

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UNB)

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Mestrado

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
MODULADORES DE CANAIS PARA SÓDIO PRESENTES NA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus* sp. PERTENCENTE AO GRUPO
*forcipula***

CLAUDIA JIMENA ARENAS BELALCÁZAR

Orientadora: Professora Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília – Distrito Federal

2013

CLAUDIA JIMENA ARENAS BELALCÁZAR

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
MODULADORES DE CANAIS PARA SÓDIO PRESENTES NA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus* sp. PERTENCENTE AO GRUPO
*forcipula***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz.

Brasília – Distrito Federal

2013

DEDICATÓRIA

À Deus,

A minha mãe María Eugenia Belalcázar,

A meu pai José Arenas,

A minha irmã Victoria Arenas,

Pelo apoio emocional constante, aposta
sem fronteras por minha educação e por
sempre estarem ao meu lado apesar da
distância.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu Deus e Pai por ter colocado em minha vida esta linda experiência; pela força, energia e sabedoria que me ofereceu para continuar. Obrigada Deus pelo conquistado até agora.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, por me permitir realizar meus estudos de mestrado.

Ao Programa CAPES – REUNI pelo financiamento da bolsa de estudos de pós-graduação.

A minha orientadora Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz, por seu apoio, confiança, paciência e conhecimentos que me brindou durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Jader Cruz por ter me permitido desenvolver parte do projeto nas instalações do seu laboratório na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A Daiana Cardoso, doutoranda em fisiologia na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela sua ajuda na parte eletrofisiológica do projeto.

Ao Dr. Carlos Bloch por ter me permitido desenvolver parte do projeto nas instalações do seu laboratório na EMBRAPA-CENARGEN.

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CENARGEM, Profa. Maura Vianna Prates, Eder Barbosa, Luciano Paulino Da Silva, pela sua grande colaboração no laboratório de Espectrometria de massa.

Aos professores do Laboratório de Toxinologia (LTx) do departamento de Ciências Fisiológicas pelo suporte em infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.

Aos professores do laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, Dra. Márcia Renata Mortari, Dr. Osmino Pires Junior, pelas sugestões no projeto e pela linda amizade.

Ao meu grande parceiro de bancada neste projeto, Harry Morales Duque, pela sua amizade incondicional e sincera, honradez, alegria, paciência, ajuda e conhecimentos oferecidos.

Ao Dr. e grande amigo Jimmy Alexander Guerrero Vargas, por ter me recomendado com os professores para começar meus estudos de pós-graduação na Universidade de Brasília, pelos seus conhecimentos oferecidos, ajuda, paciência, confiança, palavras, conselhos, sugestões e pela linda amizade.

A meus excelentes amigos: Thalita Soares Camargos, Caroline Farias Barbosa, Fagner Neves Oliveira, pela sua fantástica ajuda e apoio no meu projeto, por suas palavras certas nos momentos certos, seu apoio e por me acolherem como sua amiga neste novo país.

Ao técnico de laboratório de Toxinologia da UnB Washington José de Oliveira, e a Dona María Magalhães Viana pela preciosa amizade, alegria e carinho especial.

Ao *Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca-Colômbia (CIBUC)* por me permitir manter os escorpiões.

A Carol Bolaños pela grande ajuda na coleta e manutenção dos escorpiões na Colômbia.

Ao professor e mestre José Beltrán Vidal diretor do *Centro Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca* na Colômbia, por seu apoio e amizade.

A minha amada família. Obrigada mamãe, pela confiança, amor infinito, apoio e companhia; obrigada papai pelo amor ilimitado, pelas palavras e mensagens de fortaleza, obrigada irmã pelos “te amo” e a alegria que você sempre me dá. Obrigada todos vocês por me fornecer momentos de felicidade infinita.

Ao meu avô quem me acompanhou desde o céu e me deu fortaleza para continuar.

A minhas tias, tios, avó, primas, primos e o restante da família pelas abençoes oferecidas e pelos bons desejos.

Aos meus maravilhosos amigos de moradia, Adriana Rivera e Eduardo Hinostroza, pelos momentos de risos, alegrias e valiosa amizade.

Aos meus amigos colombianos que desde lá me ofereceram sua boa energia, bons desejos e sempre me perguntaram como eu estava.

E finalmente a todas aquelas pessoas que colaboraram na realização deste belo projeto que é muito significativo para mim.

