representativo de “patch clamp” em modo “whole-cell” realizado em células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). (A) Gráfico representativo da atividade, 25% (n=1), da toxina F6 (1 μ M) sobre a corrente total de sódio de células DRG; (B) Porcentagem de corrente de acordo com o tempo, a linha vermelha indica o momento da perfusão da toxina F6.....58

Figura 34 Alinhamento de sequências de β -NaScTx mostrando as regiões de folhas- β e α -hélice como estrutura secundária. As quatro pontes dissulfeto são indicadas com as ligações das cisteínas destacadas (Fonte: COHEN *et al.*, 2005 apud VARGAS, 2012)61

Figura 35 Alinhamento entre as β -NaScTx de *C. noxius* e *T. serrulatus* já descritas com relação as toxinas F5 e F6 de *T. mato Grossoensis* mostrando a região farmacofórica (setas) de acordo com o trabalho de COHEN e colaboradores (2005). As setas cinzas mostram os aminoácidos que fazem parte da região farmacofórica, seta preta indica a região “hot spot”64

Lista de Tabelas

Tabela 1 Registros de escorpionismo por ano nos estados brasileiros no período de 2005 a 2011 (Fonte: SINAM - Ministério da Saúde – dado atualizado até 02/01/2012).....	3
Tabela 2 Registros de óbitos por escorpionismo por ano nos estados brasileiros no período de 2005 a 2011 (Fonte: SINAM - Ministério da Saúde– dado atualizado até 02/01/2012).....	3
Tabela 3 Tabela mostra 5 das 40 subclasses de K_v e seus canais (modificado de: WICKENDEN, 2002).....	8
Tabela 4 Relação de canais Ca_v de acordo com a sua localização, função fisiológica e farmacológica (Modificado de: CATTERALL <i>et al.</i> , 2005).....	10
Tabela 5 Isoformas de canais para sódio dependentes de voltagem e distribuição nos tecidos (ENGLAND & GROOT, 2009).....	14
Tabela 6 Relação dos sítios de ligação para as toxinas que atuam nos Na_v e seus efeitos (modificado de: CATTERALL <i>et al.</i> , 2007).....	15
Tabela 7 Lista de reagentes da solução externa usada nos registros com célula HEK Na_v 1.3 e 1.6.....	30
Tabela 8 Lista de reagentes da solução de pipeta usada nos registros com célula HEK Na_v 1.3 e Na_v 1.6.	30
Tabela 9 Lista de reagentes para a solução externa de NaCl para registros com células DRG.....	33
Tabela 10 Lista de reagentes para a solução externa de cloreto de colina para registros com células DRG.....	33
Tabela 11 Lista de reagentes da solução interna de pipeta para registros com células DRG.....	34

Tabela 12 Lista de reagentes da solução externa para registros eletrofisiológicos com células DUM.....	36
Tabela 13 Lista de reagentes da solução interna de pipeta para registros com células DUM.....	36
Tabela 14 Quadro resumo das 7 frações mais abundantes na peçonha do escorpião <i>T. mattogrossensis</i>	41
Tabela 15 Sequências dos fragmentos trípticos obtidos por Maldi/TOF MS.	45
Tabela 16 Massas e sequências dos fragmentos trípticos obtidos pela digestão do peptídeo F6. A fragmentação foi feita por lift Maldi/TOF.....	53

Lista de Abreviações

α -NaScTx – α -toxina escorpiônica de canais para sódio

β -NaScTx – β - toxina escorpiônica de canais para sódio

Canais Ca_v – canais para cálcio dependentes de voltagem

Canais K_v – canais para potássio dependentes de voltagem

Canais Na_v – canais para sódio dependentes de voltagem

CLAE-FR – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

DAN - 1,5-diaminonaftaleno

DL₅₀ – Dose Letal de 50% dos animais

DRG – Dorsal Root Ganglion

DTT - Ditiotretitol

DUM – Dorsal Unpaired Median

ISD - Ion Source Decay

KTX – Toxina de canais de potássio

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

SISBIO – Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade

SSAS - Solução Salina com Antibiótico e Soro fetal bovino

TEA – Tetraetilamônio

TOF – Time of Flight

TTX – Tetrodotoxina

TTX-R –Resistente à Tetrodotoxina

Lista de aminoácidos

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Resumo

O escorpião da espécie *Tityus mattogrossensis* Borelli (1901), pertence à família Buthidae, e é endêmico do cerrado brasileiro, sendo encontrado em todo o Centro Oeste, Bahia e Norte de Minas Gerais. As espécies da família Buthidae são as principais responsáveis pelos acidentes ocorridos com humanos. Os acidentes com *T. mattogrossensis* são considerados de pequena gravidade devido ao baixo grau de reação à picada e de poucos casos registrados. A peçonha de escorpiões é uma mistura complexa de moléculas bioativas, porém, os componentes mais importantes são os peptídeos neurotóxicos, que agem em canais iônicos de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. As toxinas de escorpiões que agem em canais para Na⁺ voltagem dependentes são divididas em duas famílias: as α -toxinas de escorpiões (α -NaScTx) que agem no sítio 3 do domínio IV do canal para sódio e com isso deixam a inativação do canal mais lenta ou causam o bloqueio da inativação; e as β -toxinas escorpiônicas (β -NaScTx) que se ligam ao sítio 4 do domínio II do canal e alteram o potencial para a ativação dos canais para Na⁺. Até o momento, não existem trabalhos com a caracterização da peçonha de *Tityus mattogrossensis* e o presente trabalho tem como objetivo caracterizar química e eletrofisiologicamente os peptídeos componentes da peçonha do escorpião dessa espécie, com ênfase na caracterização de duas toxinas para canais Na_v. A peçonha bruta foi fracionada mediante CLAE mostrou a presença de 65 frações, sendo 7 frações mais abundantes, que foram testadas de forma bio-guiada em nervos de rã, por meio da técnica "Single Sucrose-Gap". Onde foram observadas quatro frações com atividade: uma que causou um retardo da repolarização do potencial de ação e três com atividade de redução do potencial de ação. Dessas, duas frações F5 (7308,5 m/z) e F6 (7108,0 m/z) tornaram-se foco do trabalho. As suas sequências foram parcialmente obtidas por meio de sequenciamento "de novo" em MALDI-TOF/MS. E tiveram alta similaridade com outras toxinas de escorpiões do tipo β do gênero *Tityus*. Foram feitos testes preliminares eletrofisiológicos em "patch clamp" e a toxina F5, mostrou alta atividade em canais Na_v 1.3, Na_v 1.6, DUM e baixa atividade em DRG. A toxina F6 apresentou alta atividade em Na_v 1.3 e essa atividade foi aumentada com um pré-pulso despolarizante. A F6 também apresentou ação em DRG. Porém, mais testes deveriam ser feitos. A peçonha do escorpião *T. mattogrossensis* possui duas toxinas abundantes que agem sobre canais para sódio voltagem dependentes. E podem ser as primeiras toxinas descritas com atividade de bloqueio de Na_v já descritas no gênero *Tityus*.

Abstract

The endemic Brazilian cerrado scorpion *Tityus mattogrossensis* Borelli (1901), belongs to Buthidae family, and is found in the Brazil Midwest, Bahia and north of Minas Gerais states. The species of the Buthidae family are the main responsible for humans accidents. *T. mattogrossensis* sting are considered as small gravity due to the low degree of reaction and the few recorded cases. The scorpion venom is a complex mixture of bioactive molecules, however, the most important components are neurotoxic peptides, which act on ion channels of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺. The toxins of scorpions that act on channels for Na⁺ voltage-dependent are divided into two families: the α -scorpions toxins (α -NaScTx) act at the site 3 domain IV of the channel to sodium, and thus slowing the channel inactivation level causing blockage or inactivation, and the β -scorpion toxins (β -NaScTx) that bind to site 4 of the domain II of the channel and changing the potential of activation of Na⁺ channels. There are no characterization studies of *T. mattogrossensis* venom, this present work aims to characterize chemical and electrophysiological peptides of scorpion venom components of this species, with emphasis on the characterization of two scorpion sodium channel toxins. The crude venom fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC) showed the presence of 65 fractions, with seven more abundant, which were bio-guided tested, using the technique Single Sucrose-Gap with frog's ciatic nerve. Four fractions showed neurotoxicity in this preparation: one caused a delay of action potential repolarization and three with reduced activity of the action potential. From these two fractions F5 (7308.5 m/z) and F6 (7108.0 m/z) became the focus of this study. Their sequences were obtained by partially sequencing "de novo" in MALDI-TOF/MS. Both had high identity with others *Tityus* β -scorpions toxins, suggesting their activity. Preliminary electrophysiological tests were performed in patch clamp and the toxin F5 showed high activity channels Nav 1.3, Nav 1.6 and DUM, and low activity in DRG. The toxin F6 showed high activity in Nav 1.3 and this activity was increased by a depolarizing pre-pulse. The F6 also presented action in DRG. However, further tests will be done. The two major toxins of *T. mattogrossensis* venom action on voltage-dependent sodium channels, and toxins can be the first already described with activity block Nav *Tityus* genus .

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Escorpiões

1.1.1 Morfologia e taxonomia

Os escorpiões pertencem ao Filo *Arthropoda*, Classe *Chelicerata*, Subclasse *Arachnida*, Ordem *Scorpiones*. Estão entre os artrópodes terrestres mais antigos e entre os aracnídeos mais primitivos (BRUSCA & BRUSCA, 2007). Os fósseis dos escorpiões terrestres datam do período Devoniano. Existem aproximadamente 1.200 espécies descritas distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais, mas ocorrem em todos os continentes, exceto na Antártida (RUPPERT *et al.*, 2005).

Os animais dessa Ordem possuem corpo dividido em duas porções: prossoma e opistossoma. O prossoma, parte anterior, é composto por segmentos fundidos e cobertos por uma carapaça, no qual estão presentes dois pedipalpos grandes com quelas e quatro pares de patas articuladas; geralmente um par de olhos, podendo ter pares adicionais laterais; e quelíceras curtas com gnatobases, que servem para triturar o alimento.

O opistossoma se divide em mesossoma, com sete segmentos, e metassoma, com cinco segmentos. No mesossoma encontra-se o poro genital, um par de pentes (apêndices sensoriais) e do terceiro ao sexto segmento apresentam, cada um, um par de pulmões foliáceos. O metassoma não possui apêndices, apenas o ânus está localizado no último segmento verdadeiro e é seguido do aparelho picador chamado de télson (BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Ao télson, último segmento, prende-se o ferrão na extremidade posterior, que consiste em uma base bulbosa e uma agulha afiada, oca e curva que injeta a peçonha. A peçonha é produzida por um par de glândulas dentro da base do aparelho. Por meio de

uma contração violenta da camada muscular que envolve as glândulas, a peçonha líquida é ejetada no ducto do aguilhão (RUPPERT *et al.*, 2005).

1.1.2 Escorpionismo

Todas as espécies de escorpiões consideradas perigosas para o homem pertencem à família Buthidae, a única que têm distribuição geográfica em todos os continentes colonizados pela ordem. Estima-se que existam aproximadamente 550 espécies, entretanto, apenas 25 são capazes de provocar acidentes graves ou fatais (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Os escorpiões mais perigosos pertencem a quatro gêneros: *Androctonus* e *Leiurus*, encontrados na África e Oriente Médio; *Centruroides* no México e Estados Unidos; e *Tityus* na América do Sul. Um escorpião causador de acidentes graves é o *Leiurus quinquestriatus*, comum no Sudão onde é conhecido como “Omdurman scorpion” (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

No Brasil, são conhecidas mais de 90 espécies de escorpiões, entre essas o *Tityus serrulatus*, conhecido como escorpião amarelo, encontrado no Centro-Oeste e Sudeste, é o maior responsável por acidentes que vão a óbito registrados no país (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009). No nordeste a espécie que causa a maioria dos acidentes, alguns deles fatais, é o *Tityus stigmurus* (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000). Na região Norte, foram registrados acidentes fatais com *Tityus metuendus* e *Tityus paraenses* (LOURENÇO, 2002).

As médias anuais de acidentes indicam ser o escorpionismo o agravo de maior relevância no Brasil entre os acidentes com animais peçonhentos, com 27.281 casos. Seguido do ofidismo com 24.069 registros, e dos acidentes por aranhas com 15.266. De 2000 a 2007 (Tabela 1), verificou-se um aumento de mais de 100%, na média nacional, e

muito superior em alguns estados principalmente no Nordeste e Sudeste, que respondem a 47 e 42% das notificações, respectivamente (OLIVEIRA, R. C. *et al.*, 2009).

Tabela 1 Registros de escorpionismo por ano nos estados brasileiros no período de 2005 a 2011 (Fonte: SINAM - Ministério da Saúde – dado atualizado até 02/01/2012).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Norte	1.917	2.047	1.996	2.108	2.751	2.462	2.532
Nordeste	16.143	19.063	18.029	18.381	23.614	25.277	23.756
Sul	677	768	984	996	1.009	1.135	1.076
Sudeste	15.836	14.418	13.873	16.139	20.073	21.182	19.966
Centro-Oeste	1.366	1.355	965	1.445	1.961	2.121	2.105
Brasil	35.995	37.697	35.847	39.069	49.408	52.177	49.435

A média de óbitos anual no país é de 43 mortes, porém os coeficientes mostram diferenciados em relação aos grupos etários, nos quais crianças com idade inferior a 10 anos constituem o grupo mais vulnerável. A análise por macrorregião observa-se que o Centro-oeste onde o risco de morte é maior, apesar de as Regiões Nordeste e Sudeste concentrarem o maior número de casos e óbitos (Tabela 2). Esses dados refletem aspectos na distribuição geográfica das espécies de interesse e na assistência à saúde (OLIVEIRA, R. C. *et al.*, 2009).

Tabela 2 Registros de óbitos por escorpionismo por ano nos estados brasileiros no período de 2005 a 2011 (Fonte: SINAM - Ministério da Saúde– dado atualizado até 02/01/2012).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Norte	3	5	5	5	6	5	7
Nordeste	12	13	30	44	32	46	38
Sul	0	0	0	0	0	1	0
Sudeste	29	9	24	30	53	29	35
Centro-Oeste	4	1	2	3	5	3	5
Brasil	48	28	61	82	96	84	85

Os acidentes em humanos com escorpiões podem ser classificados como leve, moderado e grave, de acordo com a intensidade dos sintomas clínicos apresentados. Os acidentes leves apresentam dores locais e podem ocorrer vômitos, taquicardia e agitação discreta; os moderados, além dos sintomas locais, podem apresentar manifestações sistêmicas não muito intensas como: sudorese, náuseas, vômitos, hipertensão arterial, taquicardia e agitação; e nos graves, as manifestações sistêmicas são bastante evidentes e intensas, com presença de vômitos profusos e frequentes, sudorese generalizada e abundante, palidez, agitação acentuada alternada com sonolência, hipotermia, taqui ou bradicardia, hipertensão arterial, taqui e hiperpinéia, tremores e espasmos musculares. Pode haver evolução para choque cardiocirculatório e edema agudo de pulmão, que são causas frequentes de óbito (CUPO *et al.*, 2009).

1.1.3 Tityus mattogrossensis

A espécie *Tityus mattogrossensis* pertence à família Buthidae (Figura 1) foi descrita, primeiramente, por Boreli em 1901, a partir de um exemplar capturado na localidade de Coxipó – Cuiabá/MT. E posteriormente redescrita por Lourenço (1979) com 21 exemplares coletados nos estados de Goiás e Bahia.

Essa espécie é endêmica do Cerrado brasileiro, encontrados na vegetação do tipo cerrado arborizado, chamado de cerrado-cerradão, com zonas de transição para a vegetação de mata de galeria. Está distribuída em todo o Centro-Oeste, na Bahia e Norte de Minas Gerais (ALVARES *et al.*, 2006; BRAZIL *et al.*, 2009; LOURENÇO, 1979). Tem o comprimento total médio de 36 mm, cor amarelada com manchas negras formando desenhos regulares. Sua alimentação é constituída de baratas, aranhas e alguns cupins (LOURENÇO, 1979).



Figura 1 Foto representativa de um espécime de *Tityus mattogrossensis* (Foto: Natiela Beatriz de Oliveira).

Os acidentes com *T. mattogrossensis* são considerados de pequena gravidade devido ao baixo grau de reação à picada e de poucos casos registrados (ALVARES *et al.*, 2006; BRAZIL *et al.*, 2009; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009). Isso pode ser a razão do pequeno número de estudos sobre esses animais, tendo em vista que o paciente somente procura ao atendimento médico quando os sintomas de envenenamento são graves.

A peçonha de escorpiões é uma mistura complexa de moléculas bioativas como peptídeos, enzimas (hialuronidase e lisozima), nucleosídeos, lipídeos, aminas biogênicas dentre outros (BATISTA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007). Porém, os componentes mais importantes são os peptídeos que agem em canais iônicos de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, pois são considerados os responsáveis pelos sintomas neurotóxicos de envenenamento (LIMA *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005; RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, LOURIVAL, 2004; VALDIVIA & POSSANI, 1998).

1.2 Canais iônicos

Canais iônicos são proteínas de membrana que formam poros estreitos e altamente seletivos a íons inorgânicos na membrana celular, são fundamentais na sinalização de membranas de células excitáveis como em neurônios, músculos e

sinapses (HILLE, 2001). Possuem a função de permitir que íons, principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , difundam-se rapidamente através da bicamada lipídica a favor dos seus gradientes eletroquímicos. Esses canais possuem portas que se abrem e se fecham rapidamente em resposta a um estímulo específico. Os principais estímulos são: uma mudança na voltagem através da membrana; uma tensão mecânica; ou a ligação de um ligante (ALBERTS *et al.*, 1997).

Existe uma grande variedade de tipos de canais iônicos, já foram identificados no ser humano mais de 400 genes a eles relacionados. Eles se expressam diferentemente nos diversos tecidos e confere, a cada um, peculiaridades, propriedades e proporciona características próprias às células onde são expressos (BEIRÃO, 2009).

O poro condutor dos canais iônicos é formado por uma ou mais subunidades transmembrânicas com função moduladora, que pode classificá-los em famílias: família de canais tetraméricos ou pseudotetraméricos (canais de Na^+ , K^+ e Ca^{2+}), são canais envolvidos na manutenção do potencial de repouso, geração do potencial de ação, transdução do sinal elétrico em sinalização intracelular ou modulação desses fenômenos; família de canais pentaméricos, possui característica principal de serem acionados pela ligação de neurotransmissores; família de canais hexaméricos, forma as conexões entre diversos tipos de células por meio de estruturas chamadas “gap junctions”; e, por último, a família dos canais diméricos, formada por canais para Cl^- ativados por Ca^{2+} ou por alteração no pH, e estão envolvidos na regulação da excitabilidade de fibras musculares, no transporte de NaCl no rim e na acidificação de organelas intracelulares (BEIRÃO, 2009; HILLE, 2001).

1.2.1 Canais para potássio

Os canais para K^+ são formados por tetrâmeros de subunidades α que contêm seis segmentos transmembrana e uma região que forma o poro (WICKENDEN, 2002). Cada segmento possui duas α -hélices transmembrana, bem como uma terceira hélice curta que contribui para a região do poro (NELSON & COX, 2002). Os primeiros quatro segmentos da subunidade α contribuem para o controle da abertura e fechamento do poro (Figura 2). O quarto segmento possui aminoácidos carregados positivamente, devido a presença dos aminoácidos básicos arginina e lisina, que têm carga positiva em sua cadeia lateral. Essas cargas positivas estão dispostas periodicamente a cada três aminoácidos, no total de 4 a 8 cargas, é isso que faz o segmento 4 ser o elemento sensível à voltagem (BEIRÃO, 2009; HILLE, 2001; MILLER, 2000).

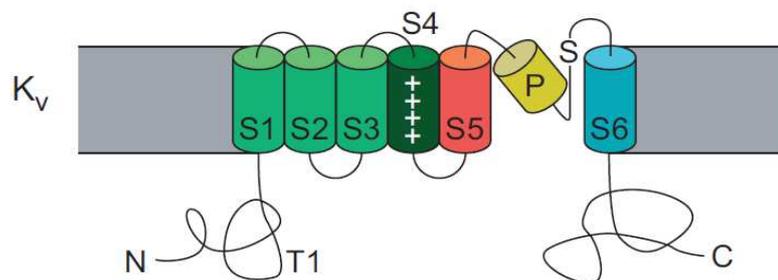


Figura 2 Representação esquemática da subunidade α de um canal de K^+ dependente de voltagem mostrando os seis segmentos transmembrana (S1-S6), sendo o segmento S4 a região que contém o sensor de voltagem do canal (MILLER, 2000).

De acordo com WICKENDEN (2002) existem mais de 80 tipos de canais para K^+ envolvidos em diferentes funções, sendo esses canais reconhecidos pela sua diversidade funcional. Os canais para K^+ dependentes de voltagem (Kv) são divididos em 40 subclasses distintas, baseado na sua estrutura e função (CATTERALL *et al.*, 2007). A Tabela 3 mostra algumas dessas subclasses e seus respectivos canais.

Tabela 3 Tabela mostra 5 das 40 subclasses de K_v e seus canais (modificado de: WICKENDEN, 2002).

Subclasses	Canal
K _v dependente de voltagem (Shaker)	Kv1.1
	Kv1.2
	Kv1.3
	Kv1.4
	Kv1.5
	Kv1.6
	Kv1.7
K _v dependente de voltagem (Shab)	Kv2.1
	Kv2.2
K _v dependente de voltagem (Shaw)	Kv3.1
	Kv3.2
	Kv3.3
	Kv3.4
K _v dependente de voltagem (Shal)	Kv4.1
	Kv4.2
	Kv4.3
	Kv5.1
K _v dependente de voltagem (Silent)	Kv6.1
	Kv6.2
	Kv6.3
	Kv8.1
	Kv9.1
	Kv9.2
Kv9.3	

Os canais para K^+ dependentes de voltagem são ativados pela despolarização que gera o movimento de saída de K^+ , e com isso a repolarização da membrana. Em células neuronais, ocorre a hiperpolarização imediatamente após o potencial de ação e, com isso, desempenha um papel fundamental para manter um potencial de repouso, que gera um fluxo direcional da propagação do pulso nervoso (CATTERALL *et al.*, 2007).