RESUMO

As peçonhas dos escorpiões se caracterizam por apresentarem componentes farmacologicamente ativos; entre eles, as toxinas que agem em canais para sódio (NaScTxs), que são as responsáveis dos mais fortes efeitos neurotóxicos observados durante o envenenamento causado pela picada de escorpião.

O presente projeto tem como objetivo principal identificar toxinas moduladoras de canais para sódio na peçonha do escorpião *Tityus* sp. identificando e caracterizando-as por meio de técnicas como Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa tipo MALDI-TOF/TOF. As sequências parciais de aminoácidos dos peptídeos purificados foram determinadas por espectrometria de massa (MS/MS) para posteriormente ser testados por meio da técnica eletrofisiológica de *Patch clamp* em canais de sódio expressos em células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).

A peçonha bruta do escorpião *Tityus* sp. resultou em 54 frações cromatográficas. Três sequências parciais que correspondem a três NaScTxs foram obtidas, com massas moleculares de 7342 Da, 6971Da, 7970Da. Duas delas ao serem testadas nas células DRG reduziram as correntes de sódio classificando-as como β NaScTxs.

Palavras chaves: Peçonha do escorpião *Tityus* sp, HPLC, espectrometria de massa, eletrofisiologia, canais para sódio.

ABSTRACT

The venom of scorpions are characterized by presenting pharmacologically active components, including toxins that act on sodium channels (NaScTxS), which are responsible of the strongest neurotoxic effects observed during poisoning caused by the bite of a scorpion.

This project aimed to identify new toxins having sodium channels as molecular targets in the venom of the scorpion *Tityus* sp. identifying and characterizing them by standard techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry MALDI-TOF/TOF type. The partial amino acid sequences of the purified peptides were determined by mass spectrometry (*MS/MS*) to be subsequently tested by electrophysiological patch clamp technique on sodium channels expressed in dissociated cells from dorsal root ganglion of rats (DRG).

The crude venom of the scorpion *Tityus* sp. resulted in 54 chromatography fractions. Three partial sequences corresponding to three NaScTxS were obtained with molecular weights of 7342 Da, 6971Da, 7970Da. Two of them to be tested in DRG cells reduced sodium currents classifying them as β NaScTxS.

Key words: *Tityus* sp scorpion venom, HPLC, mass spectrometry, electrophysiology, sodium channels.

ÍNDICE

1.	Introdução.....	14
1.1	Os escorpiões.....	14
1.2	Escorpionismo.....	15
1.3	Alvos moleculares das neurotoxinas escorpiônicas.....	16
1.4	Composição química da peçonha de escorpião.....	17
1.5	Estrutura e propriedades farmacológicas das NaScTxS.....	19
1.5.1	Canais para sódio.....	19
1.6	Interações entre as toxinas e os canais para sódio dependentes de voltagem.....	25
1.7	Pesquisas com a peçonha de escorpiões do gênero <i>Tityus</i> na Colômbia.....	27
2.	Justificativa.....	32
3.	Objetivos.....	34
3.1	Objetivo geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
4.	Material e métodos.....	35
4.1	Coleta dos escorpiões.....	35
4.2	Manutenção dos escorpiões em cativeiro.....	35
4.3	Obtenção da peçonha.....	35
4.4	Fracionamento da peçonha bruta do escorpião <i>Tityus</i> sp pertencente ao grupo <i>forcipula</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	36
4.5	Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF e sequenciamento de <i>novo</i> das frações de interesse.....	37
4.6	Caracterização da atividade do peptídeo em canais de sódio.....	38
4.6.1	Modelos animais.....	38
4.6.2	Dissecação e Dissociação.....	38
4.6.3	Registro em <i>Patch clamp</i>	40
4.6.4	Caracterização dos parâmetros e registros das correntes relacionadas aos canais para sódio.....	42

5.	Resultados.....	43
5.1	Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta.....	43
5.2	Recromatografia, análise de massa e sequenciamento de <i>novo</i> das frações de interesse.....	45
5.2.1	Fração 40.....	45
5.2.1.1	Sequenciamento de <i>novo</i> da Tpy10.....	48
5.3	Avaliação eletrofisiológica.....	51
5.3.1	Análise eletrofisiológica da Tpy10.....	51
5.4	Fração 41.....	52
5.4.1	Sequenciamento de <i>novo</i> da Tpy11.....	54
5.4.1.1	Análise eletrofisiológica da Tpy11.....	56
5.5	Fração 42.....	57
5.5.1	Sequenciamento de <i>novo</i> da Tpy12.....	59
5.6	Fração 43.....	63
5.7	Fração 44.....	66
6.	Discussão.....	69
7.	Conclusões.....	78
8.	Bibliografia.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática do arranjo transmembrânico da subunidade α do canal para sódio dependente de voltagem, indicando os sítios de ligação das NaScTxS de escorpião 20
- Figura 2** Exemplo de estrutura em 3D de uma NaScTx, a AahlI de *Androctonus australis*. PDB Entry ID: 4AEI 22
- Figura 3** **Alinhamento de algumas α NaScTxS de espécies do género *Tityus*.** Borges *et al.* (2012). É importante ressaltar no alinhamento as principais características estruturais como a presença das quatro pontes dissulfeto que conferem uma grande estabilidade ao peptídeo, o core-domain está constituído por resíduos que formam o loop conector entre a primeira folha β e a α -hélice, e o NC-domain contém os cinco resíduos entre as posições 8 a 12 na região N-terminal e um segmento de resíduos de aminoácidos que ocupam as posições 54-64 na extremidade C-terminal (Gurevitz *et al.*, 2001; 2007; Cohen *et al.*, 2005)..... 24
- Figura 4** **Alinhamento de algumas β NaScTxS de espécies do género *Tityus*.** Borges *et al.* (2012) no seu artigo comparam as sequências de aminoácidos das toxinas putativas Tc11 e Tc12 de *T. clathratus* com β -toxinas como a Ts1 do escorpião brasileiro *T. serrutalus*. É importante ressaltar no alinhamento as principais características estruturais como a presença das quatro pontes dissulfeto que conferem uma grande estabilidade ao peptídeo e suas duas superfícies ativas, o farmacóforo, que está estritamente associado à α -hélice do peptídeo e a região C-terminal e o loop conector da estrutura secundária do peptídeo (Gurevitz *et al.*, 2001; 2007; Cohen *et al.*, 2005)..... 25

- Figura 5** Representação esquemática da subunidade α do canal para sódio e os diferentes sítios de recepção de neurotoxinas segundo sua localização e função (Gordon *et al.*, 2007)..... 26
- Figura 6** **Perfil cromatográfico da peçonha do escorpião *Tityus sp.* em coluna de fase reversa C18.** Alíquotas de 1mg da peçonha foram dissolvidas em água com 0,12% de TFA (v/v) (solução A) e aplicadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) previamente equilibrada com água com 0,12% de TFA (v/v). As frações foram eluídas sob um gradiente linear de acetonitrila (linha azul) com 0,1% de TFA (v/v) (solução B) com um fluxo constante de 1mL/min e monitoramento a 216 nm..... 44
- Figura 7** **Perfil cromatográfico da fração 40.** A fração 40 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216nm..... 46
- Figura 8** **Perfil cromatográfico da fração 40.** A fração 40 teve uma segunda recromatografia por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216nm..... 47
- Figura 9** **Espectro de massa molecular da Tpy10, obtido em MALDI-TOF.** A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando

solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os software <i>FlexControl</i> 3.0 e <i>FlexAnalysis</i> 3.0 (<i>Bruker Daltonics</i> , Billerica, EUA).....	48
Figura 10 Alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpy10 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade.....	49
Figura 11 Sequência parcial de aminoácidos da Tpy10, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspendido em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método <i>In-Source Decay (ISD)</i> usando o programa <i>FlexControl</i> 3.0 e <i>FlexAnalysis</i> 3.0 (<i>Bruker Daltonics</i> , Alemanha).....	50
Figura 12 Efeito da toxina Tpy10 (25nmol/L) aplicando 500pA de corrente em 5ms sobre as correntes iônicas nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).....	51
Figura 13 Efeito da toxina Tpy10 (100nmol/L) aplicando 200pA de corrente em 20ms sobre as correntes iônicas nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).....	51

- Figura 14 Perfil cromatográfico da fração 41.** A fração 41 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216nm..... 52
- Figura 15 Espectro de massa molecular da Tpy11, obtido em MALDI-TOF.** A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)..... 53
- Figura 16 Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy11 com as toxinas que apresentou maior porcentagem de identidade.....** 54
- Figura 17 Sequência parcial de aminoácidos da Tpy11, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF.** O peptídeo foi ressuspendido em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay (ISD)* usando o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics, Alemanha)..... 55