Os canais para K^+ têm um papel crítico nos processos de sinalização celular que regulam a liberação de neurotransmissor, da frequência cardíaca, de secreção de insulina, de excitabilidade neuronal, do transporte de eletrólitos epiteliais, de contração da musculatura lisa e de regulação do volume celular (SHIEH *et al.*, 2000). Sendo esses

canais responsáveis por alguns distúrbios cardíacos, neuronais como a ataxia episódica, convulsões neonatais, neurodegeneração, além de esquizofrenia, hipoglicemia, problemas de audição e renais (SHIEH *et al.*, 2000).

1.2.1.1 - Toxinas Moduladoras de Canais para K⁺

Neurotoxinas que agem em canais para K⁺ têm sido isoladas da peçonha de diversas espécies de animais como caramujos marinhos, aranhas, escorpiões, anêmonas do mar e serpentes. Essas toxinas apresentam entre 22 e 60 resíduos de aminoácidos e são estabilizadas por 2-4 pontes dissulfeto (MOUHAT *et al.*, 2004).

As toxinas isoladas da peçonha de escorpiões que agem em canais para K⁺ (KTXs) contém 31-38 resíduos de aminoácidos com 3-4 pontes dissulfeto (SRINIVASAN *et al.*, 2002). Estas toxinas são divididas em quatro famílias, de acordo com a forma estrutural: α -KTXs, β -KTXs, γ -KTXs e κ -KTXs (TYTGAT *et al.*, 1999).

As α -KTXs compõem a maior família de toxinas ligantes de canais para K⁺, com mais de 120 peptídeos descritos, distribuídos em 20 subfamílias. Essas toxinas podem bloquear ou modificar a permeabilidade de canais para K⁺ em células excitáveis e não-excitáveis (RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2004). A família das β -KTXs possuem até o presente cerca de 20 peptídeos, sem estrutura tridimensional determinada, sendo representadas pelos peptídeos de cadeia longa e pelas escorpinas. As γ -KTXs agem em canais de K⁺ “ether-a-go-go related”, e possuem 51 toxinas representantes (CORONA, MIGUEL *et al.*, 2002). Já as κ -KTX são formadas por duas α -hélices estabilizadas por duas pontes dissulfeto (SRINIVASAN *et al.*, 2002).

1.2.2 Canais para cálcio

Os canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) possibilitam o influxo de Ca²⁺ em resposta à despolarização da membrana e regulam diversos processos

intracelulares como contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica de diferentes tipos celulares (CATTERALL *et al.*, 2005). Foram caracterizadas 10 diferentes isoformas de Ca_v em mamíferos, e cada um tem uma ou mais funções específicas nos mecanismos de transdução de sinais, como descrito na Tabela 4 (CATTERALL *et al.*, 2005).

Tabela 4 Relação de canais Ca_v de acordo com a sua localização, função fisiológica e farmacológica (Modificado de: CATTERALL *et al.*, 2005).

Canal	Localização	Função Celular
$Ca_v1.1$	Músculo esquelético, túbulos transversos	Contração
$Ca_v1.2$	Miócitos cardíacos, miócitos de músculo liso, células endócrinas, corpos celulares neuronais, dendritos proximais	Contração, liberação hormonal, regulação da transcrição, integração sináptica
$Ca_v1.3$	Células endócrinas, corpos celulares neuronais e dendritos, miócito atrial cardíaco e células do marcapasso, células ciliares da cóclea.	Liberação hormonal, regulação da transcrição, regulação sináptica, marcapasso cardíaco, audição, liberação de neurotransmissores por células sensoriais
$Ca_v1.4$	Células da retina e bipolares, medula espinhal, glândula adrenal, mastócitos	Liberação de neurotransmissores por fotorreceptores
$Ca_v2.1$	terminação nervosa e dendríticas, células neuroendócrinas	Liberação de neurotransmissores, Ca^{2+} dendríticos transientes, liberação hormonal
$Ca_v2.2$	terminação nervosa e dendríticas, células neuroendócrinas	Liberação de neurotransmissores, Ca^{2+} dendríticos transientes, liberação hormonal
$Ca_v2.3$	Corpos celulares neuronais e dendríticos	Disparo repetitivo de potencial de ação, Ca^{2+} dendríticos transientes
$Ca_v3.1$	Corpos celulares neuronais e dendríticos, miócitos de músculo liso e cardíaco	Marcapasso e disparos repetitivos de potencial de ação
$Ca_v3.2$	Corpos celulares neuronais e dendríticos, miócitos de músculo liso e cardíaco	Marcapasso e disparos repetitivos de potencial de ação
$Ca_v3.3$	Corpos celulares neuronais e dendríticos	Marcapasso e disparos repetitivos de potencial de ação

O canal para Ca^{2+} dependente de voltagem é um complexo proteico composto de quatro ou cinco subunidades distintas (α_1 , β , α_2 , δ , γ). A subunidade α_1 é uma subunidade com 190 a 250 kDa e contém a região formadora do poro. Essa subunidade é organizada

em quatro domínios homólogos (I-IV), com seis segmentos transmembrana (S1-S6) cada um, sendo que o segmento 4 é identificado como o sensor de voltagem. O poro encontra-se entre os segmentos 5 e 6 de cada domínio, que determina a condutância e seletividade ao íon (CATTERALL, 2000a; CATTERALL *et al.*, 2005).

A subunidade intracelular β é formada por α -hélices, mas não possui nenhum segmento transmembrana. A subunidade α_2 , localizada na parte extracelular, possui muitos sítios de glicosilação e uma sequência hidrofóbica. E junto à α_2 , ligada por ponte dissulfeto, está a subunidade δ . A subunidade γ é uma glicoproteína com quatro segmentos transmembrana (Figura 3; CATTERALL, 2000a). As subunidades β , α_2 e δ são encontradas na maioria dos canais para cálcio. A subunidade γ está presente em canais para cálcio principalmente de músculo esquelético, coração e cérebro (CATTERALL *et al.*, 2005).

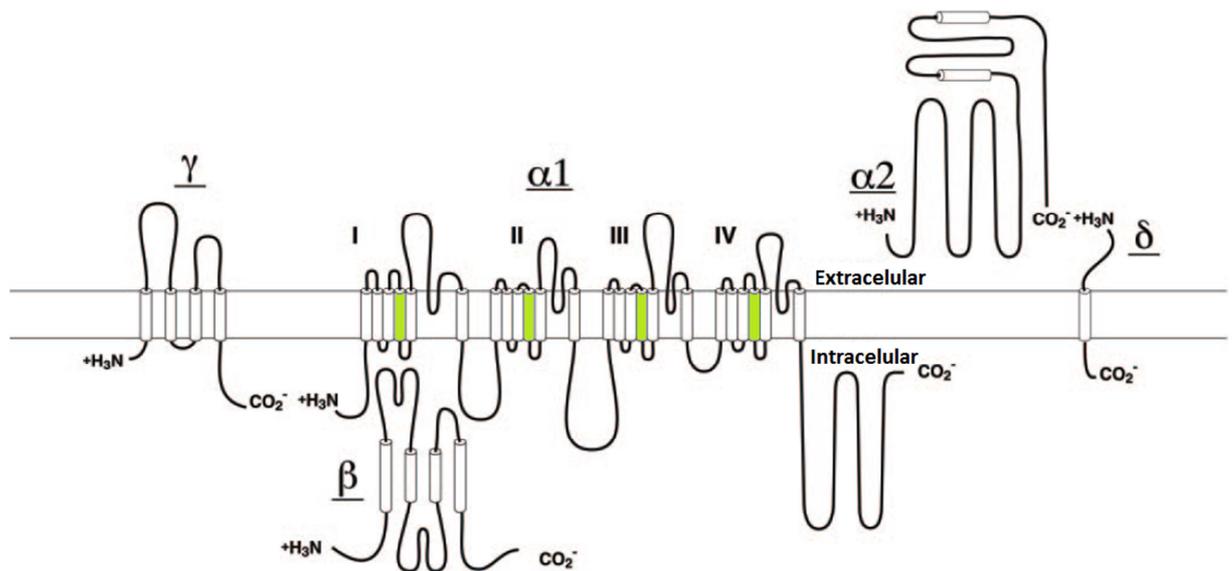


Figura 3 Representação esquemática das subunidades α_1 (com os quatro domínios – I a IV), β , α_2 , δ e γ do canal Ca_v de músculo esquelético. O segmento 4, em verde, identifica a região sensível à voltagem (modificado de: CATTERALL *et al.*, 2005).

1.2.2.1- Toxinas moduladoras de canais de Ca²⁺

As toxinas de canais para Ca²⁺ são polipeptídios comumente encontrados em peçonha de moluscos do gênero *Conus*, serpentes, insetos, aranhas, escorpiões e em alguns fungos (MOUHAT *et al.*, 2004). Podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com o número de folhas-β de cada toxina (MOUHAT *et al.*, 2004). O grupo com duas folhas-β é representado pela toxina Ptu1 do besouro *Peirates turpis* (BERNARD *et al.*, 2001). O segundo grupo com três folhas-β, tem-se a ω-conotoxina GVIA encontrada em conídios. No terceiro grupo a toxina FS2, com cinco folhas-β, extraída da serpente *Dendroaspis polylepis polylepis* é um exemplo. E o quarto grupo com a estrutura de seis folhas-β representado pela KP4, toxina encontrada no fungo *Ustilago maydis* (GU *et al.*, 1995).

No escorpião *Parabuthus transvaalicus* foi isolada uma toxina (kurtoquina) que age em canais para Ca²⁺, com 63 resíduos de aminoácidos e com uma alta similaridade com toxinas de canais para Na⁺ (MOUHAT *et al.*, 2004). Outro exemplo de toxina escorpiônica que age em canais para Ca²⁺ é a toxina II extraída de *Centruroides limpidus* que inibe a ativação desses canais (ALAGÓN *et al.*, 1988).

Drogas bloqueadoras de canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem possuem efeitos anti-hipertensivos, cardiodepressivos e de antiarritmias. Além disso, os peptídeos com ação nos diferentes subtipos de canais para Ca²⁺ tem um grande potencial para a produção de drogas com propriedades neuroprotetoras e analgésicas (STRIESSNIG *et al.*, 1998).

1.2.3 Canais para sódio

O canal seletivo ao íon Na⁺ é um complexo proteico tetramérico, com uma subunidade principal α com 220-260 kDa e uma ou duas subunidades auxiliares β de

aproximadamente 33-36 kDa. A subunidade α é composta por quatro domínios homólogos e cada um contém seis segmentos transmembrana hidrofóbicos. O poro é formado pelos segmentos entre as hélices transmembranas 5 e 6 de cada domínio, que se dobram para construir as paredes do poro. O segmento 4 de cada domínio possui aminoácidos carregados positivamente a cada três aminoácidos (com o total de cargas de 4 a 8, varia conforme o domínio) que formam o sensor de voltagem do canal (BEIRÃO, 2009; CATTERALL, 2000b; CATTERALL *et al.*, 2007; HILLE, 2001). A Figura 4 ilustra subunidade α do canal para Na^+ dependente de voltagem.

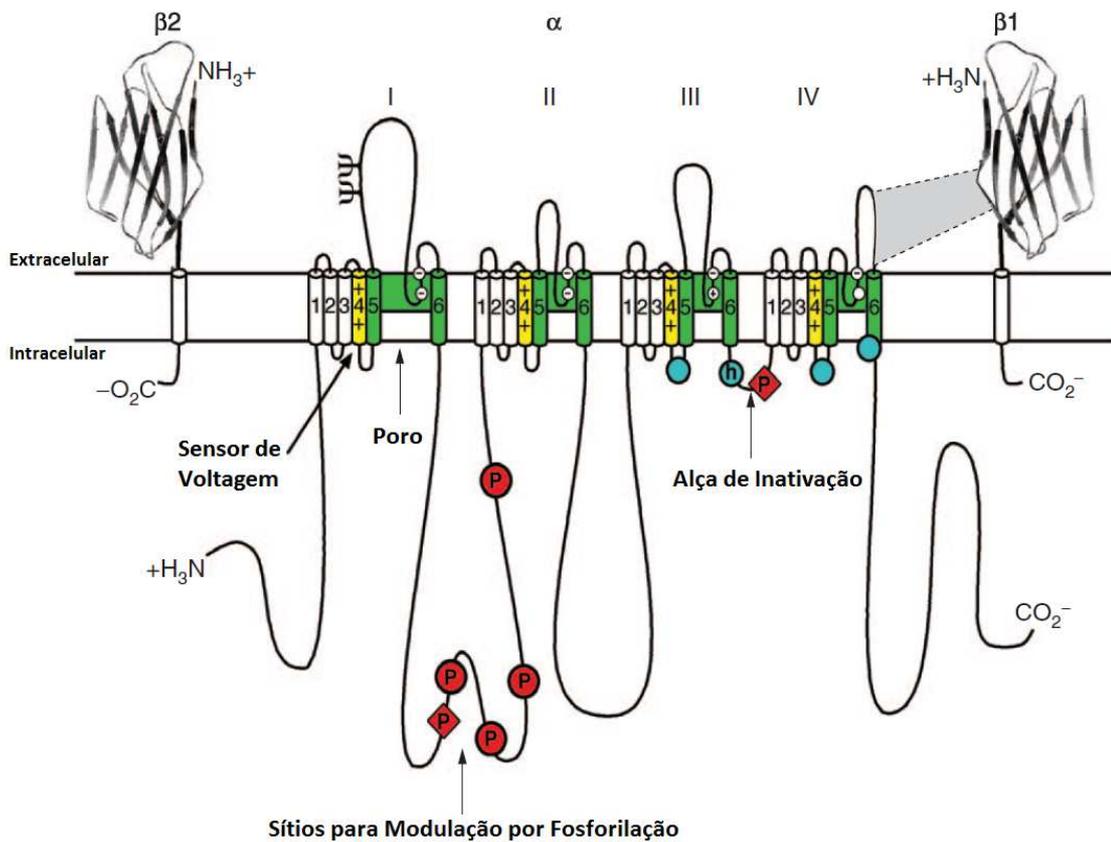


Figura 4 Desenho esquemático da subunidade α do canal para Na^+ dependente de voltagem. (I-IV) indicam os quatro domínios homólogos e os números de 1-6 mostram os seis segmentos transmembrana de cada domínio. Os segmentos 4 de cada domínio (em amarelo) destacam as regiões carregadas do canal, e em verde os segmentos 5 e 6 que formam o poro (Adaptado de: YU & CATTERALL, 2003).

Os canais para sódio são responsáveis pela geração e propagação do potencial de ação em células excitáveis em resposta a despolarização da membrana. De forma

simplificada, o canal Na_v possui estágios distintos: fechado, ativado (aberto) e inativado, que pode ser uma inativação rápida (em milissegundos) ou lenta (segundos). Nesse último estado, o canal não está disponível para abrir em resposta a uma nova despolarização (DIB-HAJJ; BINSHTOK; *et al.*, 2009; HILLE, 2001). Hodgkin e Huxley descreveram a presença de uma alça intracelular situada entre os domínios III e IV (Figura 4), que é a responsável por esse estágio de inativação do canal. Há evidências de que, uma vez o canal aberto, a alça se dobra como uma tampa e obstrui o poro condutor pela abertura interna (BEIRÃO, 2009).

Existem nove tipos de canais para Na^+ dependentes de voltagem ($Na_v1.1$ – $Na_v1.9$), ver Tabela 5. Eles estão distribuídos de forma heterogênea no organismo sendo determinados subtipos específicos para um tipo celular.

Tabela 5 Isoformas de canais para sódio dependentes de voltagem e distribuição nos tecidos (ENGLAND & GROOT, 2009).

Canal de Sódio	Sensível a TTX	Tecido de maior expressão	Efeito da mutação
$Na_v 1.1$	+	SNC, SNP	Epilepsia
$Na_v 1.2$	+	SNC, SNP	Epilepsia
$Na_v 1.3$	+	SNC, SNP	Dor
$Na_v 1.4$	+	Músculo esquelético	Miotonia, paralisia periódica
$Na_v 1.5$	-	Coração	Síndrome de Brugada
$Na_v 1.6$	+	SNC, SNP	Atrofia cerebelar
$Na_v 1.7$	+	SNP (NSS e NAP)	Aumento e diminuição da sensibilidade a dor
$Na_v 1.8$	---	SNP (NAP)	Dor neuropática
$Na_v 1.9$	---	SNP (NAP)	Dor neuropática

SNC – Sistema Nervoso Central; SNP – Sistema Nervoso Periférico; NSS – Neurônios do Sistema Sensorial; NAP – Neurônios Aferentes Primários; (+/-) Nível de sensibilidade a TTX.

A diversidade dos canais para Na^+ propiciam diferentes funções fisiológicas e farmacológicas. Podem interferir em desordens neurológicas como esclerose múltipla, epilepsia e dores neuropáticas (DIB-HAJJ *et al.*, 2002; NOVAKOVIC *et al.*, 2001). Esses canais são alvos de drogas terapêuticas como anestésicos, anticonvulsivantes e antiarritmias, além de potenciais inseticidas (ESTRADA *et al.*, 2007).

1.2.3.1- Toxinas Moduladoras de Canais de Na⁺

Os canais para Na⁺ são alvos moleculares para as neurotoxinas que agem com mecanismos distintos desde simples bloqueio do poro até modulação alostérica alterando o seu funcionamento (CESTÈLE & CATTERALL, 2000). Esses mecanismos de ação estão relacionados à afinidade que a neurotoxina tem aos receptores dos diferentes sítios do canal (Tabela 6 e Figura 5).

Tabela 6 Relação dos sítios de ligação para as toxinas que atuam nos Na_v e seus efeitos (modificado de: CATTERALL *et al.*, 2007).

Sítio Receptor	Neurotoxina	Efeito
Sítio 1	Saxitoxina Tetrodotoxina μ-conotoxina	Bloqueio do poro
Sítio 2	Batracotoxina Veratridina Graianotoxina Aconitina	Ativação persistente e reduzida, bloqueio da ativação
Sítio 3	α-Toxinas de Escorpião Toxina de Anêmona Atracotoxina	Retardo da inativação rápida
Sítio 4	β-Toxinas de Escorpião	Modulação do canal
Sítio 5	Brevetoxina Ciguatoxina	Bloqueio da inativação
Sítio 6	δ-conotoxina	Retardo da inativação

Conus, consiste em uma simples cadeia de 22 aminoácidos com uma amina carboxiterminal (CATTERALL *et al.*, 2007).

As toxinas hidrofóbicas agem nos sítios 2 e 5 dos canais para sódio e são moduladoras alostéricas da função do canal. Ligam-se a locais que são distintos do poro ou dos sensores de voltagem e favorecem o estado aberto dos canais de forma indireta (CESTÈLE & CATTERALL, 2000).

De toxinas que agem no sítio 2 tem-se grayanotoxina, o alcalóide veratridina, a acotinina e a batracotoxina. Essas toxinas se ligam no sítio 2, preferencialmente ao estado ativado do canal para Na⁺ e causam uma persistente ativação do potencial de ação da membrana por meio de um mecanismo alostérico que leva a um bloqueio da inativação dos canais (CATTERALL *et al.*, 2007).

A grayanotoxina, veratridina e acotinina são encontradas em plantas das famílias Ericaceae, Liliaceae e Ranunculaceae, respectivamente. A Batracotoxina (BTX) é encontrada no extrato da pele do anuro colombiano do gênero *Phylllobates* da família Dendrobatidae (ALBUQUERQUE *et al.*, 1971).

Como exemplos de toxinas que agem no sítio 5 do canal para Na⁺ tem-se as brevetoxinas e ciguatoxinas, que foram originalmente encontradas nos dinoflagelados *Karenia brevis* e *Gambierdicus toxicus*, respectivamente. Essas toxinas também agem causando uma mudança na ativação para potenciais de membrana mais negativos e gera o bloqueio da inativação (CESTÈLE & CATTERALL, 2000).

As neurotoxinas que agem no sítio 3 do canal para sódio são toxinas polipeptídicas, comumente encontradas em escorpiões (as α -toxinas escorpiônicas), anêmonas-do-mar e aranhas. Essas toxinas deixam a inativação do canal mais lenta ou a bloqueiam (CATTERALL *et al.*, 2007).

Existem dois tipos de toxinas que agem no sítio 4 do canal para Na⁺, as β-toxinas escorpiônicas e a toxina Magi-5 da aranha *Macrothele gigas* (CORZO *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005). A toxina Magi-5 é a primeira toxina de aranha descrita com afinidade ao sítio 4 de canais para sódio de mamíferos. A Magi-5 é uma toxina de 3286,8 Da composta por 29 resíduos de aminoácidos com três pontes dissulfeto (CORZO *et al.*, 2003).

A toxina que se liga ao receptor do sítio 6 do canal para sódio é a δ-conotoxina, com ação similar as α-NaScTx, de retardar a inativação da corrente de Na⁺ (CATTERALL *et al.*, 2007). A δ-conotoxina é um peptídeo isolado da peçonha de *Conus ermeneus* que contém 32 resíduos de aminoácidos e 6 cisteínas. As δ-conotoxinas representam uma nova categoria de toxinas de canais para Na⁺ por agirem no sítio diferente das demais neurotoxinas de canais de Na_v (BARBIER *et al.*, 2004). A localização do receptor do sítio 6 ainda não foi descrita.

1.2.3.2- Toxinas escorpiônicas de canais para sódio

As α-toxinas de escorpiões (α-NaScTx) agem no sítio 3 do domínio IV do canal para sódio e com isso deixam a inativação do canal mais lenta ou causam o bloqueio da inativação. Essas toxinas são polipeptídeos com 58-70 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. São classificadas dentro de três grupos: clássicos, anti-insetos e “α-simile”. As α-NaScTx clássicas são altamente ativas em mamíferos e apresentam baixa toxicidade em insetos, o oposto é visto para as toxinas anti-insetos. Já as “α-simile” possuem alta toxicidade quando injetados no sistema nervoso central (SNC) e baixa atividade quando administrados pela via subcutânea em ratos (RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005)

As β-toxinas escorpiônicas (β-NaScTx) são compostas por 60-65 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. Elas se ligam ao sítio 4 do domínio II do canal e,

com isso, alteram o potencial para a ativação dos canais para Na⁺. As β -NaScTx são subdivididas em quatro grupos: clássicas ou anti-mamíferos; anti-inseto depressoras, que causam paralisia flácida; anti-inseto excitatórias geram paralisia tônica, e; β -simile, com atividade em insetos e mamíferos. As β -NaScTx encontradas nos gêneros *Centruroides* e *Tityus* (COHEN *et al.*, 2005; GUREVITZ *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, 2005; YATANI *et al.*, 1988).

2. JUSTIFICATIVA

A caracterização de toxinas de escorpiões é importante farmacologicamente, pois possuem um grande potencial de produção de peptídeos moduladores de canais iônicos, que podem ser usados como fármacos para o controle de doenças ligadas às disfunções neuronais. As propriedades farmacológicas dos tipos e subtipos de canais iônicos têm sido identificadas a partir das toxinas que os modulam, uma vez que estas toxinas possuem grande especificidade, possibilitando diferentes formas de interação e controle da permeabilidade (RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2004).

Existem quase 200 sequências de toxinas escorpiônicas que agem em canais para sódio já descritas. O número de toxinas escorpiônicas que atuam em canais para potássio é superior a 120 peptídeos. Sendo esses peptídeos altamente conservados nas diferentes espécies de escorpiões como *T. serrulatus*, *T. fasciolatus*, *Centruroides exilicauda*, *T. bahiensis*, *T. cambridgei*, *T. costatus*, *T. discrepans*, *T. pachyurus*, *T. stigmurus* dentre outros (RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2004). Esse número de toxinas escorpiônicas vêm aumentando ao longo dos anos.

Não existem trabalhos com a caracterização da peçonha de *Tityus matto grossensis* podendo essa ter grande importância para o conhecimento científico, o que pode contribuir para entender a atividade farmacológica das frações da peçonha, assim como os aspectos evolutivos das toxinas, a filogenia dos escorpiões e sua história natural.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar química e eletrofisiologicamente dois peptídeos componentes da peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis* (Buthidae), com ênfase na caracterização de duas toxinas que atuam sobre os canais para sódio.

3.2 Objetivos específicos

- Fracionar os componentes peptídicos da peçonha, mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Fazer o teste para a busca bio-guiada de atividade dos peptídeos de maior abundância encontrados na peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis* em nervos de rã, por meio da técnica “Single Sucrose-Gap”;
- Analisar as massas moleculares das frações por espectrometria de massas e caracterizá-las quimicamente as por meio de sequenciamento “de novo” em MALDI-TOF/MS;
- Analisar, com o uso da metodologia de “patch clamp”, a ação dos peptídeos em canais iônicos específicos para Na⁺.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Coleta:

Os animais da espécie *Tityus mattogrossensis* foram coletados na Fazenda Jatobá, município de Jaborandi-BA (número da licença de coleta no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO: 23408-1). A coleta dos escorpiões foi feita no período noturno com auxílio de lanternas LED-UV (395 nm), o que facilita a visualização dos animais. Foram capturados 200 indivíduos adultos, de ambos os sexos, para o presente estudo. Após a coleta, os animais foram mantidos em caixas de contenção no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, com umidade e temperatura adequados, com água “ad libitum” alimentados periodicamente com baratas.

4.2 Extração e quantificação da peçonha:

A extração da peçonha foi realizada através de estímulo elétrico (de 50 a 100 V, 300 Hz) próximo ao télson. A peçonha foi, então, coletada em tubos de polietileno, solubilizada em 1 ml de água deionizada e centrifugada durante 10 min a 10.500 g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, sendo esta fase denominada de peçonha bruta. A quantificação da peçonha bruta foi realizada utilizando um espectrofotômetro (absorbância 280 nm), assumindo que uma unidade de absorbância em cubeta quartzo de 1 cm equivale a 1 mg/ml de concentração protéica (CALISKAN *et al.*, 2006). Em seguida, a peçonha bruta foi seca em sistema de “Speed Vac” (Thermo Savant – SPD 2010) e mantida refrigerada (-20°C) para análises posteriores.

4.3- Fracionamento em Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

Alíquotas de 1 mg de peçonha bruta/100 µl de solução aquosa contendo ácido trifluoracético (TFA) a 0,12% foram aplicadas em um sistema de cromatografia líquida

de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR): Shimadzu Co. (Kyoto, Japan) série LC10A; equipado com arranjo de diodo SPD-M10A e coluna analítica C18 Phenomenex Synergi Hidro-RP (4,60 x 250 mm, 4 μ).

Uma cromatografia preliminar foi feita com 1 mg de peçonha bruta com eluição de gradiente binário de solventes: em em solvente (A) solução aquosa de TFA 0,12% e solvente (B) solução de acetonitrila e TFA a 0,1% (v/v), com fluxo de 1 mL por minuto. O gradiente iniciou em 0% de B e permaneceu por 10 min, após isso, variou de 0 a 100% de B em 100 min; de 60 a 100% de B em 5 min; 100% de B por 5 min, 100 a 0% de B em 5 min. Com monitoramento por absorvância a 216 e 280 nm.

Para um melhor aproveitamento do tempo de cromatografia, a eluição passou a ser feita com gradiente binário de solventes com a variação de 0 a 60% de B em 60 min; de 60 a 100% de B em 5 min 100% de B por 5 min, 100 a 0% de B em 5 min. Com monitoramento por absorvância a 216 e 280 nm. As frações foram manualmente coletadas, secas em sistema de "Speed Vac" e armazenadas a -20°C.

As frações de maior abundância nos leitores de U.V. passaram por um novo processo de cromatografia em sistema de CLAE-FR (recromatografia) utilizando coluna analítica C18 Phenomenex Luna (4,60 x 150 mm, 3 μ), gradiente otimizado de acetonitrila e monitorados em comprimentos de onda de 216 e 280 nm. As frações foram manualmente coletadas e quantificadas pelo cálculo de leitura a 216, 280 e 340 nm do espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Suécia) na metodologia de proteínas fornecida pelo software. E guardadas secas a -20°C para análises posteriores.

4.4 Espectrometria de Massa:

Análises por MALDI-TOF/MS foram feitas em espectrômetros de massa sistema MALDI TOF (ULTRAFLEX III e AUTOFLEX SPEED, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)

nos modos positivos linear e refletido. As amostras em triplicata foram aplicadas em uma placa em concentrações variáveis seguindo-se a adição de solução saturada de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), foram utilizados os calibrantes: Peptide calibration standar II para baixa massa e Protein calibration I para massa alta ambos da marca Bruker Daltonics. Laser de nitrogênio foi usado em intensidade de 20 a 40%.

As massas monoisotópicas dos peptídeos de alto peso molecular foram elucidadas com o uso do espectrômetro de massa de ionização por Eletrospray acoplado a um sistema de quadrupolo-TOF (MicOTOF-QII, Bruker Daltonics, Alemanha), operado no modo positivo. As amostras foram ressuspendidas em um solvente com 50% de acetonitrila, 47,3% de água deionizada e 2,6% de ácido fórmico e injetadas no sistema por uma bomba de fluxo contínuo de 180 μ l/min.

4.5 Sequenciamento Primário:

Para o sequenciamento primário foram usados dois métodos: primeiro em MALDI-TOF/MS com método de fragmentação na fonte (MALDI-ion source decay - ISD), que predomina a fragmentação dos peptídeos em série C (DEBOIS *et al.*, 2010). Para isso, foi utilizada uma matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno (DAN) e o calibrante BSA.

E a segunda técnica foi a de digestão química: os peptídeos passaram por um processo inicial de redução por ditiolreitol-DTT (25 mM DTT diluído em 100 mM de NH_4HCO_3) durante 1 h em agitação contínua a 60°C e posteriormente alquilados por Iodoacetamida (25 mM Iodoacetamida também diluído em solução de 100 mM de NH_4HCO_3), durante 40 min com agitação contínua a 37°C. As amostras foram posteriormente digeridas em 50 mM de tripsina imobilizada (TPKC – Thermo Scientific) em tampão de 100 mM de NH_4HCO_3 , incubadas a 37°C de 2h a 4h.

Os fragmentos trípticos foram analisados no sistema de MALDI-TOF/MS e fragmentados por Lift MS/MS. As sequências foram interpretadas com o uso do programa Flex Analysis 3.3. A comparação da similaridade das sequências obtidas foram feitas por meio da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) e os alinhamentos das sequências similares obtidas foram feita com o uso da ferramenta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Em caso de identidade com toxinas putativas do banco de dados, foi utilizado o programa Expasy para a retirada da sequência do peptídeo sinal (<http://expasy.org/>).

As análises de espectrometria de massa e sequenciamento primário foram feitas no Laboratório de Espectrometria de Massas localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen), coordenado pelo Professor Doutor Carlos Bloch.

4.6 Ensaios eletrofisiológicos:

Foram realizados 2 ensaios eletrofisiológicos para a verificação da atividade dos peptídeos como moduladores de canais iônicos.

4.6.1 Técnica de "Single Sucrose-Gap":

Sete frações cromatográficas de maior abundância foram testadas sobre o potencial de ação composto, registrado através da técnica de "Single Sucrose-Gap". A atividade das frações cromatografadas sobre o potencial de ação do nervo ciático de rã (*Lithobates catesbeianus*) foi analisada com a adaptação da técnica de "Single Sucrose-Gap" descrita na literatura (STRONG *et al.*, 1973). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília com o número de processo 124645/2011.

A rã foi espinhalada e o nervo ciático foi retirado e cuidadosamente o tecido conjuntivo que o envolve foi removido. O nervo foi colocado através das câmaras da cubeta de teste, isoladas mecanicamente e eletricamente com selos de vaselina (Figura 6-D). As duas primeiras câmaras foram utilizadas para a estimulação supramáxima, que constitui de pulsos de voltagem de 6 a 7 V, com duração de 25 μ s, gerado pelo estimulador S8 – Grass Instruments (Figura 6-A). Na terceira câmara, que possui sistema de perfusão que pode ser constantemente lavada, foram aplicadas as amostras a serem testadas, com volume de 350 μ l. No momento da aplicação das amostras, o sistema de perfusão foi interrompido. Na quarta câmara, também com sistema de perfusão, foi colocada a solução de 216 mM de sacarose, renovada constantemente durante todo o período de teste. Com exceção da câmara 4, todas as outras câmaras foram preenchidas com solução fisiológica para anfíbios - Ringer (111 mM de NaCl, 1,9 mM de KCl, 2,4 mM de NaHCO₃ e 1,1 mM de CaCl₂) mantendo o nervo submerso. Os potenciais de ação foram captados nas câmaras 3 e 5 por eletrodos de Ag-Cl ligados a um amplificador diferencial DC (Figura 6-B), de alta impedância e com ganho de 50 vezes acoplado a um osciloscópio digital Tektronix TDS 360 (Tektronix, EUA; Figura 6-C), que possui um “driver” de disquete, no qual foram feitos registros a cada 5 min após a aplicação da amostra, no total de 40 min, e a cada 5 min após o início da lavagem da câmara teste, no total de 30 min. Esses registros foram comparados com o registro controle obtido antes da aplicação da amostra. Os ensaios ocorreram à temperatura ambiente e as amostras secas a serem testadas foram ressuspensas em 350 μ l de solução Ringer.

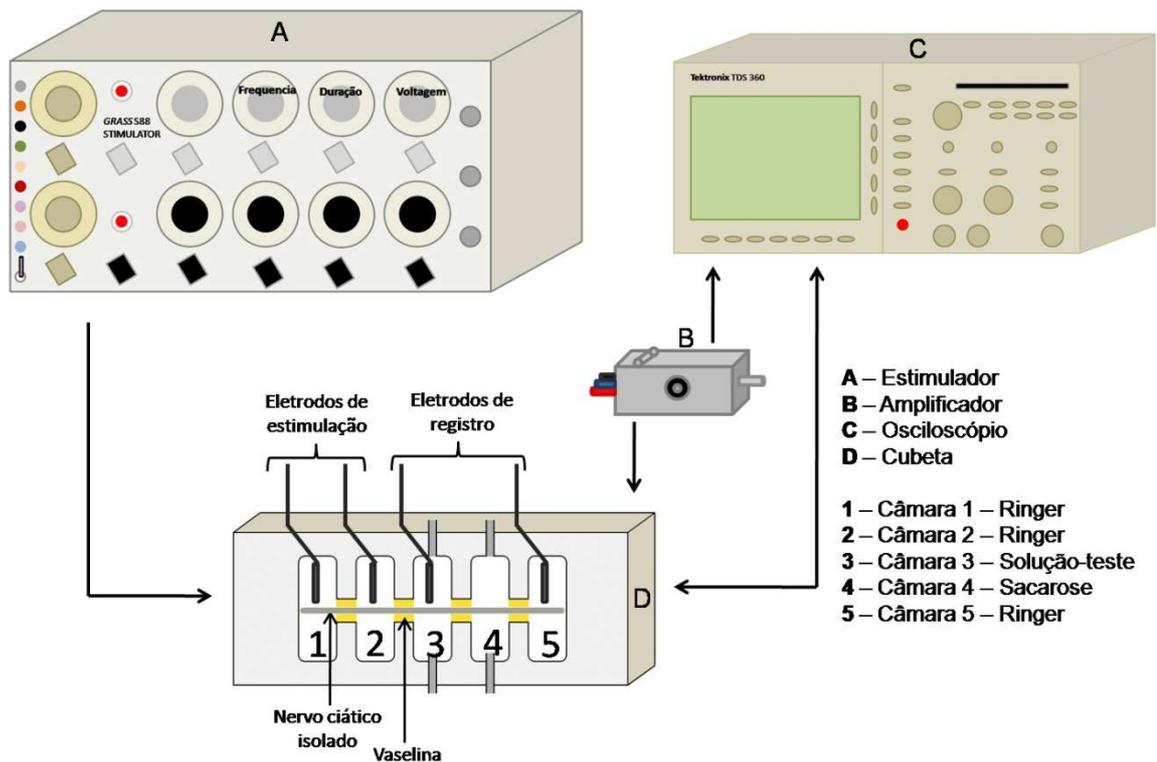


Figura 6 Modelo esquemático do ensaio eletrofisiológico (“sucrose-gap”) com nervo ciático isolado da rã *L. catesbeianus*. O nervo foi colocado na canaleta da cubeta (D) que percorre as cinco câmaras, que foram isoladas com selos de vaselina. A estimulação é feita nas câmaras 1 e 2 e registrada nas câmaras 3 e 5. A câmara 4 está preenchida por solução de sacarose 216 mM. As amostras são aplicadas na câmara 3 que possui sistema de perfusão podendo ser constantemente lavada, assim como a câmara 4 (Retirado de: FERNANDES, 2010).

4.6.2 "Patch Clamp"

As correntes de sódio foram registradas na configuração "whole-cell" da técnica de "patch-clamp", que consiste na formação de um selo de alta resistência ($>1\text{ G}\Omega$) entre a micropipeta, conectada a um eletrodo de Ag/AgCl, e a membrana da célula. A membrana é então rompida por meio de uma sucção aplicada à pipeta, formando uma continuidade física e elétrica entre a solução contida na micropipeta e o citoplasma (Figura 7).

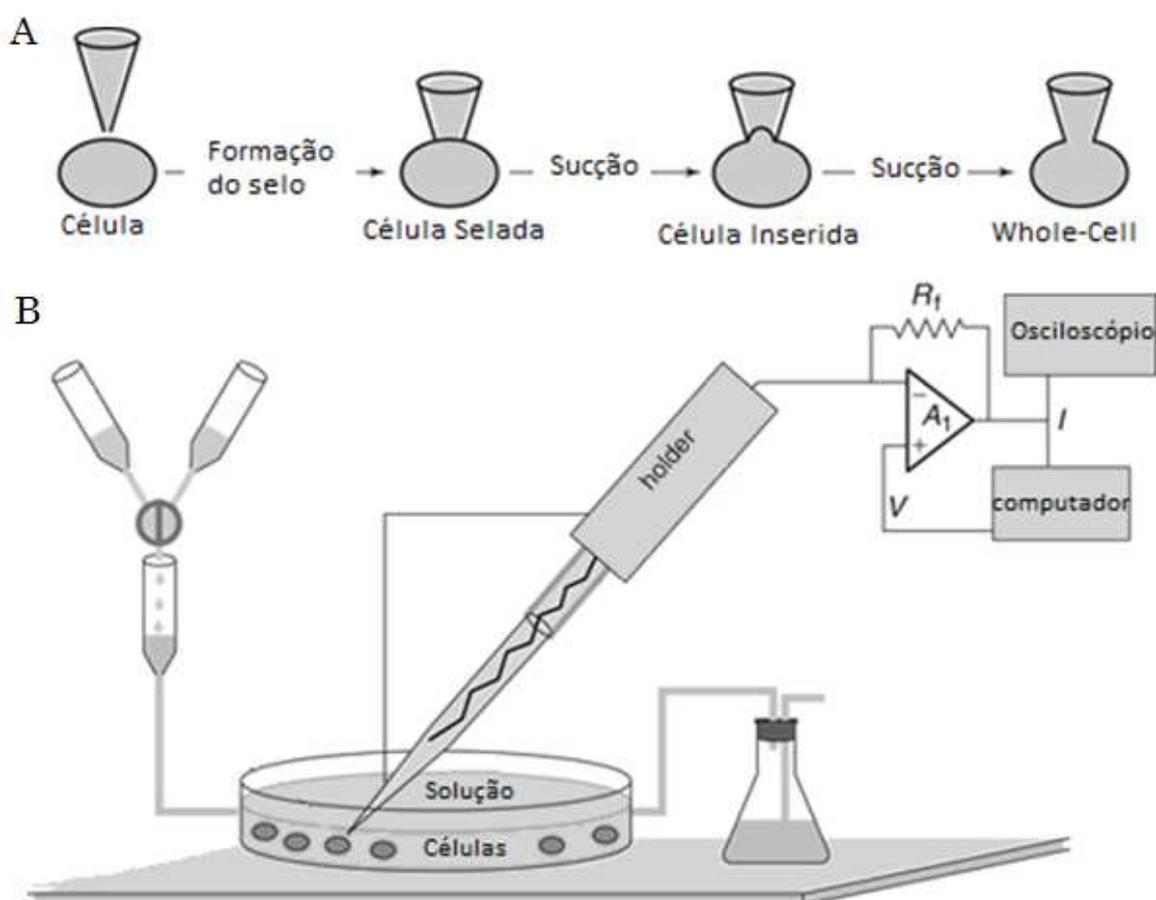


Figura 7 Desenho esquemático do sistema de "Patch Clamp" (A) configuração "Whole Cell"; (B) "set up" para os registros eletrofisiológicos (retirado de: WILLIAM, 2003).

As micropipetas foram confeccionadas a partir de capilares de vidro utilizando-se um estirador (modelo PP-830, Narishige - Japão) e foram preenchidas com a solução interna de acordo com cada tipo de célula. Os registros das correntes iônicas foram

feitos com resistência de 1-3 M Ω , em um amplificador EPC 9- Patch Clamp Amplifier (HEKA - Alemanha). As respostas de corrente foram registradas pelo programa PatchMaster - HEKA. E analisadas com o auxílio do programa Sigma Plot 10.0.

Os peptídeos isolados da peçonha de *T. mattogrossensis* foram ressuspensos em solução externa específica para cada célula testada (1 μ M de cada peptídeo) e microperfundidos o mais próximo da célula no momento do registro de corrente para a análise da atividade sobre os canais para sódio. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

As análises da atividade das toxinas isoladas em “Patch Clamp” foram realizadas em quatro tipos de células diferentes: células imortalizadas HEK (“Human Embryonic Kidney”) que expressam apenas canais Na_v 1.3 e células HEK que expressam apenas Na_v 1.6; células de gânglios da raiz dorsal de rato (DRG – “Dorsal Root Ganglion”); e células neuronais de gânglio do cordão abdominal de barata (DUM – “Dorsal Unpaired Median”).

Todos os testes em “patch clamp” foram realizados no Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Em cooperação com o Professor Doutor Paulo Sérgio Lacerda Beirão.

4.6.2.1- Células imortalizadas HEK

Células imortalizadas HEK que expressam apenas canais Na_v 1.3 e Na_v 1.6, foram cultivadas em meio DMEM com 4,5 g/L de glicose, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (5000 unid. de penicilina e 5 mg de estreptomicina/ml) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram banhadas com a solução externa listada na

Tabela 7, e a micropipeta preenchida com a solução interna listada na Tabela 8.

Tabela 7 Lista de reagentes da solução externa usada nos registros com célula HEK Na_v 1.3 e 1.6.

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	140
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
glicose	15
HEPES	10

pH ajustado para 7,4 com NaOH

Tabela 8 Lista de reagentes da solução de pipeta usada nos registros com célula HEK Na_v 1.3 e Na_v 1.6.

Reagente	Concentração (mM)
CsCl	130
MgCl ₂	1
HEPES	10
EGTA	10
NaCl	5

pH ajustado para 7,2 com CsOH

Foram utilizados, basicamente, dois protocolos eletrofisiológicos. No primeiro, chamado de teste 0 (Figura 8-A), a célula foi mantida no potencial de *holding* de -80 mV, depois foi aplicado um pulso de -120 mV com duração de 100 ms, a fim de que todos os canais de sódio estivessem no estado fechado, e logo após a um pulso teste de 0 mV por 50 ms. No segundo (Figura 8-B), foi aplicado um pré-pulso de -120 mV com duração de 100 ms e partindo do potencial de -80 mV em incrementos de 10 mV (até +80 mV) por 50 ms, para a obtenção de uma relação corrente/voltagem.