- Figura 18 Efeito da toxina Tpy11 (100nmol/L)** aplicando 1nA de corrente em 20ms sobre as correntes iônicas nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG)..... 56
- Figura 19 Resumo dos efeitos apresentados pelas toxinas Tpy10 e Tpy11 na concentração de 25nmol/L e 100nmol/L**, sobre as correntes iônicas de canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). A * significa a diferença do efeito apresentado entre as toxinas e o controle, e o # significa a diferença do efeito apresentado entre a Tpy11 e a Tpy10 na mesma concentração 100nmol/L..... 57
- Figura 20 Perfil cromatográfico da fração 42.** A fração 42 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216nm..... 58
- Figura 21 Espectro de massa molecular da Tpy12**, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)..... 59

- Figura 22** Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy12 com as toxinas que apresentou maior porcentagem de identidade..... 60
- Figura 23** Sequência parcial de aminoácidos da Tpy12, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspendido em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay (ISD)* usando-se o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (*Bruker Daltonics, Alemanha*)..... 61
- Figura 23** Sequência parcial de aminoácidos da Tpy12, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspendido em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay (ISD)* usando-se o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (*Bruker Daltonics, Alemanha*)..... 62
- Figura 24** Alinhamento múltiplo das sequências parciais das NaScTxS identificadas na peçonha do escorpião *Tityus* sp..... 63
- Figura 25** Perfil cromatográfico da fração 43. A fração 43 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a

45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216nm..... 64

Figura 26 **Espectro de massa molecular da fração 43**, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)..... 65

Figura 27 **Perfil cromatográfico da fração 44**. A fração 44 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216nm..... 66

Figura 28 **Espectro de massa molecular da fração 44**, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)..... 67

Figura 29	Alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpy10 com β NaScTxs.....	71
Figura 30	Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy11 com β NaScTxs mostrando os resíduos de aminoácidos mais conservados entre elas.....	74
Figura 31	Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy11 com β NaScTxs mostrando os resíduos de aminoácidos mais conservados entre elas.....	74
Figura 32	Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy12 com β NaScTxs mostrando os resíduos de aminoácidos mais conservados entre elas.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Valores de DL50 de algumas espécies do gênero <i>Tityus</i>	31
-----------------	---	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 OS ESCORPIÕES

Os escorpiões estão entre os artrópodes mais antigos que se conhecem. Seu registro fóssil data aproximadamente de 400 milhões de anos. Eles estão distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Algumas espécies têm hábitos extradomiciliares sendo frequentemente encontradas escondidas em fendas, sobre pedras, troncos, folhas e cascas de árvores, e outras têm hábitos domiciliares, encontrando-se sobre tijolos soltos em paredes, tetos e dentro dos cômodos (Gómez, 2002).

Os escorpiões pertencem ao subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Escorpionida. Seu corpo está dividido em cefalotórax (prossoma) que tem os olhos médios e laterais, e o abdômen (opistossoma), sendo que este último subdivide-se em messosoma com sete segmentos e metassoma com cinco segmentos e ao final o télson com duas glândulas produtoras de peçonha que desembocam no ferrão.

Existem, no mundo, aproximadamente 1500 espécies de escorpiões que estão distribuídos em 30 famílias. Na Colômbia, já foram catalogadas cerca de 50 espécies de escorpiões, distribuídas em quatro famílias: Buthidae, com representantes dos gêneros *Rophalurus*, *Anantheris*, *Centruroides* e *Tityus*, esta com 29 espécies; Chactidae, com quatro gêneros: *Brotheas*, *Broteochactas*, *Chactas* e *Teuthastes*; Diplocentridae, com um gênero: *Tarsoporusus*; e Liochelidae, com uma única espécie *Opisthacanthus elatus* (Flórez, 2001; 2007).

Os gêneros de interesse médico pertencem principalmente à família Buthidae, sendo a mais diversa, com a maior distribuição geográfica do planeta e a única que contém espécies consideradas como potencialmente perigosas para os humanos. Essa família está dividida em 73 gêneros, 6 subgêneros, 529

espécies e 165 subespécies. Nas Américas, os representantes dos gêneros *Tityus* têm aproximadamente 130 espécies (Flórez, 2001). A Colômbia tem representantes de 4 gêneros da família Buthidae: *Centruroides*, com duas espécies *C. gracilis* e *C. margaritatus*, sendo esta última a espécie mais comum e com altas densidades de população e *Tityus*, com 29 espécies; onde está *T. pachyurus* aportando uma grande importância médica por ser o mais venenoso ao qual se atribuem acidentes mortais, *Ananteris* com quatro espécies, e *Rhopalurus* com uma espécie, *R. laticauda* (Otero *et al.*, 2004; Flórez, 2001; Guerrero, 2002).