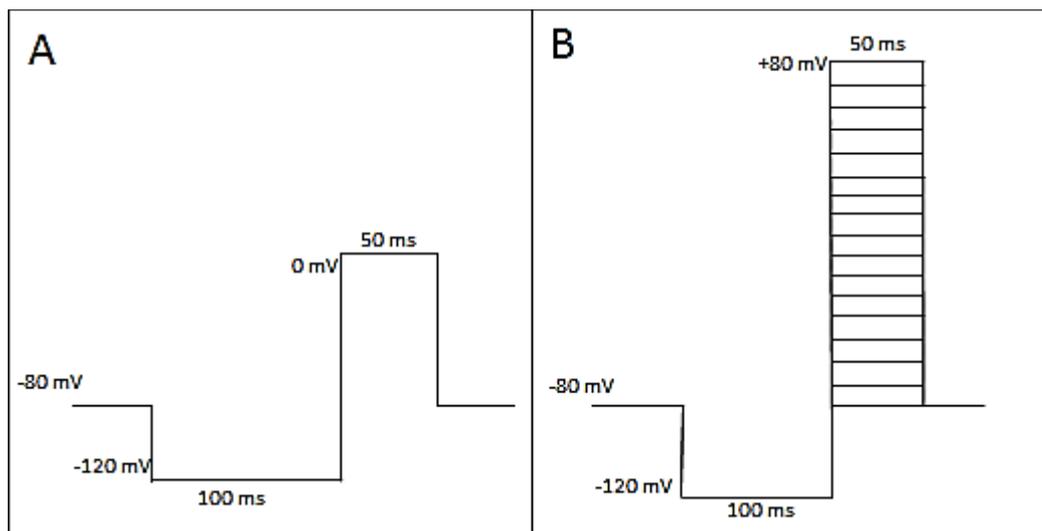


Figura 8 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula HEK. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.

Para complementar a análise da atividade das toxinas sobre os canais de Na_v foram realizados os mesmos protocolos de teste 0 e de corrente x voltagem, porém com um pulso despolarizante de +50 mV por 1 ms antes da aplicação do pulso de 0 mV como no protocolo anterior (Figura 9).

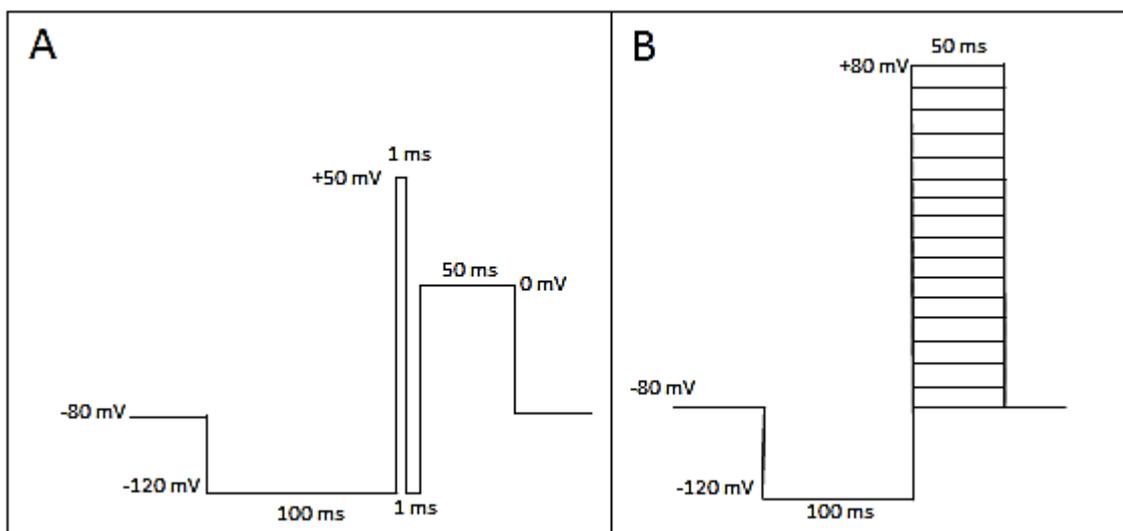


Figura 9 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula HEK com pulso despolarizante de +50 mV antes do pulso teste. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.

4.6.2.2- Células DRG

Outro modelo celular estudado foi com as células neuronais dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). Um espécime de rato macho Wistar (de aproximadamente 250 g) foi decapitado por guilhotinamento e todos os gânglios da raiz dorsal foram removidos e colocados em solução salina 0,9% de NaCl. Posteriormente, passaram por dois processos enzimáticos para a dissociação celular: no primeiro os gânglios foram colocados por 20 min a 37°C em solução de 3 mg de papaína e 2 cristais de cisteína diluídos em 3 ml de rínger de mamífero sem adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} (140 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM de HEPES; 7,5 mM de glicose; pH ajustado para 7,4 com NaOH), posteriormente centrifugados a 500 rpm por 1 min e o sobrenadante descartado. O mesmo procedimento foi feito no segundo processo enzimático, porém com 7,5 mg enzima colagenase tipo II de *Clostridium histolyticum* diluída em 3 ml de rínger. As células foram lavadas e passaram por uma trituração mecânica em meio de cultura HAM F-12, 1% de antibiótico (5000 unid. de penicilina e 5 mg de estreptomicina/ml), plaqueadas e, após 2 h, alimentadas com meio de cultura L-15, 0,5% de antibiótico (5000 unid. de penicilina e 5 mg de estreptomicina/ml), 50 g/ 100 ml de glicose e 1,4% de HEPES. As células foram mantidas em temperatura ambiente por até 72 h.

No momento do registro das correntes de sódio, as células foram banhadas com uma combinação de duas soluções externa: 20% de solução de NaCl (Tabela 9) e 80% de solução cloreto de colina (Tabela 10), essa combinação foi feita para evitar correntes de sódio muito grandes. A solução de preenchimento das micropipetas está listada na tabela de número Tabela 11. As correntes de potássio foram bloqueadas com a presença dos reagentes Cs^+ na solução interna e de TEA nas soluções externas e interna. E as correntes de Ca^{2+} bloqueadas por Cd^{2+} e Ni^{2+} nas soluções externas.

Tabela 9 Lista de reagentes para a solução externa de NaCl para registros com células DRG.

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	115
KCl	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
HEPES	10
TEA-Cl	20
CdCl ₂	0,2
NiCl ₂	0,2
glicose	5

pH ajustado para 7,4 com NaOH

Tabela 10 Lista de reagentes para a solução externa de cloreto de colina para registros com células DRG.

Reagente	Concentração (mM)
ChoCl	115
KCl	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
HEPES	10
TEA-Cl	20
CdCl ₂	0,2
NiCl ₂	0,2
glicose	5

pH ajustado para 7,4 com ChoOH

Tabela 11 Lista de reagentes da solução interna de pipeta para registros com células DRG.

Reagente	Concentração (mM)
CsF	100
NaCl	20
HEPES	10
EGTA	11
TEA-Cl	10
MgCl ₂	5

pH ajustado para 7,2 com CsOH

Também foram usados dois protocolos eletrofisiológicos. No primeiro, teste 0 (Figura 10-A), a célula foi mantida em “holding potencial” de -80 mV, depois um pulso de -120mV foi aplicado com duração de 100 ms, para que todos os canais para sódio se fechem, e logo após a um pulso teste de -20 mV por 100 ms. No segundo protocolo, um pré-pulso de -100 mV foi aplicado com duração de 100 ms e partindo do potencial de -120 mV em incrementos de 10 mV (até +30 mV) por 100 ms, para a obtenção da relação corrente/voltagem (Figura 10-B).

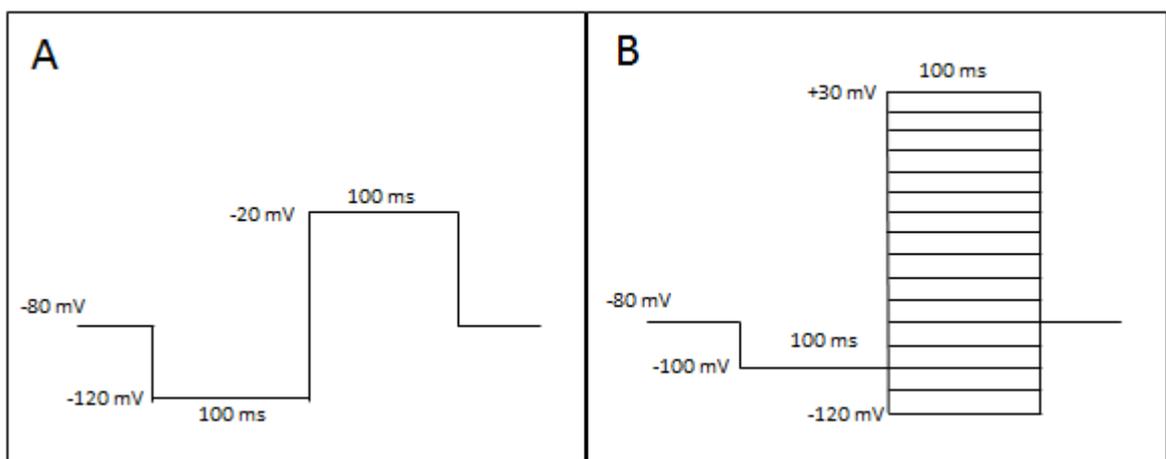


Figura 10 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula DRG. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.

4.6.2.3- Células DUM

Nesse protocolo foram usadas células neuronais de insetos (DUM). Para isso, foram usadas 10 baratas da espécie *Periplaneta americana*. As baratas foram eutanasiadas por congelamento e o último gânglio do cordão nervoso abdominal, de cada uma das baratas, foi removido para a dissociação celular. Os gânglios foram inicialmente condicionados em solução salina para baratas (200 mM de NaCl; 3,1 mM de KCl; 5 mM de CaCl₂; 4 mM de MgCl₂; 10 mM de HEPES; 50 mM de sacarose; pH ajustado para 7,4 com NaOH). Posteriormente, esses gânglios passaram por um processo enzimático com 3 mg de colagenase tipo 1A de *Clostridium histolyticum* diluída em 3 ml de solução salina, por 45 min a 37°C. A solução foi centrifugada por 25 s a 5000 rpm e o sobrenadante descartado. A enzima foi lavada 3 vezes com 3 ml meio SSAS (solução salina, 2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico - 5000 unid. de penicilina e 5 mg de estreptomicina/ml). Por último, as células passaram por uma trituração mecânica, plaqueadas e alimentadas, após 2 h, com o mesmo meio. As células foram mantidas a temperatura ambiente por até 24 h. As soluções externa e interna usadas no registro estão listadas nas Tabela 12 e Tabela 13, respectivamente.

Tabela 12 Lista de reagentes da solução externa para registros eletrofisiológicos com células DUM.

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	100
TEA-Cl	100
KCl	3,1
CdCl ₂	0,05
CaCl ₂	2
MgCl ₂	7
4-aminopiridina	3
HEPES	20

pH ajustado para 7,3 com TEA-OH

Tabela 13 Lista de reagentes da solução interna de pipeta para registros com células DUM.

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	15
CsCl	80
EGTA	5
HEPES	10
ATP-Mg ²	2
MgCl ₂	1

pH ajustado para 7,3 com CsOH

Os dois protocolos eletrofisiológicos usados para a célula DUM foram: No primeiro, teste 0 (Figura 11-A), a célula foi mantida no potencial de *holding potencial* de -90 mV, depois foi aplicado um pulso de -120 mV com duração de 100 ms, para que os canais para sódio se fechem, e logo após a um pulso teste de 0 mV por 50 ms. No segundo, para a obtenção de uma relação corrente/voltagem, foi aplicado um pré-pulso

de -100 mV com duração de 100 ms e partindo do potencial de -120 mV em incrementos de 10 mV (até +30 mV) por 100 ms (Figura 11-B).

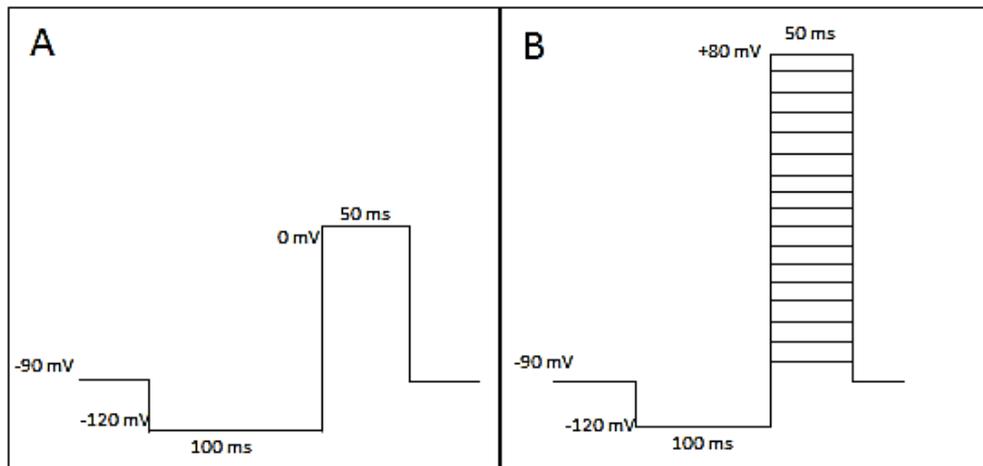


Figura 11 Desenho esquemático dos protocolos de registros para célula DUM. (A) Protocolo teste 0; (B) Protocolo de corrente x voltagem.

5. RESULTADOS

O ensaio preliminar eletrofisiológico com a técnica “Single Sucrose-gap” realizado preliminarmente com a peçonha bruta (0,264 mg) sugere a presença de neurotoxinas que agem em canais para Na_v . Esses efeitos são evidenciados pelo retardo da repolarização e a redução da amplitude do potencial de ação composto, quando comparados com o controle (Figura 12).

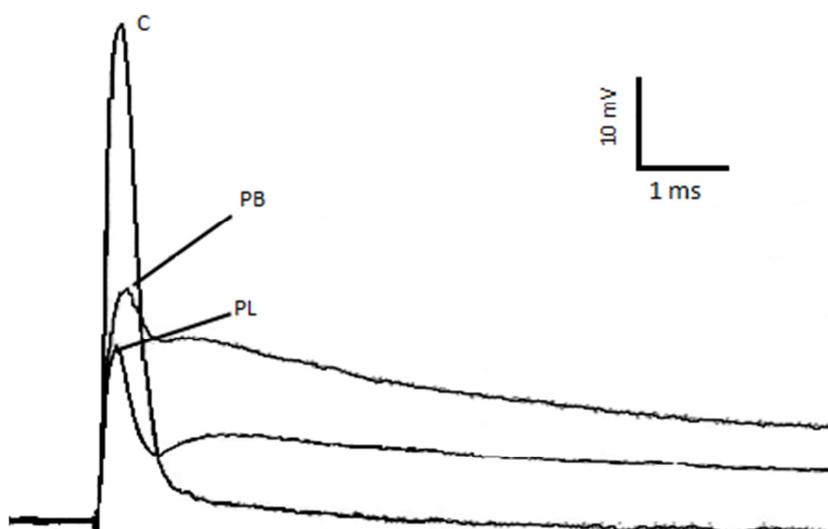


Figura 12 Efeito da peçonha bruta de *T. matogrossensis* (0,264 mg) sobre o potencial de ação composto do nervo ciático de rã, na técnica de “Single Sucrose-Gap”. (C) Controle; (PB) Redução do potencial após 1 minuto da aplicação da peçonha bruta; (PL) após 8 minutos de lavagem, mostrando que a ação é irreversível (n=1).

A separação preliminar por cromatografia coluna analítica C18 Phenomenex Synergi Hidro 4,60 x 250 mm, leitura a 216 nm) de 1 mg de peçonha de *T. matogrossensis* com a variação de solventes binários com até 100% de B mostrou que as frações de interesse eluem até os 60% de acetonitrila (Figura 13).

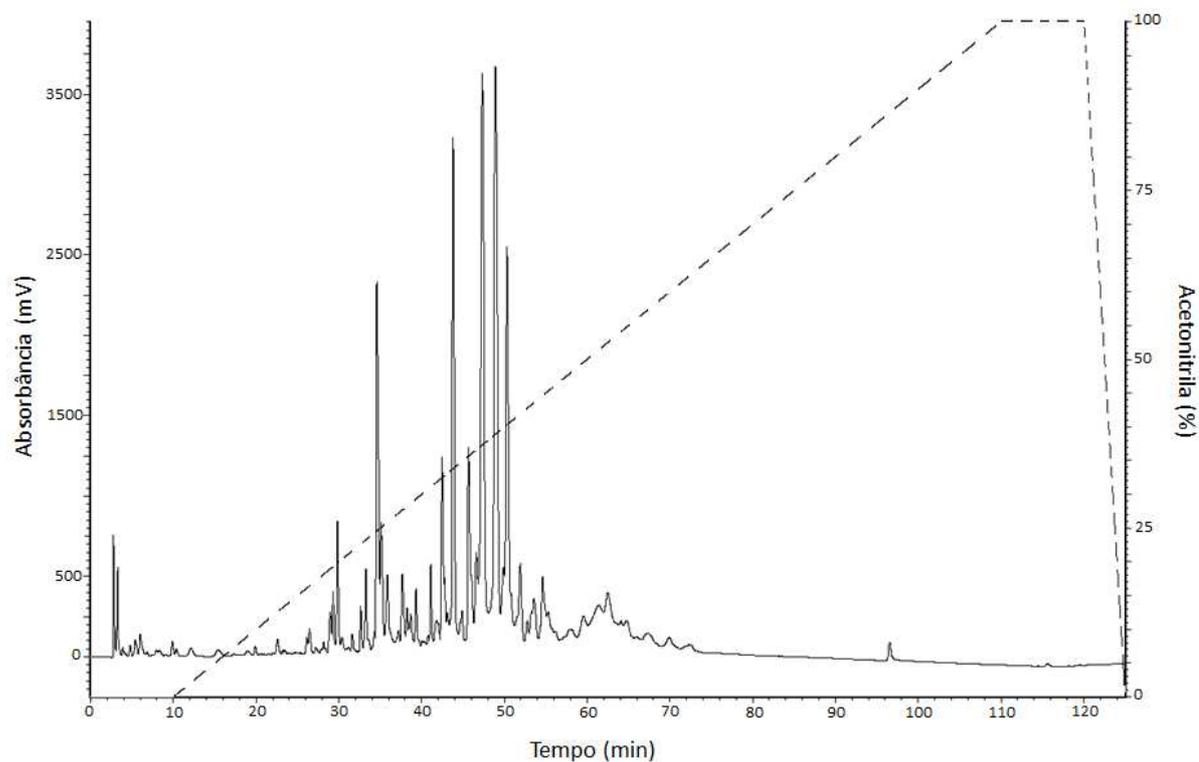


Figura 13 – Cromatografia preliminar da peçonha bruta de 1 mg *T. mattogrossensis* com o gradiente de acetonitrila crescente até 100%. O perfil mostra a eluição das frações com até 70 min.

A separação por CLAE-FR (coluna analítica C18 Phenomenex Synergi Hidro 4,60 x 250 mm, leitura a 216 nm) de 1 mg de peçonha de *T. mattogrossensis* com até 60% de solvente B apresentou um perfil cromatográfico com 67 frações, sendo 7 frações predominantes enumeradas na Figura 14.

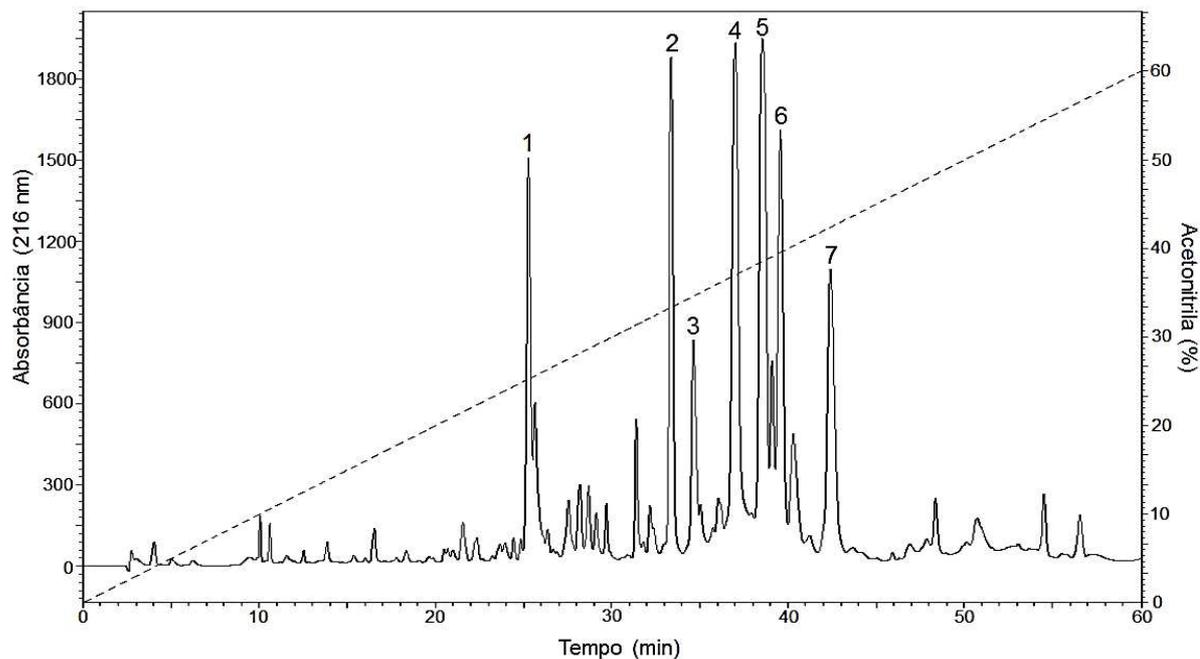


Figura 14 Cromatograma da peçonha bruta (0,6 mg) de *Tityus mattogrossensis*. São indicadas as 7 frações cromatográficas mais abundantes usadas nesse trabalho. As corridas foram realizadas em coluna analítica C18 Phenomenex Sinergi Hidro (4,60 x 250 mm) e as frações detectadas a 216 nm, com fluxo de 1 ml/min e gradiente de acetonitrila de acordo com a metodologia descrita no texto (linha pontilhada).

Com o intuito de encontrar os peptídeos neuroativos da peçonha de *T. mattogrossensis*, as 7 frações cromatográficas mais abundantes destacadas na Figura 14 foram testadas, individualmente, na técnica de “Single Sucrose-Gap”. E as massas moleculares presentes nessas frações foram elucidadas por meio de espectrometria de massas (Maldi-TOF). Os resultados estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 Quadro resumo das 7 frações mais abundantes na peçonha do escorpião *T. mattogrossensis*.

Fração	Quantidade de Sub-frações	Massa (m/z)	Efeito sobre o nervo de rã
1	5	3343,2; 3950,7; 4008,7; 4108,6; 5732,5; 5838,2; 5843,7; 8480,9	Não
2	2	1082,0; 2340,2; 2355,2; 3122,0; 4008,6; 4340,6; 6945,2; 7030,2; 7120,2; 7195,9; 7340,6	Retardo da repolarização do potencial de ação, irreversível
3	3	1048,5; 1516,7; 1782,4; 1809,4; 5313,9; 5378,7; 5557,8; 7046,7; 7195,4; 7219,0; 7758,9	Não
4	5	1155,8; 1992,5; 2637,3; 4045,7; 4118,7; 4200,2; 5430,8; 5730,0; 6095,5; 6150,1; 6244,7; 7096,8; 7243,3; 7295,8; 8009,2; 8250,5; 8280,7; 8317,3; 9437,4	Não
5	3	4369,7; 5380,1; 5591,4; 6025,3; 6875,4; 7115,4; 7312,0; 7332,3; 7611,1; 8247,7; 8355,6; 11007,1	Redução do potencial de ação, irreversível
6	3	1082,0; 1096,6; 1112,6; 1155,8; 1705,3; 1907,3; 2545,6; 5451,3; 5730,4; 6874,6; 6889,2; 7094,5; 7112,8; 7119,3; 7129,8; 7316,0	Redução do potencial de ação, irreversível
7	3	1828,3; 2496,7; 2567,9; 5295,0; 5735,3; 6363,6; 6775,4; 6962,5; 7139,2; 7267,2; 7723,9	Redução do potencial de ação, irreversível

Das sete frações analisadas, em apenas 4 foi observada a atividade sobre o nervo de rã. Sendo que a fração de número 2 obteve-se a atividade de retardo da repolarização do potencial de ação. E nas frações de número 5, 6 e 7 foi observada a redução do potencial de ação. Com isso, foi dada a continuidade aos estudos com essas toxinas e, para isso, as frações 5 e 6 foram escolhidas para serem os focos do trabalho.

5.1 Fração 2

A fração cromatográfica número 2 foi testada no ensaio eletrofisiológico “Single Sucrose-Gap” onde foi observado um retardo na repolarização do potencial de ação composto (Figura 15). A ação da fração 2 foi irreversível após a lavagem.

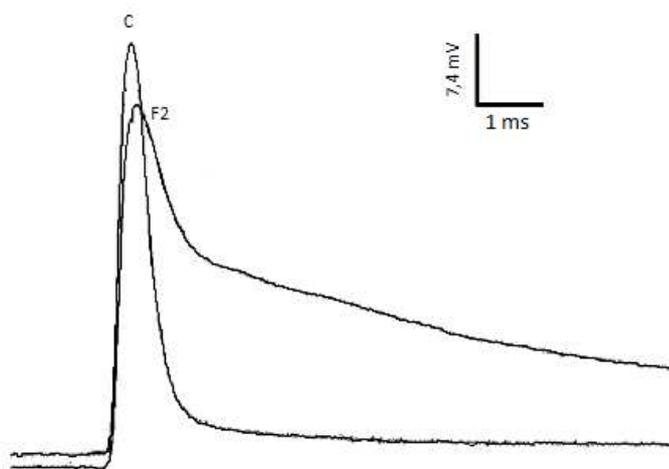


Figura 15 Ensaio eletrofisiológico de “Single Sucrose-Gap” mostra o potencial de ação composto de nervo ciático de rã. (C) Controle; (F2) atividade da fração 2 de *T. matogrossensis* após 40 min da aplicação da fração. O teste mostra um retardo na repolarização do potencial de ação composto, atividade característica de α -NaScTx, essa atividade não foi reversível após a lavagem.

Na recromatografia da fração número 2 (CLAE-FR coluna analítica C18 Phenomenex Luna 4,60 x 150 mm, 3 micron, leitura a 216 nm), foram encontradas 2 sub-frações predominantes denominadas 2A e 2B, ilustradas na Figura 16-B.

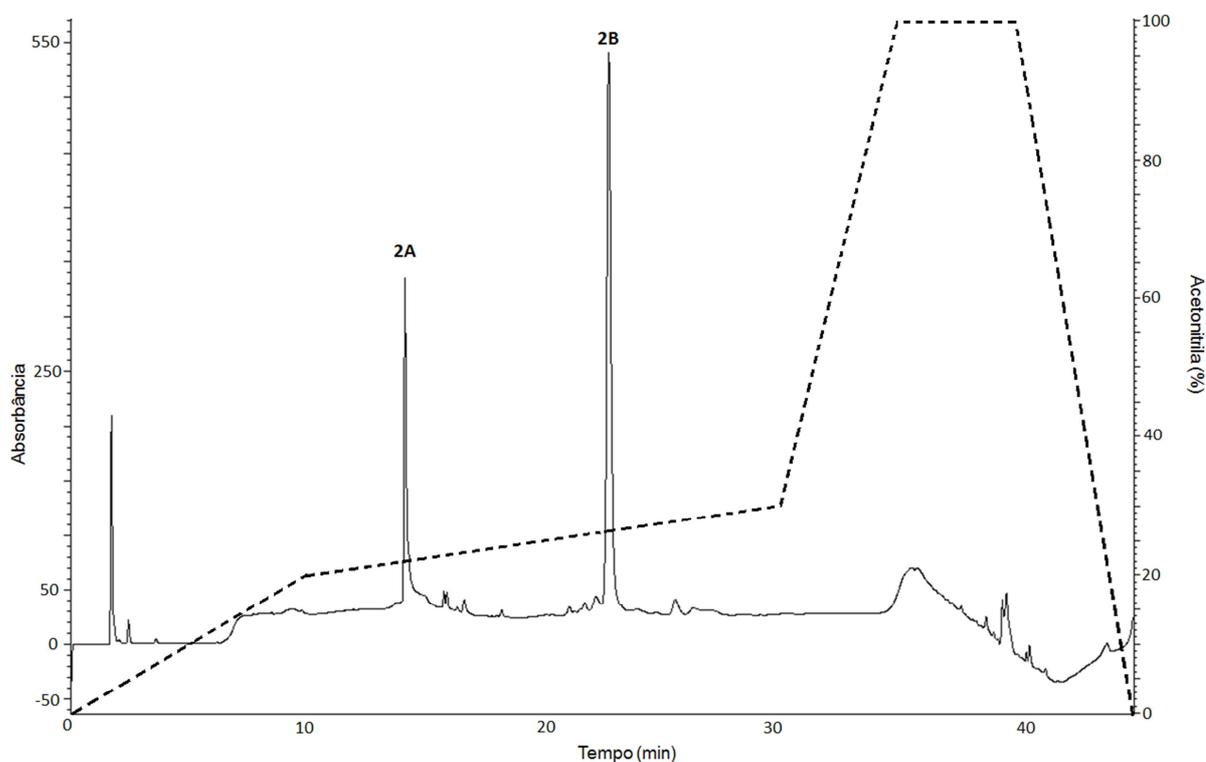


Figura 16 Recromatografia da fração 2 mostrando dos picos abundantes, sub-fração A e B (CLAE-FR coluna analítica C18 Phenomenex Luna 4,60 x 150 mm, 3 micron, leitura a 216 nm). O gradiente de acetonitrila está indicado com a linha pontilhada.

Porém, quando testadas as duas sub-frações (2A e 2B) separadamente não foi observada a atividade de retardo da repolarização como na fração total. Isso pode ter ocorrido pelo fato das duas sub-frações agirem em sinergismo. Ou a atividade seja de uma das pequenas sub-frações do cromatograma que não foram ainda testadas. Mais estudos devem ser realizados.

5.2 Fração 5

A fração 5 (54,73 μM) mostrou atividade de bloqueio de 40% potencial de ação composto em nervo de rã (Figura 17), que é característica de $\beta\text{-NaScTx}$. Todavia, para a melhor caracterização do princípio ativo e sua ação farmacológica faz-se necessário o uso de outros métodos, como a caracterização química do peptídeo e a análise da atividade eletrofisiológica em “patch clamp”.

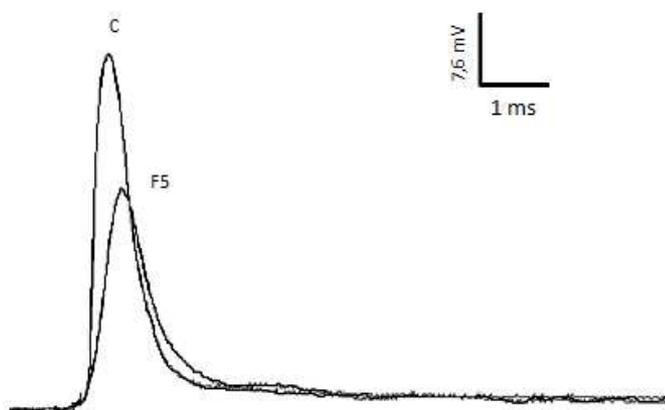


Figura 17 Análise eletrofisiológica da fração cromatográfica 5 (54 μM) em “Sucrose-Gap” em nervo de rã, após 40 min de aplicação da fração. Mostra a uma redução de 40% do potencial de ação composto. (C) Controle; (F5) Atividade após a aplicação da Fração 5.

A sub-fração mais abundante na recromatografia da fração 5 (F5) foi recromatografada (Figura 18-A) e um próximo passo de cromatografia foi feito para o processo de purificação (Figura 18-B). O grau de pureza e a massa média (7312,0 m/z) foram analisados por Maldi/TOF no modo linear (Figura 19). A sua massa monoisotópica de 7308,5 m/z foi elucidada por espectrometria de massa do tipo

MicOTOF-QII, e calculada por meio do íon de sete cargas com programa de análise Bruker Compass.

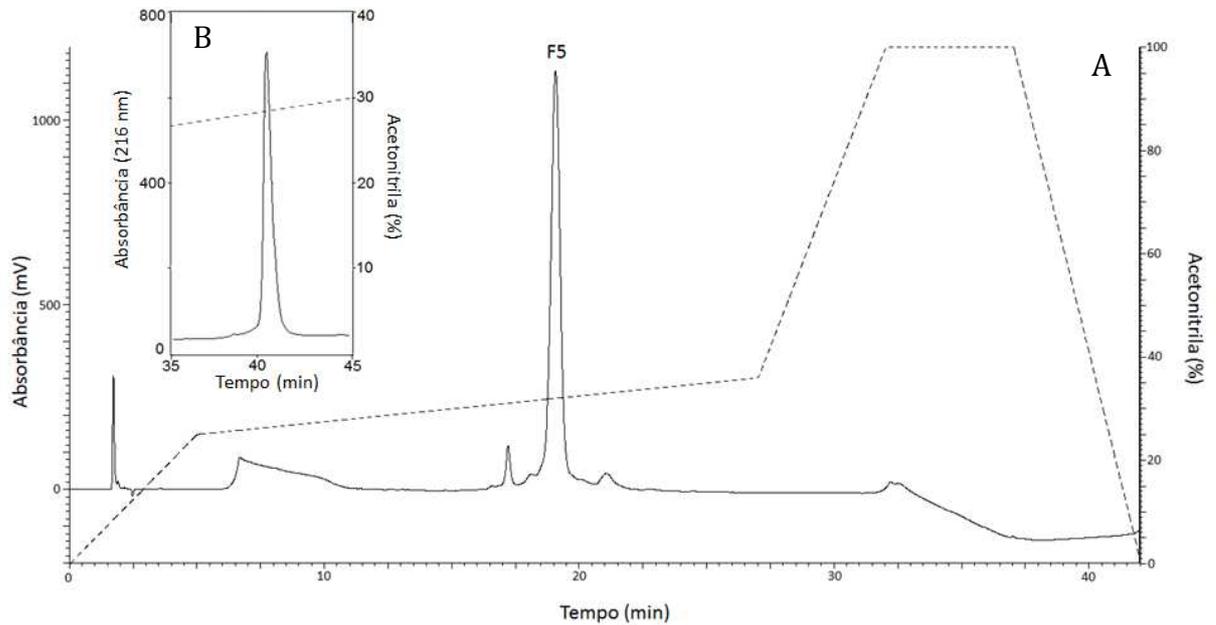


Figura 18 (A) Recromatografia da fração 5 e (B) um novo passo de recromatografia da F5 em CLAE-FR coluna analítica Luna, leitura a 216 nm, fluxo de 1 ml/min, com gradiente otimizado de acetonitrila (linha pontilhada).

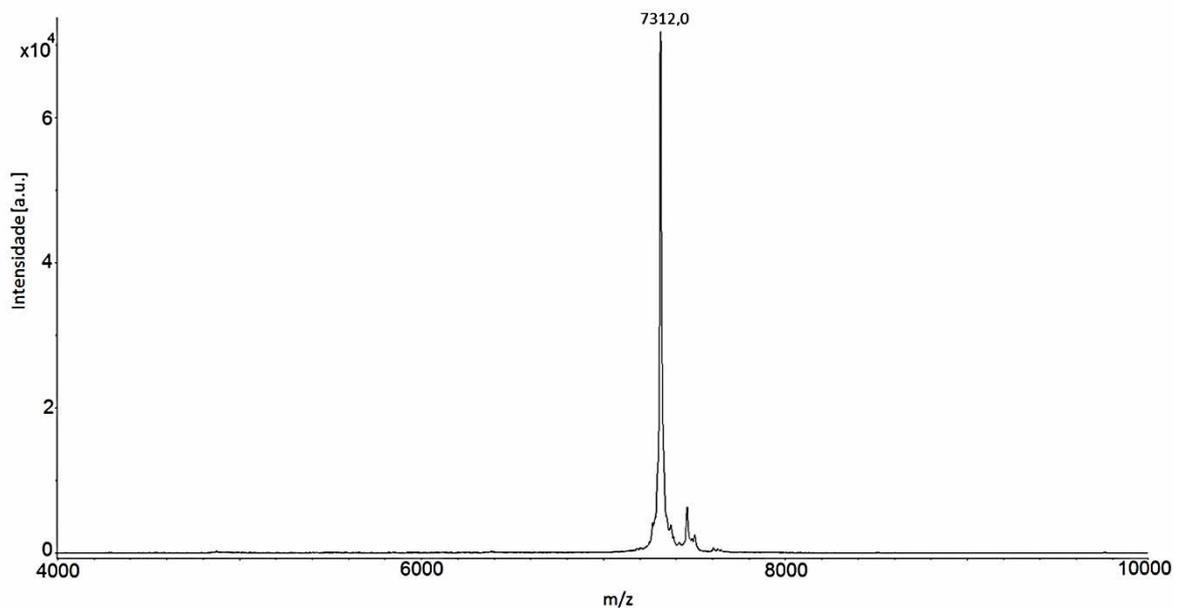


Figura 19 Espectro de massa linear positivo em Maldi/TOF da F5, mostrando o grau de pureza relativo e a massa média do peptídeo.

O sequenciamento “de novo” do peptídeo foi realizado de duas maneiras. Inicialmente, por Maldi/TOF com a fragmentação na fonte (ISD), onde o peptídeo puro é

adicionado a uma matriz redutora (DAN). Essa metodologia nos permite observar fragmentos em série C, a partir de 1000 Da. Foi possível elucidar apenas 8 resíduos de aminoácidos da sequência (Figura 20).

Outra forma de sequenciamento “de novo” realizado foi a digestão do peptídeo, reduzido e alquilado, por tripsina. Os fragmentos trípticos foram fragmentados por lift em Maldi/TOF. E seus fragmentos (Tabela 15) foram sobrepostos para a complementação da sequência.

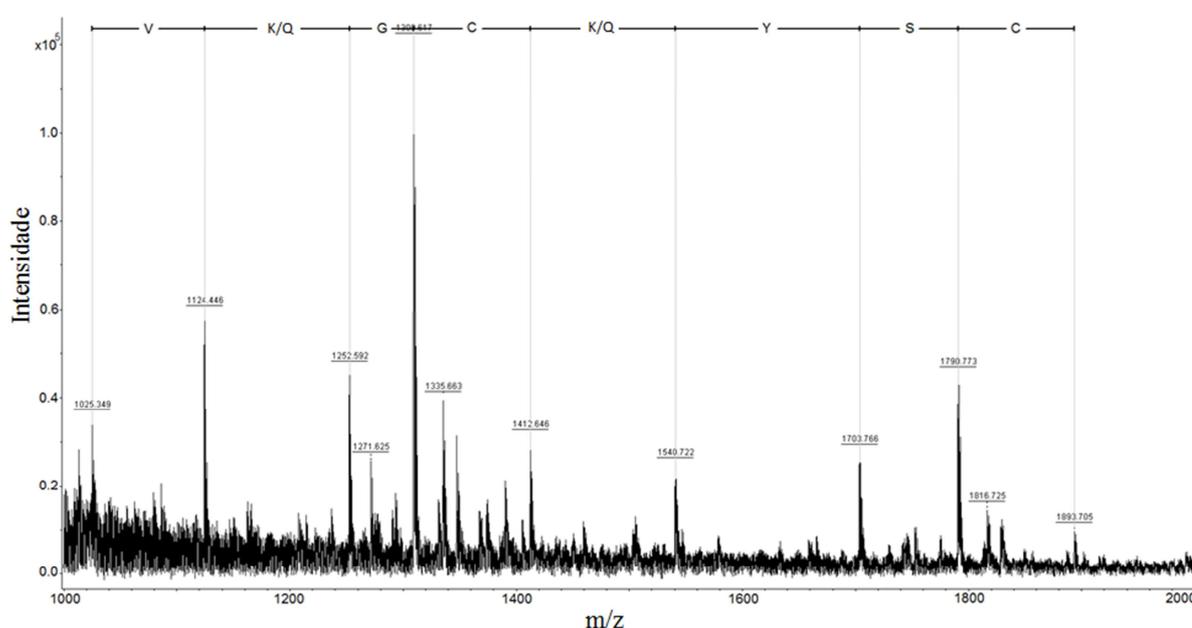


Figura 20 Sequenciamento “de novo” da fração 5 pura da peçonha de *T. mattogrossensis* por MALDI/Tof com fragmentação na fonte (ISD); matriz DAN. Foram obtidos 8 resíduos de aminoácidos na série C.

Tabela 15 Sequências dos fragmentos trípticos obtidos por Maldi/TOF MS.

Massas dos Fragmentos(m/z)	Sequências dos fragmentos
654,19	GFCDR
845,33	YSCFI/LR
937,33	PWGFCDR
1046,38	CYCYGVPK
1128,46	YSCFI/LRPW
1380,56	NEPVWDYDTNK
1763,74	YSCFI/LRPWGFCDR
2513,91	TNMSAASGYCAWPACYCYGVPK
4024,64	DHVK/QGCK/QYSCFI/LRPWGFCDRYCK/QTNMSAASGY

O cálculo de cisteínas realizado após a redução e alquilação do peptídeo, mostrou a presença de 8 cisteínas. E isso foi comprovado na sequência parcial obtida (Figura 14). Com as metodologias utilizadas não foi possível elucidar a extremidade N-terminal da F5, com isso, será necessário utilizar outros métodos.

A sobreposição das sequências dos fragmentos trípticos e da pequena sequência obtida por ISD formou a seguinte sequência parcial para F5:

DHVK/QGCK/QYSCFI/LRPWGFCDRYCK/QTNMSAASGYCAWPACYCYGVKNEPV
WDYDTNKC – 57 resíduos.

Quando comparada a sequência parcial obtida para a F5 com o banco de dados utilizado, Blast, foi obtida 77% de similaridade com a toxina Tb2-II (P60276), 75% com Tb2 (P56609) e 63% com Tb-1 de *Tityus bahiensis*; 75% de similaridade com a toxina Ts2 (P68410), 63% com a toxina Ts1 (1B7D_A) de *Tityus serrulatus*; e também obteve 57% e 51% de similaridade com as toxinas putativas de *Tityus discrepans* (P0C1X7) e *Tityus zulianus* (Q1I165), respectivamente. Quando retiradas as sequências do peptídeo sinal dessas últimas, por meio do programa ExPASy, as sequências mostram alta similaridade com a F5. O alinhamento da estrutura primária parcial de F5 com as sequências de alta identidade (

Toxina	Sequência	Referênc.
F5	-----DHVKGCKYSCFIRPWGFCDRYCKTNMSAASGYCAWPACYCYGVKNEPVWDYDTNKC	57
Tb2II	KEGYAMDH-EGCKFSCFIRPSGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVWDYATNKC	62 P60276
TsII	KEGYAMDH-EGCKFSCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVDPHIKVWDYATNKC	62 P68410
Tb2	KEGYAMDH-EGCKFSCFPRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVWDYATNKC	62 P56609
Tz2	KEGYLLDKSNGCKRSCFFGSTSWCNTECKSK-SAEKGYCAWPSCYCYGFSDDSKMWDLKTNKC	62 Q1I165
Ts1	KEGYLMDH-EGCKLSCFIRPSGYCGRECGIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	61 1B7D_A
Ardiscret.	KNGYIIEP-KGCKYSCFWGSSTWCNRECKFK-KGSSGYCAWPACWCYGLPDNVKIFDYNNKC	61 P0C1X7
	: :*** ** . :*. * : ..:*****:***:.. ::* .***	

Figura 21 Alinhamento da sequência parcial de F5 com as sequências de alta identidade de outras toxinas escorpiônicas já conhecidas. Os resíduos de aminoácidos em destaque mostram a alta conservação do padrão de cisteínas.

Todas essas sequências com alta identidade à F5 são descritas como toxinas escorpiônicas do tipo β . O que indica que a F5 pode ser uma β -NaScTx. Porém, para se saber a real atividade desse peptídeo neurotóxico, foram feitos testes eletrofisiológicos com 4 tipos de células neuronais em “patch clamp”. Foram usadas células imortalizadas HEK que expressam apenas canais Na_v 1.3 e HEK que expressam Na_v 1.6, células de gânglios da raiz dorsal de rato (DRG) e células neuronais de gânglio do cordão abdominal de barata (DUM).

Os resultados eletrofisiológicos preliminares feitos com 1 μM de F5 mostraram uma atividade de redução de corrente de sódio, em protocolo de teste 0, de 71,5% (n=1) em canais Na_v 1.3 (Figura 22) e de $63,3 \pm 7\%$ (n=3) de redução em Na_v 1.6 (Figura 23). E em células dissociadas de insetos (DUM) a F5 mostrou um efeito considerável de $35 \pm 4,1\%$ (n=5) de redução de corrente de sódio (Figura 24). Já em células dissociadas de mamífero (DRG) obteve-se um efeito de 13,2 (n=2) de inibição de correntes de sódio (Figura 25), todavia mais repetições de cada experimento deve ser realizados para a comprovação de sua atividade. Os registros de corrente X voltagem não puderam ser aproveitados.

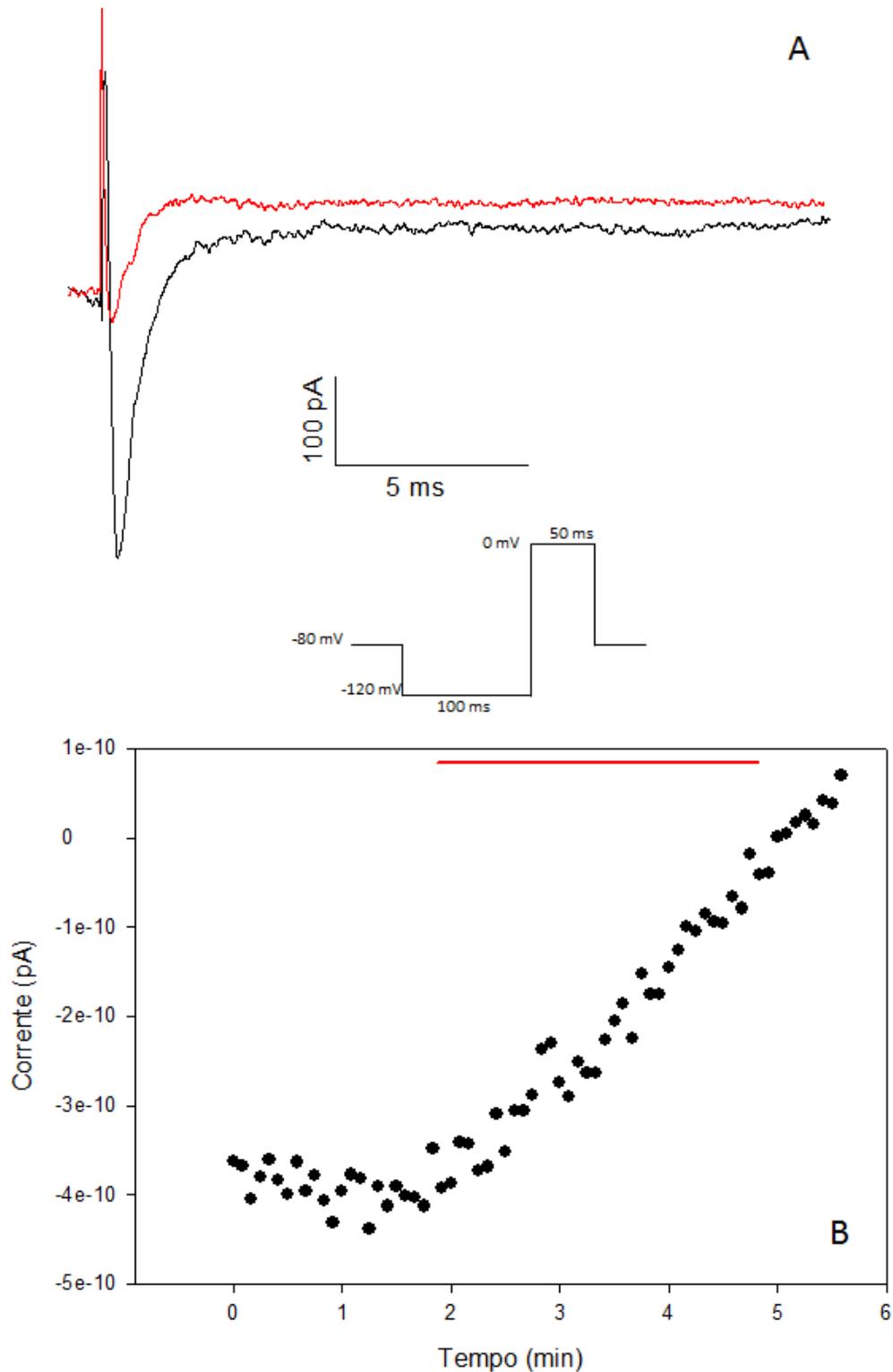


Figura 22 Teste representativo de “patch clamp” em modo “whole-cell” em célula HEK Na_v 1.3, com $1 \mu\text{M}$ de F5 ($n=1$). (A) Atividade da toxina F5 (vermelho) em relação ao controle (preto), mostra uma redução de 71,5% da corrente; (B) Porcentagem de inibição da corrente de acordo com o tempo quando adicionada a toxina F5 (vermelho).

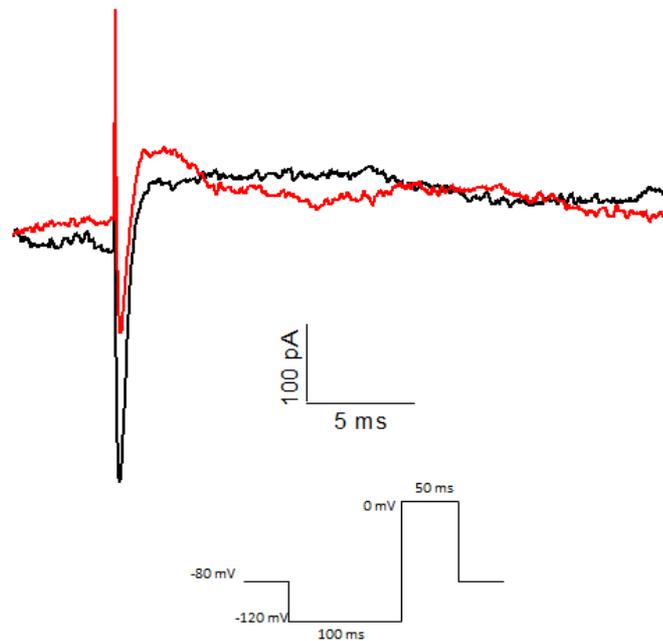


Figura 23 Teste representativo de “patch clamp” no modo “whole-cell” com 1 μM de F5 em células HEK Na_v 1.6. Gráfico representativo da atividade da toxina F5 de $63,3 \pm 7\%$ ($n=3$) de redução da corrente de sódio de canais Nav 1.6.

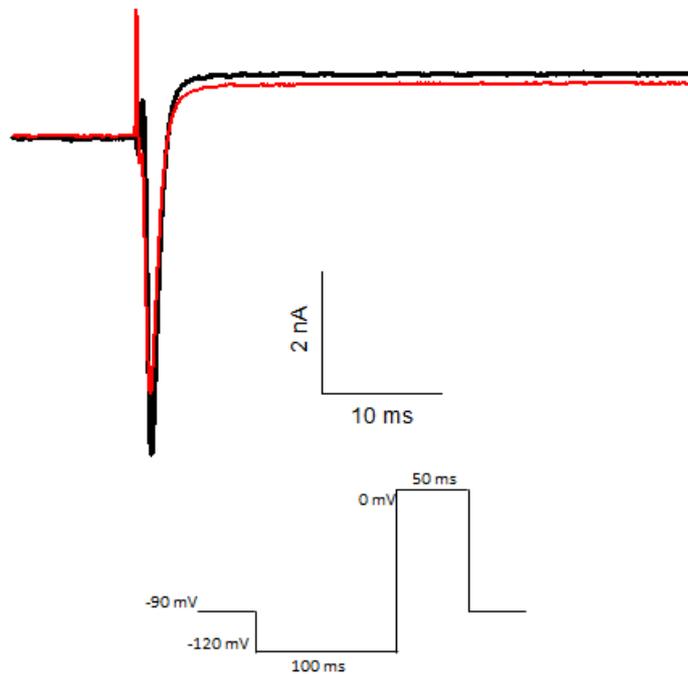


Figura 24 Registro representativo da atividade da toxina F5 (1 μM) de redução da corrente de sódio em $35 \pm 4,1\%$ ($n=5$). Teste eletrofisiológico de “patch clamp” no modo “whole-cell” sobre células dissociadas do gânglio do cordão abdominal (DUM) da barata *Periplaneta americana*.

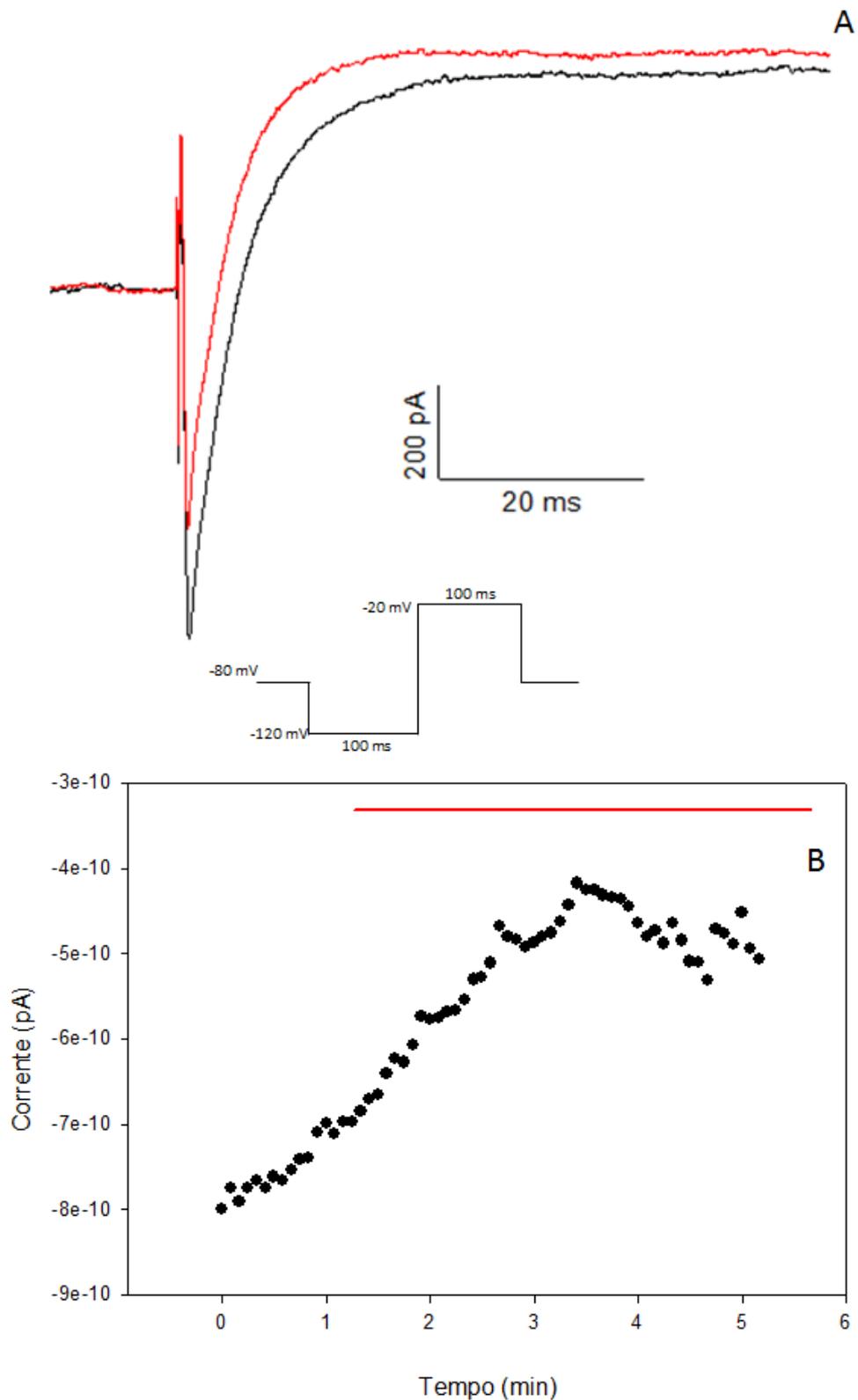


Figura 25 Resultado representativo de “patch clamp” em modo “whole-cell” realizado em células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). (A) Gráfico representativo da atividade, $13,2 \pm 7\%$ ($n=2$), da toxina F5 sobre a corrente de sódio de células DRG; (B) Gráfico de curso temporal que mostra a atividade da toxina F5 sobre a porcentagem de corrente de acordo com o tempo, a linha vermelha indica o momento da perfusão da toxina.

5.3 Fração 6

A fração cromatográfica de número 6 (F6) mostrou uma atividade de redução de 62,5% do potencial de ação composto em teste eletrofisiológico de “Single Sucrose-Gap” (Figura 26). Essa atividade é característica de toxinas escorpiônicas do tipo β (β -NaScTx). Para a melhor caracterização química e farmacológica do princípio ativo, essa fração também foi submetida a outros passos cromatográficos, espectrometria de massa e testada em “patch clamp”.

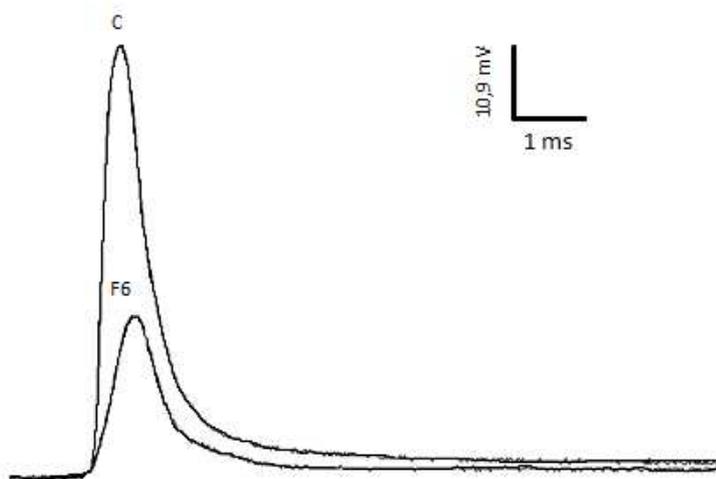


Figura 26 Registro representativo da análise eletrofisiológica da fração 6 (não quantificada) em “Sucrose-Gap” em nervo de rã, após 40 min de aplicação da fração. Mostra a uma redução de 62,5% do potencial de ação composto.

A recromatografia da fração 6 mostrou a presença de 3 sub-frações, porém com apenas uma mais abundante, que passou a ser chamada de F6 (Figura 27). O grau de pureza e a massa média da F6 de 7112,8 m/z foi obtida por Maldi/TOF no modo linear (Figura 28). E a massa monoisotópica de 7108,0 m/z por espectrometria de massa do tipo MicOTOF-QII, e calculada pelo programa de análise Bruker Compass usando o íon de sete cargas.

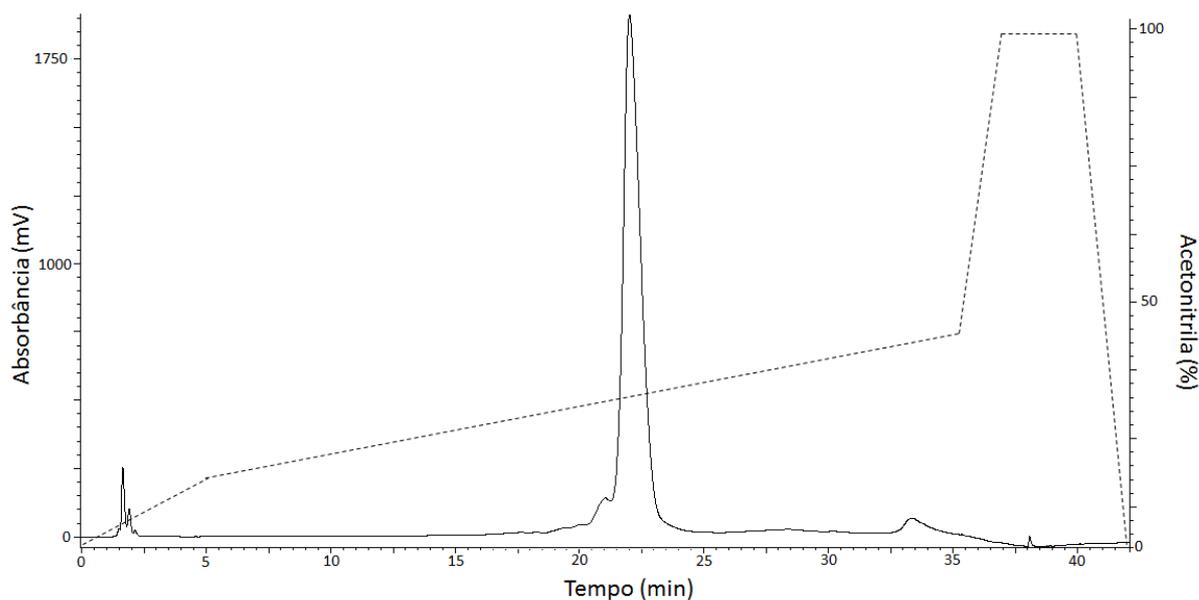


Figura 27 Segundo passo de Recromatografia da fração 6 da peçonha de *T. mattogrossensis*. Esta apresenta uma fração mais abundante, CLAE-FR coluna analítica Luna, leitura a 216 nm, fluxo de 1 ml/min . Com gradiente otimizado de acetonitrila (linha pontilhada).

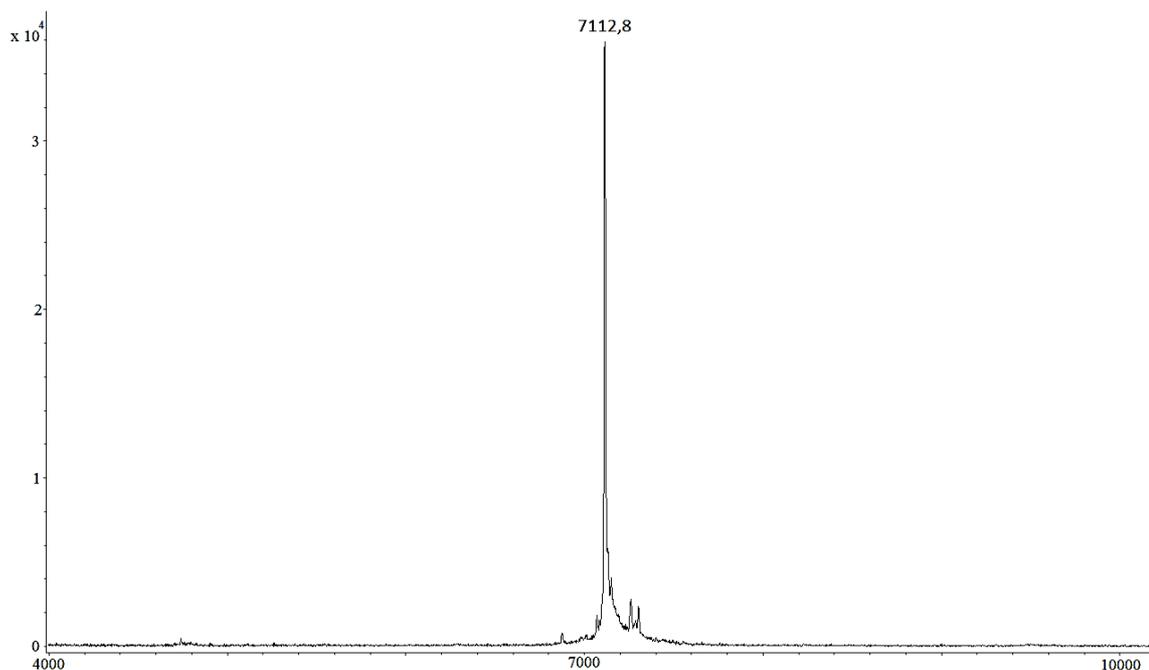


Figura 28 Espectro de massa linear positivo em Maldi/TOF de F6, mostrando o grau de pureza e a massa média do peptídeo.

Assim como o F5, o peptídeo F6 também passou por dois processos de sequenciamento “de novo”. O primeiro por Maldi/TOF com a fragmentação na fonte (ISD). Com essa metodologia foram obtidos 37 resíduos de aminoácidos da sequência primária (Figura 29). E a segunda, por digestão por tripsina do peptídeo reduzido e

alquilado. Os fragmentos trípticos foram fragmentados por lift em Maldi/TOF. E seus fragmentos, mostrados na Tabela 16, foram sobrepostos para a complementação da sequência.

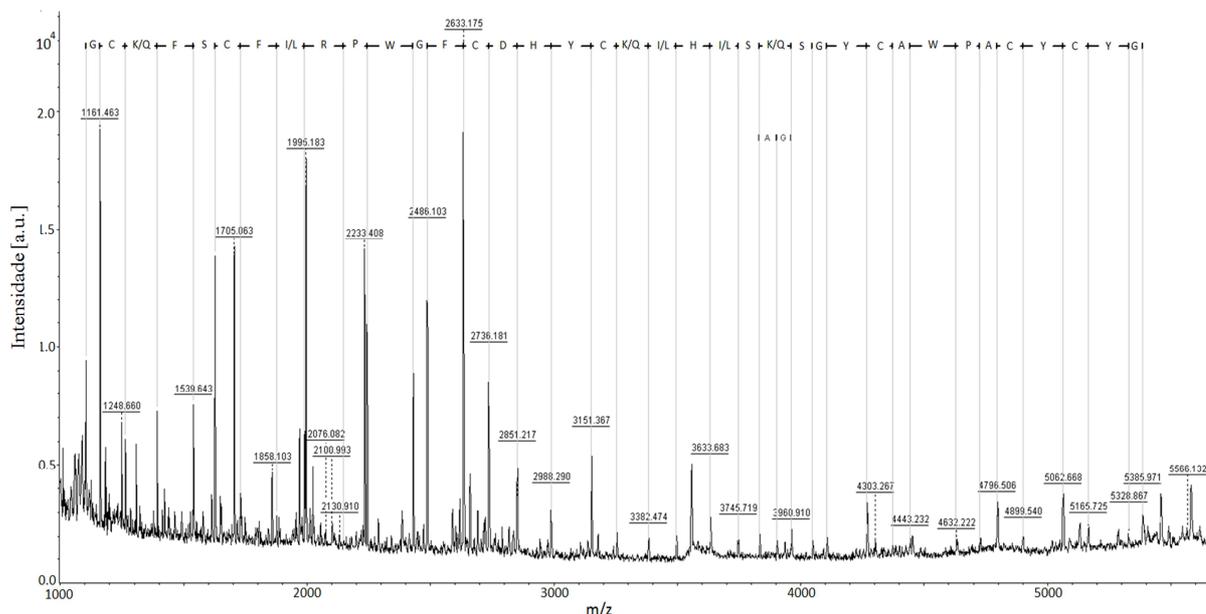


Figura 29 Sequenciamento da F6 por Maldi-TOF com fragmentação na fonte (ISD). Foram obtidos 37 resíduos de aminoácidos.

Tabela 16 Massas e sequências dos fragmentos trípticos obtidos pela digestão do peptídeo F6. A fragmentação foi feita por lift Maldi/TOF.

Massas dos Fragmentos (m/z)	Sequências dos fragmentos
1402,57	K/QEGYPTPHEGCK
1489,67	I/LHI/LSK/QSGYCAWPA
1703,75	GVPDNEPVWNYATNK
2179,86	FSCFI/LRPWGFC DHYCK
2349,92	CYCYGVPDNEPVWNYATNK

O cálculo de cisteínas realizado após a redução e alquilação do peptídeo, mostrou a presença de 8 cisteínas. Com as metodologias utilizadas foi possível elucidar 62 resíduos de aminoácidos. Porém a massa molecular do peptídeo (7308,5 m/z) não é a mesma da soma das massas dos resíduos de aminoácidos da sequência encontrada (7069,05), sendo que essa possui 39 Da a menos que a massa de F6. Para a resolução desse problema faz-se necessário o uso de outras metodologias. Contudo, a sequência de aminoácidos obtida para F6 foi:

K/QEGYPTPHEGCKFSCFI/LRPWGFCDHYCKI/LHI/LSK/QGSGYCAWPACYCYGVDP
NEPVWNYATNKC – 62 resíduos.

Quando comparada ao banco de dados de proteínas, Blast, a sequência de F6 possui similaridade de 81% com a toxina Tb2-II (P60276) e 79% com Tb2 (P56609) de *Tityus bahiensis*; 81% de similaridade com a Ts2 (P68410) e 63% com Ts1 (1B7D_A), ambas toxinas de *Tityus serrulatus*; 50% e 51% de identidade com as similaridade putativas das toxinas ardiscretina (P0C1X7) de *Tityus discrepans* e Tz2 (Q1I165) de *Tityus zulianus*, respectivamente. Essas sequências putativas foram lançadas ao programa ExPASy para a eliminação da sequência do peptídeo sinal. Quando comparada a sequência de F6 com a sequência parcial que obtivemos de F5, foi visto uma grande similaridade.

Por meio do programa ClustalW foi realizado o alinhamento da sequência de F6 a outras sequências, como a de F5 e as de alta identidade listadas acima. Esse alinhamento está ilustrado na Figura 30.

Toxina	Sequência	Referênc.
F6	KEGYPTP-HEGCKFSCFIRPWGFC [■] DHYCKLHLSAGSGYCAWPACYCYGVDPNEPVWNYATNKC	62
F5	-----DH-VKGCKYSCFIRPWGFC [■] DRYCKTNMSAASGYCAWPACYCYGVPKNEPVWDYDTNKC	57
Tb2	KEGYAMD-HEGCKFSCFPRPAGFC [■] DG [■] YCK [■] THLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVWDYATNKC	62 P56609
Tb2-II	KEGYAMD-HEGCKFSCFIRPSGFC [■] DG [■] YCK [■] THLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVWDYATNKC	62 P60276
Ts2	KEGYAMD-HEGCKFSCFIRPAGFC [■] DG [■] YCK [■] THLKASSGYCAWPACYCYGVDPDH [■] IKVWDYATNKC	62 P68410
Ts1	KEGYLMD-HEGCKLSCFIRPSGYCGREC [■] GIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	61 1B7D_A
Ardisc.	KNGYIIE-PKGCKYSCFWGSSTW [■] CNRECKFK-KGSSGYCAWPACW [■] CYGLPDNVKIFDYNNKC	61 P0C1X7
Tz2	KEGYLLDKSNGCKRSCFFGSTSW [■] CNTECKSK-SAEKGYCAWPSCYCYGFSDDSKMWDLKTNKC	62 Q1I165
	:*** ** . :* * : .. .*****:***... ::: .***	

Figura 30 Alinhamento da sequência de F6 com as sequências de alta identidade de outras toxinas escorpiônicas já conhecidas no banco de dados. Com o intuito de mostrar a alta conservação do padrão dos resíduos de cisteínas, esses foram destacados em cinza.

Assim como para a toxina F5, a sequência descrita à F6 apresentam alta identidade com toxinas escorpiônicas do tipo β . E isso também mostra que a toxina F6 é uma possível β -NaScTx. Porém, para se obter a real atividade desse peptídeo, foram

feitos os mesmos testes eletrofisiológicos com os 4 tipos de células neuronais em “patch clamp”, com os tipos celulares (HEK Na_v 1.3 e Na_v 1.6 e DRG).

A toxina F6 mostrou atividade de redução de $35,81 \pm 10,2\%$ (n=5) da corrente de sódio em células HEK Na_v 1.3 (Figura 31). E essa atividade foi intensificada quando aplicado o pulso despolarizante de +50 mV, que passou a ser uma porcentagem de inibição de $95,15 \pm 3,65\%$ (n=2). Com a lavagem, a atividade foi parcialmente reversível (Figura 32). Os testes com a concentração de 1 μ M de F6 não apresentam atividade em células HEK Na_v 1.6.

Em células DRG foi obtido apenas um registro para a atividade de F6 que mostrou a atividade de redução da corrente de sódio em 25% (Figura 33), com isso, novos testes serão necessários para o esclarecimento da atividade nesse tipo celular. Os registros de corrente X voltagem não puderam ser aproveitados.

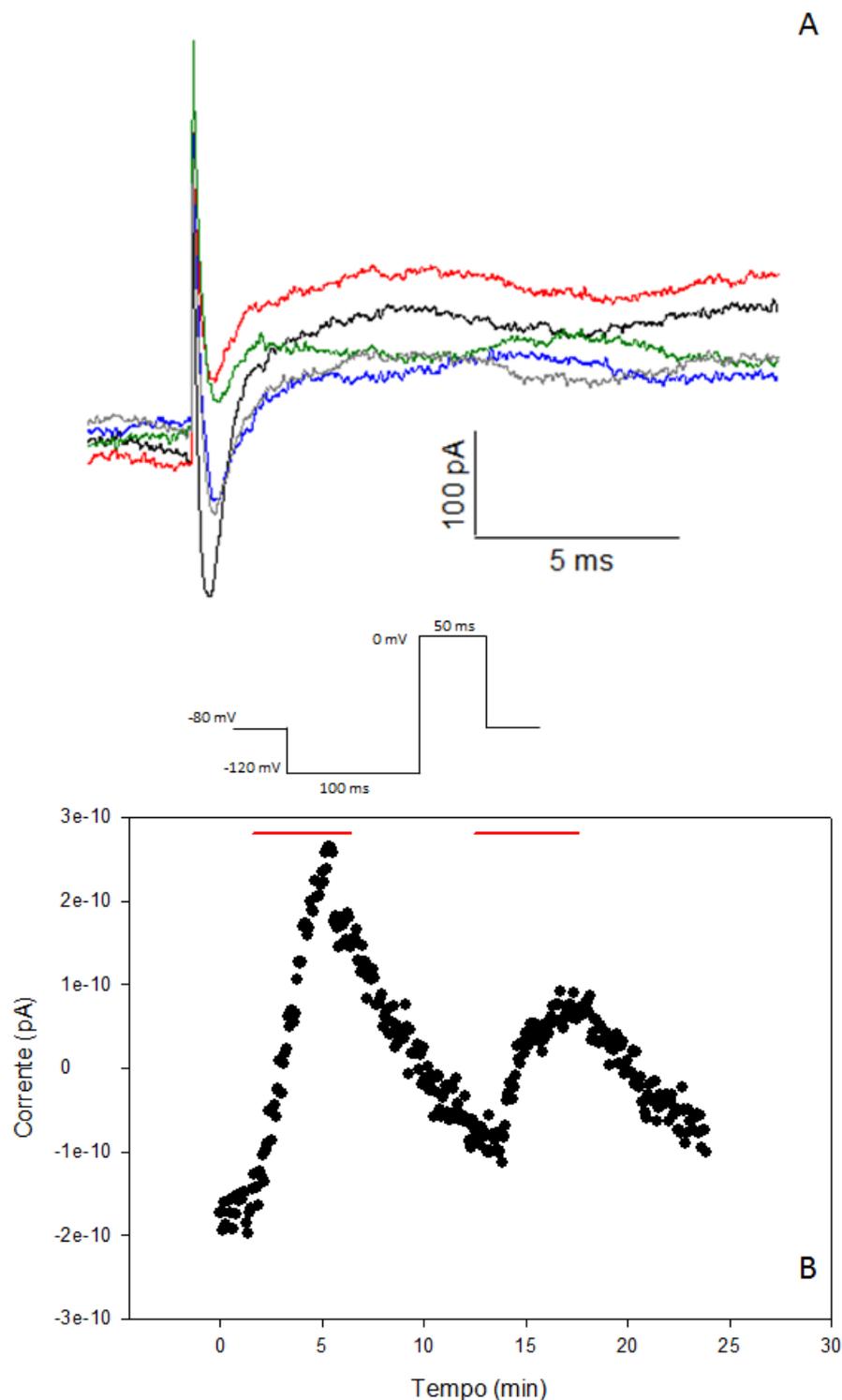


Figura 31 Teste eletrofisiológico de “patch clamp” em modo “whole-cell” em célula HEK Na_v 1.3 da toxina F6 ($1 \mu\text{M}$). (A) Célula representativa da atividade da toxina F6 sobre a corrente de sódio de canais Na_v 1.3. Mostra uma redução da corrente quando aplicada a toxina (vermelho) em relação ao controle (preto). Em azul, mostra a lavagem parcial da toxina. A F6 foi novamente perfundida (verde) e lavada (cinza); (B) Porcentagem de corrente de acordo com o tempo de registro. Os traços em vermelho indicam os momentos de perfusão do toxina, que mostrou uma atividade de redução de $35,81 \pm 10,2\%$ ($n=5$).

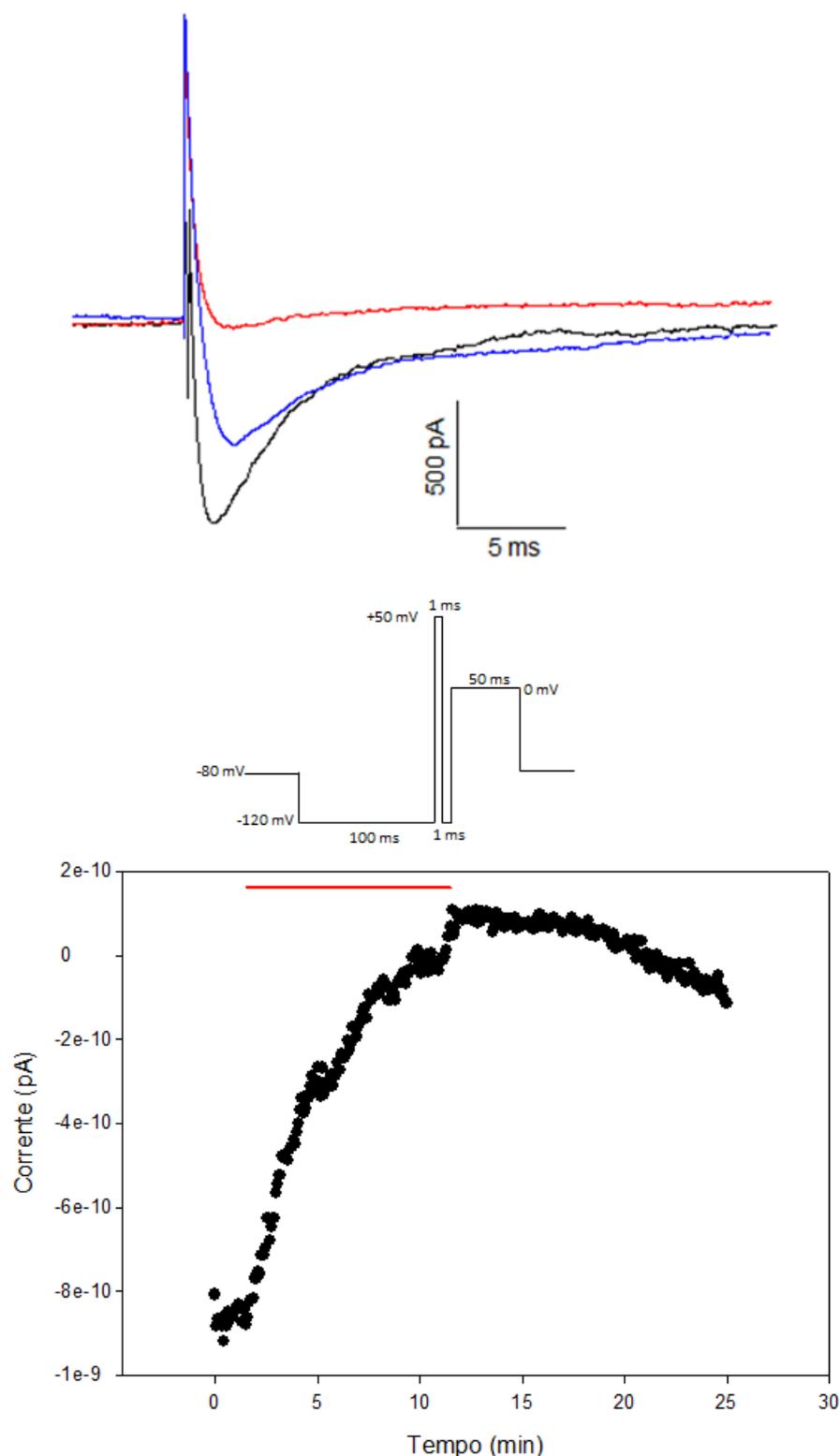


Figura 32 Teste eletrofisiológico em “patch clamp” no modo “whole-cell” em célula HEK Na_v 1.3 da toxina F6 ($1 \mu\text{M}$) no protocolo com pulso despolarizante de +50 mV por 1 ms. (A) Registro de corrente de sócio, em preto está a corrente controle, em vermelho a atividade de $95,15 \pm 3,65\%$ ($n=2$) da toxina F6 e azul a lavagem parcial da toxina; (B) Porcentagem de corrente em relação ao tempo de registro. A linha vermelha mostra o momento da perfusão de F6.

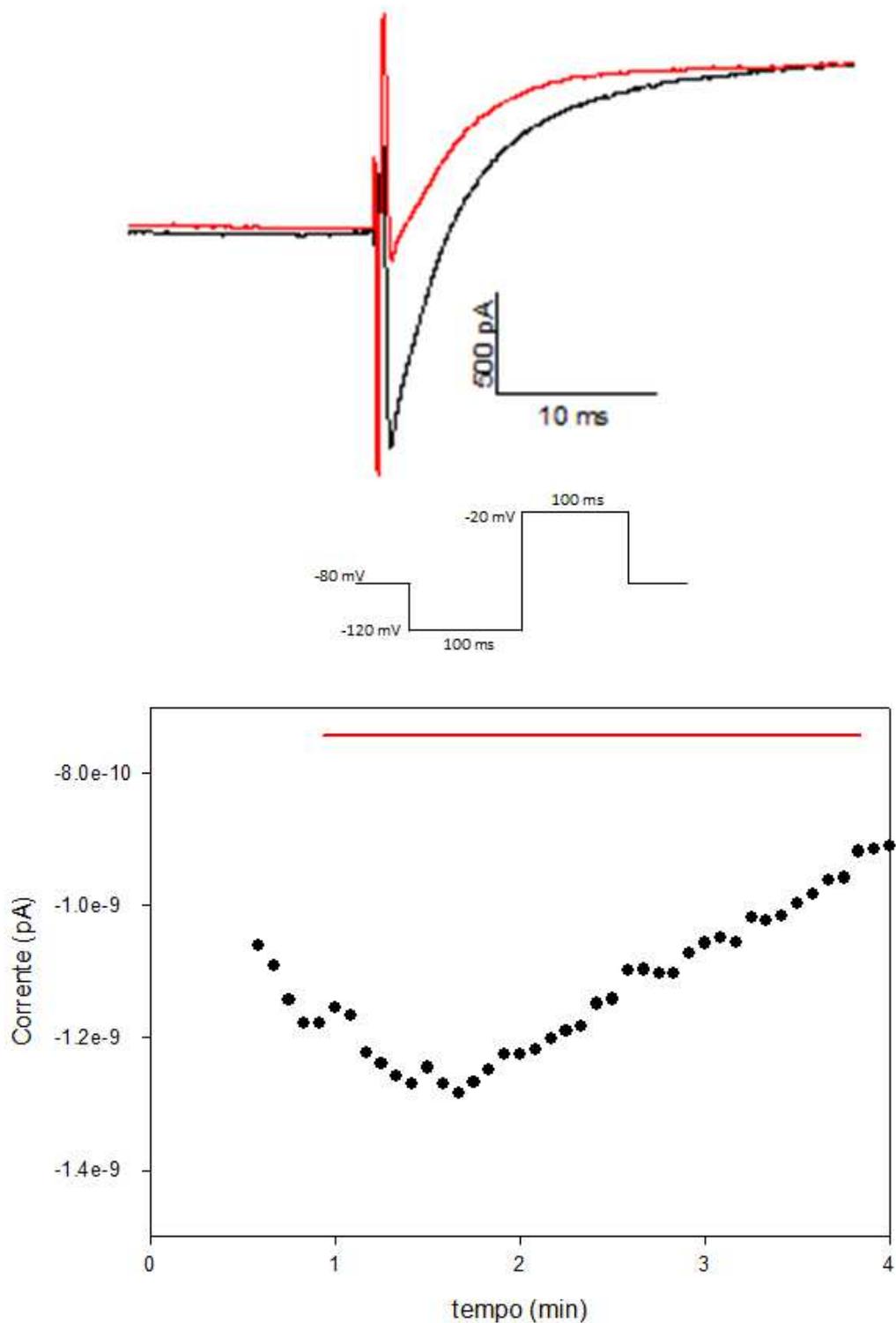


Figura 33 Resultado representativo de “patch clamp” em modo “whole-cell” realizado em células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). (A) Gráfico representativo da atividade, 25% (n=1), da toxina F6 ($1\mu\text{M}$) sobre a corrente total de sódio de células DRG; (B) Porcentagem de corrente de acordo com o tempo, a linha vermelha indica o momento da perfusão da toxina F6.

6. DISCUSSÃO

As sequências obtidas dos peptídeos focos do trabalho, F5 e F6, mostraram alta identidade com outras toxinas descritas de escorpiões do gênero *Tityus*. Com os resíduos de cisteínas e outras regiões com alto nível de conservação obteve-se similaridade de 50 a 81%. A toxina F5 apresentou 79% de similaridade com a toxina Tb2 e Tb2-II de *Tityus bahiensis* e Ts2 de *Tityus serrulatus*; 61% com Ts1 também de *T. serrulatus*; 50% e 51% de similaridade com as sequências putativas das toxinas ardiscretina de *Tityus discrepans* e Tz2 de *Tityus zulianus*, respectivamente.

A sequência do peptídeo F6 mostrou 81% de similaridade com a toxina Tb2-II, 79% com Tb2 e 63% com Tb-1 de *Tityus bahiensis*; 81% de similaridade com a toxina Ts2, 63% com a toxina Ts1 de *Tityus serrulatus*; e também obteve 50% e 51% de identidade com as toxinas putativas de *Tityus discrepans* e *Tityus zulianus*, respectivamente. Observa-se que as sequências de aminoácidos das toxinas F5 e F6 são muito similares entre si e com toxinas descritas como toxinas escorpiônicas do tipo β de canais para sódio (BATISTA *et al.*, 2006; BECERRIL *et al.*, 1996; BORGES *et al.*, 2006; MANSUELLE *et al.*, 1992; PIMENTA *et al.*, 2001; POSSANI *et al.*, 1985), o que sugere e direciona a essa atividade.

Essas toxinas com alta similaridade às toxinas alvos do trabalho são descritas como β -NaScTx que possuem atividade em mamíferos e insetos. Um exemplo é a Ts1 é o componente de maior abundância na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, tem uma alta toxicidade em mamíferos (POSSANI *et al.*, 1985). A toxina Ardiscretina, isolada da peçonha do escorpião venezuelano *Tityus discrepans*, possui o efeito inibitório apenas em invertebrados, não apresentando atividade em camundongos, sendo considerada assim, uma toxina inseto-específica (D'SUZE *et al.*, 2004). Pimenta e colaboradores (2001) descreveram a atividade de Tb2-II de *Tityus bahiensis* em mamíferos a injeção

intracerebroventricular de 100 ng/rato foi letal e em insetos a DL_{50} foi de 40 ng/mosca. A toxina Tb2-II difere da TsII em três resíduos de aminoácidos e, interessante, isso causa uma diferença na atividade de TsII, que não é ativa quando injetada em moscas varejeiras (LIMA *et al.*, 2007).

Outra β -NaScTx bem estudada é a Tz1, encontrada no escorpião venezuelano *Tityus zulianus*, que possui atividade em vários tipos de canais Na_v . LEIPOLD e colaboradores (2006) mostraram que Tz1 afeta fortemente os canais Na_v 1.4 encontrados em músculo esquelético, os canais neuronais Na_v 1.2 e Na_v 1.6 foram levemente sensíveis, já os canais Na_v 1.5 presentes no coração e Na_v 1.7 de nervos periféricos, não foram afetados.

COHEN e colaboradores (2005), em revisão, descreveram a possível estrutura secundária das β -NaScTx, onde, na Figura 34, mostra as regiões de folhas- β e α -hélices de acordo com as regiões da sequência de aminoácidos. Quando observado o padrão e similaridade das sequências, as toxinas F5 e F6, possivelmente, estariam inseridas no grupo de toxinas β -NaScTx com atividade anti-insetos e anti-mamíferos, e com isso seguiriam o mesmo padrão de estrutura secundária.

ação nesse canal pode auxiliar no melhor conhecimento das funções dos canais e doenças a eles relacionadas.

A atividade de $35\pm 4,1\%$ da F5 também em canais de células DUM indicam que essa toxina possui atividade tanto em mamíferos quanto em insetos. Os neurônios DUM são importantes para a locomoção, neuromodulação e secreta octopamina que muda a tensão básica usada em diferentes substratos metabólicos dos insetos (BRÔNE *et al.*, 2003; GROLLEAU & LAPIED, 2000). Tendo em vista a sua abundância na peçonha e sua atividade farmacológica, possivelmente, a toxina F5 tem um importante papel na paralização de presas artrópodes.

Existem poucos trabalhos sobre a atividade de toxinas escorpiônicas em células DUM. Durante a revisão bibliográfica para esse trabalho foram encontrados apenas dois trabalhos que se referem a α -NaScTx descritas de *Buthus martensi* (BmK M1) e *Buthus occitanus tunetunus* (BotIT2) (BORCHANI *et al.*, 1996; BRÔNE *et al.*, 2003). Atualmente, a maioria dos testes da atividade das toxinas inseticidas são “in vivo”, o que não indica a sua ação farmacológica específica nem o seu alvo molecular. Demonstrando, assim, a necessidade de mais estudos utilizando a técnica de “patch clamp” com células neuronais de insetos (DUM). Esse trabalho é o primeiro a descrever a atividade de uma possível β -NaScTx em correntes de sódio nesse tipo celular.

Os canais Na_v 1.3 são expressos no sistema nervoso central e periférico. Está relacionado ao sistema nociceptivo, assim como os canais Na_v 1.8 e 1.9 encontrados em DRG (DIB-HAJJ *et al.*, 2009; LAI *et al.*, 2004). As toxinas descritas nesse trabalho, F5 e F6, apresentaram atividade de redução da corrente de sódio em células HEK Na_v 1.3 de 71,5% (n=1) e $35,81\pm 10,2\%$ (n=5), respectivamente. Porém, a atividade de F5 deve ser melhor estudada. Se a hipótese da toxina F5 ser ativa em células DRG e Na_v 1.3 for

atendida, isso mostra que essa toxina pode vir a auxiliar nos estudos sobre dores neuropáticas.

Quando testada a toxina F6 em células HEK Na_v 1.3 com o protocolo com pulso despolarizante de +50 mV, a atividade da toxina aumentou de 35,81±10,2% (n=5) para 95,15 (n=2). Essa atividade de diminuição brusca da corrente com a presença de um pulso despolarizante prévio, é incomum em β-NaScTx. O que se conhece sobre a atividade da β-NaScTx nesse caso de despolarização prévia, é que ocorre um aumento da corrente em potenciais mais negativos (RODRÍGUES DE LA VEGA & POSSANI, 2007). Isso deve-se a indução de uma mudança conformacional do sensor de voltagem do domínio II do canal, gerado pelo pré-pulso, com isso, promove um aumento da força de ligação da toxina. Nesse caso, a ligação da toxina impede o retorno do sensor de voltagem ao estado de repouso e reduz a energia necessária para a abertura do canal (CESTÈLE *et al.*, 2006; RODRÍGUES DE LA VEGA & POSSANI, 2007). Isso leva ao questionamento da real atividade das toxinas descritas nesse trabalho sobre os canais para sódio.

Com isso, as sequências foram novamente analisadas e os aminoácidos que se diferenciaram aos das β-NaScTx foram questionados. De acordo com COHEN e colaboradores (2005), quando analisadas a atividade da C_{ss}4, uma β-NaScTx isolada de *Centruroides noxius*, com mutações em regiões específicas da sequência, demonstraram que a região farmacofórica das β-NaScTx é a dos aminoácidos F17, E28 margeada por Y24 e Q32. E o aminoácido “Hot spot” que interage eletrostaticamente com a carga positiva do sítio receptor dos canais para sódio é o E28, o que gerou uma redução da interação da toxina com o canal de 3 de magnitude quando realizada a mutação desse aminoácido. As toxinas F5 e F6 possuem uma modificação no aminoácido equivalente ao “hot spot” descrito por COHEN e colaboradores (2005), como demonstrado na Figura 35.

Sendo a mudança de um aminoácido carregado positivamente (ácido glutâmico – E) por um não carregado aromático (tirosina – Y). O que pode modificar a forma de interação com os canais para sódio.

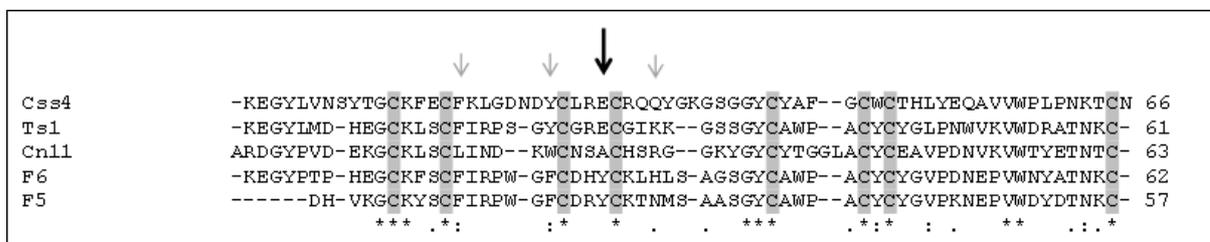


Figura 35 Alinhamento entre as β -NaScTx de *C. noxius* e *T. serrulatus* já descritas com relação as toxinas F5 e F6 de *T. matto grossensis* mostrando a região farmacofórica (setas) de acordo com o trabalho de COHEN e colaboradores (2005). As setas cinzas mostram os aminoácidos que fazem parte da região farmacofórica, seta preta indica a região “hot spot”.

RAMIREZ-DOMINGUEZ e colaboradores (2002) descreveram a Cn11 da peçonha de *Centruroides noxius*, uma toxina com atividade de bloqueio de canais para sódio em neurônios de lagostim *Procambarus clarkii*. Essa atividade foi demonstrada com a permanência no mesmo potencial de ativação dos canais para sódio de acordo com o controle, não havendo o deslocamento para potenciais mais negativos como é característico em toxinas β de canais para sódio. Quando analisada a sequência de Cn11, a região de “hot spot” também possui uma modificação do aminoácido para uma alanina (A), não polar (Figura 35) o que indica que essa região pode estar relacionada com a interação da toxina a outra região do canal para sódio.

Essa diferença de aminoácidos na região α -hélice, formadora do “loop” da molécula, que é responsável pela interação com os canais para sódio, podem ser a razão pela qual a toxina F6 mostrou uma atividade incomum quando realizado o pré-pulso em células HEK Na_v 1.3. Podendo assim, as toxinas F5 e F6, possuírem atividade de bloqueio dos canais para sódio, semelhante ao que foi descrito para Cn11. Os ensaios eletrofisiológicos mais detalhados devem ser feitos para solucionar este questionamento.

7. CONCLUSÃO

- O fracionamento dos componentes peptídicos da peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis*, mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostrou a presença de 65 frações diferentes, sendo 7 frações mais abundantes, segundo leituras por absorvância.

- Os testes de busca bio-guiada da atividade dos peptídeos das 7 frações de maior abundância encontrados na peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis* em nervos de rã, por meio da técnica “Single Sucrose-Gap”, identificaram quatro frações com ação neurotóxica. Sendo uma com atividade de retardo da repolarização do potencial de ação e três com atividade de redução do potencial de ação.

- Duas frações (F5 e F6) foram purificadas, as massas dos peptídeos foram analisadas em espectrometria de massas. E as suas sequências primárias foram parcialmente obtidas por meio de sequenciamento “de novo” em MALDI-TOF/MS. Com as sequências obtidas para toxinas F5 e F6 sugere-se que são toxinas escorpiônica do tipo β , sendo assim, agem no sítio 4 dos canais para sódio voltagem dependentes.

- Os testes eletrofisiológicos em “patch clamp” da toxina F5, em:

- Nav 1.3: atividade de redução da corrente de 71,5%, mais testes deveram ser feitos;
- Nav 1.6: atividade de redução da corrente de $63,3 \pm 7\%$;
- DUM: atividade de redução da corrente de $35 \pm 4,1\%$;
- DRG: atividade de redução da corrente de 13,2, mais testes serão necessários.

- Os testes eletrofisiológicos em “patch clamp” da toxina F6, em:

- Nav 1.3: atividade de redução da corrente de $35,81 \pm 10,2\%$;

- Nav 1.3 com pré-pulso: atividade de redução da corrente de $95,15 \pm 3,65\%$;
 - Nav 1.6: sem atividade na concentração de $1 \mu\text{M}$;
 - DRG: atividade de redução da corrente de 25%, mais testes serão necessários.
- A peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis* possui duas toxinas abundantes que possuem ação sobre canais para sódio voltagem dependentes. E podem ser as primeiras toxinas descritas com atividade de bloqueio de canais para sódio já descritas no gênero *Tityus*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGÓN, A. C.; GUZMÁN, H. S.; MARTIN, B.M. *et al.* Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. **Comp Biochem Physiol B**, v. 89, n. 1, p. 153-161, 1988.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. p. 1294

ALBUQUERQUE, E. X.; DALY, J W; WITKOP, B. Batrachotoxin: chemistry and pharmacology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 172, n. 987, p. 995-1002, 4 jun 1971.

ALVARES, É. S. S.; MARIA, M. DE; AMÂNCIO, F. F.; CAMPOLINA, D. Primeiro registro de escorpionismo causado por *Tityus adrianoi* Lourenço (Scorpiones : Buthidae) First record of scorpionism caused by *Tityus adrianoi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 383-384, 2006.

BARBIER, J.; LAMTHANH, H.; GALL, F. LE; *et al.* A delta-conotoxin from *Conus ermineus* venom inhibits inactivation in vertebrate neuronal Na⁺ channels but not in skeletal and cardiac muscles. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4680-5, 6 fev 2004.

BATISTA, C.V.F.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; SALAS-CASTILLO, S. P. *et al.* Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 1-2, p. 147-57, 2007.

BATISTA, CESAR V F; D'SUZE, GINA; GÓMEZ-LAGUNAS, FROYLAN; *et al.* Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. **Proteomics**, v. 6, n. 12, p. 3718-27, jun 2006.

BECERRIL, B.; CORONA, MIGUEL; CORONAS, F. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochemical**, v. 760, n. 1996, p. 753-760, 1996.

BEIRÃO, P. S. L. Canais iônicos e eletrogênese nas células excitáveis. In: CURI, R.; PROCOPIO, J. (Eds.). **Fisiologia Básica**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2009. p. 900.

BERNARD, C.; CORZO, G; MOSBAH, A; NAKAJIMA, T; DARBON, H. Solution structure of Ptu1, a toxin from the assassin bug *Peirates turpis* that blocks the voltage-sensitive calcium channel N-type. **Biochemistry**, v. 40, n. 43, p. 12795-800, 30 out 2001.

BORCHANI, L.; MANSUELLE, P.; STANKIEWICZ, M; *et al.* A new scorpion venom toxin paralytic to insects that affects Na⁺ channel activation. Purification, structure, antigenicity and mode of action. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 241, n. 2, p. 525-32, 15 out 1996.

BORGES, A.; GARCÍA, C. C.; LUGO, E. *et al.* Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 142, n. 3-4, p. 240-52, 2006.

BRAZIL, T. K.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; PORTO, T. J.; AMORIM, A. M. DE; SILVA, T. F. DA. Escorpiões de importância médica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 79, n. 22, p. 38-42, 2009.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2007. p. 968

BRÔNE, B.; TYTGAT, J.; WANG, D. C.; KERKHOVE, E. VAN. Characterization of Na⁺ currents in isolated dorsal unpaired median neurons of *Locusta migratoria* and effect of the alpha-like scorpion toxin BmK M1. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 2, p. 171-182, fev 2003.

CALISKAN, F.; GARCÍA, B. I.; CORONAS, F. I. V. *et al.* Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 1, p. 12-22, jul 2006.

CATTERALL, W A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, p. 521-55, jan 2000a.

CATTERALL, W A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13-25, abr 2000b.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, JOERG. International Union of Pharmacology . XLVIII . Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.

CATTERALL, WILLIAM A; CESTÈLE, SANDRINE; YAROV-YAROVYOY, V. *et al.* Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 2, p. 124-41, fev 2007.

CESTÈLE, S; CATTERALL, W A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 883-92, 2000.

CESTÈLE, SANDRINE; YAROV-YAROVYOY, V.; QU, Y. *et al.* Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 30, p. 21332-44, 28 jul 2006.

COHEN, L.; KARBAT, I.; GILLES, N. *et al.* Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 6, p. 5045-53, 11 fev 2005.

CORONA, MIGUEL; GURROLA, G. B.; MERINO, E. *et al.* A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. **FEBS letters**, v. 532, n. 1-2, p. 121-6, 4 dez 2002.

CORZO, GERARDO; GILLES, N.; SATAKE, H. *et al.* Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Letters**, v. 547, n. 1-3, p. 43-50, 17 jul 2003.

CRISTINA, S.; FERNANDES, R. **Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira Nhandu**. [S.l.]: Universidade de Brasília, 2010.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. DE; HERING, S. E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. DE S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo - SP: SARVER, 2009. .

DALY, JOHN W; GUSOVSKY, F.; MYERS, C. W.; YOTSU-YAMASHITA, M. First occurrence of tetrodotoxin in a dendrobayid frog *Colostethus inguinalis*, with further reports for the bufonid genus *atelopus*. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 279-285, 1994.

DEBOIS, D.; BERTRAND, V.; QUINTON, L.; PAUW-GILLET, M.-C. DE; PAUW, E. DE. MALDI-in source decay applied to mass spectrometry imaging: a new tool for protein identification. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 10, p. 4036-45, 15 maio 2010.

DIB-HAJJ, S. D.; BINSHTOK, A. M.; CUMMINS, T. R. *et al.* Voltage-gated sodium channels in pain states: role in pathophysiology and targets for treatment. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 65-83, abr 2009.

DIB-HAJJ, S. D.; BLACK, J. A; WAXMAN, S. G. Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. **Pain medicine (Malden, Mass.)**, v. 10, n. 7, p. 1260-9, out 2009.

DIB-HAJJ, S. D.; TYRRELL, L.; WAXMAN, S. G. Structure of the sodium channel gene SCN11A: evidence for intron-to-exon conversion model and implications for gene evolution. **Molecular neurobiology**, v. 26, n. 2-3, p. 235-50, 2002.

D'SUZE, G; SEVCIK, C; CORONA, M; *et al.* Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 43, n. 3, p. 263-72, 1 mar 2004.

ENGLAND, S.; GROOT, M. J. DE. Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 6, p. 1413-25, nov 2009.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, GERARDO. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural product reports**, v. 24, n. 1, p. 145-61, fev 2007.

GROLLEAU, FRANÇOISE; LAPIED, BRUNO. Review dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic

mechanisms underlying spontaneous electrical activity. **Journal of Experimental Biology**, v. 1648, p. 1633-1648, 2000.

GU, F.; KHIMANI, A.; RANE, S. G. *et al.* Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis*: a fungal and mammalian Ca²⁺ channel inhibitor. **Structure**, v. 3, n. 8, p. 805-814, 1995.

GUREVITZ, M.; KARBAT, I.; COHEN, L. *et al.* The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 473-89, 15 mar 2007.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. Third edit ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 2001. p. 814

LAI, J.; PORRECA, F.; HUNTER, JOHN C; GOLD, M. S. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, p. 371-97, jan 2004.

LEIPOLD, E.; HANSEL, A.; BORGES, A.; HEINEMANN, S. H. Subtype Specificity of Scorpion-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.

LIMA, M E DE; FIGUEIREDO, S G; PIMENTA, A M. C. *et al.* Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 1-2, p. 264-79, 2007.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MONTEIRO, A.; AMORIM, D.; KOBLE, T. 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. Le Scorpion Buthidae: *Tityus mattogrossensis* Borelli, 1901 (Morphologie, écologie, biologie et développement postembryonnaire). **Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris**, v. 4, n. 1A, p. 95-117, 1979.

LOURENÇO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. VON. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. DE S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo - SP: SARVIER, 2009. .

MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. *et al.* The beta-type toxin Ts II from the scorpion *Tityus serrulatus*: amino acid sequence determination and assessment of biological and antigenic properties. **Nat. Toxins**, v. 1, n. 2, p. 119-25, 1992.

MATSUI, T.; TAKETSUGU, S.; KODAMA, K. *et al.* Production of tetrodotoxin by the intestinal bacteria of a puffer fish, *Takifugu niphobies*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 55, p. 2199-2203, 1989.

MEBS, D.; ARAKAWA, O.; YOTSU-YAMASHITA, M. Tissue distribution of tetrodotoxin in the red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 7, p. 1353-7, 15 jun 2010.

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome biology**, v. 1, n. 4, p. REVIEWS0004, jan 2000.

MOUHAT, S.; JOUIROU, B.; MOSBAH, A.; WAARD, M. DE; SABATIER, J.-M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. **The Biochemical journal**, v. 378, n. Pt 3, p. 717-26, 15 mar 2004.

Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lenhinger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2002. p. 301 – 346

NOVAKOVIC, S. D.; EGLIN, R. M.; HUNTER, J. C. Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 8, p. 473-8, ago 2001.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: CARDOSO, J.; FRANÇA, F.; WEN, F.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo - SP: SARVIER, 2009..

PIMENTA, A.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; ROCHAT, H. *et al.* Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 1009–1019, 2001.

PIRES, O. R.; SEBEN, A.; SCHWARTZ, E. F. *et al.* Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 1, p. 73-9, jan 2005.

POSSANI, L D; MARTIN, B M; SVENDSEN, I.; RODE, G. S.; ERICKSON, B. W. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. **The Biochemical journal**, v. 229, n. 3, p. 739-50, 1 ago 1985.

RAMIREZ-DOMINGUEZ, M. E.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GARCIA, U. *et al.* Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true blocker of Na⁺ currents in crayfish neurons. **The Journal of experimental biology**, v. 205, n. Pt 6, p. 869-76, mar 2002.

RODRÍGUES DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, LOURIVAL D. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. **Toxicon**, v. 49, p. 171-180, 2007.

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 : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 8, p. 831-44, 15 dez 2005.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, LOURIVAL D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 43, n. 8, p. 865-75, 15 jun 2004.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo - SP: ROCA, 2005. p. 1145

RUSH, A. M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. **The Journal of physiology**, v. 579, n. Pt 1, p. 1-14, 15 fev 2007.

SHIEH, C. C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 557-94, dez 2000.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial Toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic Cyanobacteria in Water**. Londres: E&FN Spon, 1999. p. 41-111.

SRINIVASAN, K. N.; SIVARAJA, V.; HUYS, I. *et al.* kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 33, p. 30040-7, 16 ago 2002.

STRIESSNIG, J; GRABNER, M.; MITTERDORFER, J. *et al.* Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 3, p. 108-15, mar 1998.

STRONG, P. N.; SMITH, J. T.; KEANA, J. F. W. A convenient bioassay for detecting nanomolar concentrations of tetrodotoxin. **Toxicon**, v. 11, n. 5, p. 433-438, ago 1973.

TYTGAT, J; CHANDY, K. G.; GARCIA, M. L. *et al.* A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends in pharmacological sciences**, v. 20, n. 11, p. 444-7, nov 1999.

VALDIVIA, H. H.; POSSANI, LOURIVAL D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 8, n. 3, p. 111-8, abr 1998.

VARGAS, J. A. G. Identificação e caracterização biológica de peptídeos isolados da peçonha do escorpião colombiano *Tityus pachyurus*, que atuam nos canais para Na⁺. 2012.

WICKENDEN, A. K⁺ channels as therapeutic drug targets. **Pharmacology & therapeutics**, v. 94, n. 1-2, p. 157-82, 2002.

YATANI, A.; KIRSH, G. E.; POSSANI, L.D.; BROWN, A. M. Effects of new world scorpion toxins on single channel and whole cell cardiac sodium channels. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. 443-451, 1988.

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



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

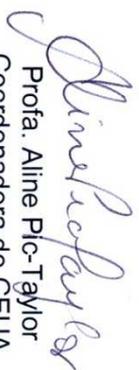
Brasília, 08 de novembro de 2011.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ELETROFISIOLÓGICA DOS COMPONENTES DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO TITYUS MATTOGROSSENSIS”**, UnBDOC n.º 124645/2011, sob responsabilidade do Prof. Carlos Alberto Schwartz, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. Aline Pic-Taylor
Coordenadora do CEUA