1.2 ESCORPIONISMO

O escorpionismo é o quadro de envenenamento designado para os acidentes causados pela picada de escorpiões nos seres humanos (Otero *et al.*, 2004). Todas as espécies de escorpiões, sem exceção, podem inocular a peçonha com seu ferrão, embora, nem todas apresentem perigo aos seres humanos e animais (Flórez, 1990).

Em geral, o envenenamento escorpiônico é caracterizado por apresentar sinais e sintomas relacionados com injeção de toxinas após a picada do animal. Os acidentes podem ser classificados em três categorias, de acordo com a severidade. Na primeira categoria, incluem-se manifestações locais como forte dor e eritema. Na segunda categoria, estão as manifestações moderadas: ataxia, sudorese, convulsão, sialorréia, taquicardia, priapismo, diarreia, náuseas e vômitos. Na terceira categoria, são observadas manifestações severas: falhas cardíacas, respiratórias e neurológicas (Khattabi *et al.*, 2011).

O escorpionismo é causado principalmente por espécies que pertencem à família Buthidae. Na Colômbia, as espécies classificadas como potencialmente perigosas e de importância médica estão distribuídas em todo o país, com os representantes do gênero *Tityus*, na Costa Atlântica e nos Vales Interandinos com os representantes do gênero *Centruroides* (Guerrero-Vargas 2002; Otero *et al.*,

2004; Flórez, 2007). A espécie mais estudada tem sido *Tityus pachyurus* (Otero *et al.*, 2004; Barona *et al.*, 2006; Rodríguez, 2008; Guerrero-Vargas *et al.*, 2012; Izquierdo e Rodríguez, 2012) devido a sua ampla distribuição.

1.3 ALVOS MOLECULARES DAS NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS

As toxinas de escorpiões têm suscitado um interesse investigativo crescente, tanto em virtude de seus efeitos nocivos ao ser humano, como pela descrição de novas ferramentas farmacológicas que reconhecem uma grande variedade de tipos e subtipos de canais iônicos (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) (Loret e Hammock, 2001; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003; Xian-Chun *et al.*, 2004). Uma mesma espécie de escorpião pode produzir toxinas que agem em canais para Na^+ dependentes de voltagem de mamíferos, responsáveis pelos efeitos neurotóxicos mais graves durante o envenenamento escorpiônico (Gwee *et al.*, 2002; Rodríguez de la Vega e Possani, 2005), além de outras específicas para os canais para Na^+ de insetos (Loret e Hammock, 2001)

1.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO

As peçonhas dos escorpiões são misturas complexas de origem apócrina, (sintetizadas em glândulas exócrinas especiais) caracterizadas por apresentarem componentes farmacologicamente ativos, os quais conferem a possibilidade dos escorpiões serem predadores muito eficientes. Os componentes mais importantes são representados por misturas complexas de peptídeos neurotóxicos que atuam em canais iônicos (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e Cl^-) de membranas biológicas do tecido nervoso, glandular e muscular, modificando sua permeabilidade iônica, e ocasionando um desequilíbrio fisiológico na célula. Tais peptídeos apresentam toxicidade para um grande número de organismos, incluindo mamíferos, insetos e crustáceos. Além dos peptídeos neurotóxicos, a peçonha também contém enzimas, nucleotídeos, lipídeos e aminas (Barona *et al.*, 2004; Loret e Hammock, 2001; Xian-Chun *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2005).

Os peptídeos com atividade biológica presentes na peçonha dos escorpiões podem ser divididos em dois grandes grupos: peptídeos com pontes dissulfeto (*DBPs, disulfide-bridged-peptides*) os quais atuam nas membranas celulares ligando-se a uma grande variedade de tipos e subtipos de canais iônicos (Na^+ , Ca^{2+} , K^+), e que são conhecidos como neurotoxinas (Possani *et al.*, 2000; Loret e Hammock, 2001), e os peptídeos sem pontes dissulfeto (*NDBPs, non-dissulfide-bridged-peptides*), os quais apresentam diversas atividades biológicas, como a antimicrobiana ou hemolítica (Zeng *et al.*, 2005).

Os peptídeos neurotóxicos podem ser agrupados segundo seu alvo molecular em:

- Peptídeos de cadeia curta, constituídos de 22 a 47 resíduos de aminoácidos com duas a quatro pontes dissulfeto, os quais têm atividade bloqueadora dos canais para potássio, gerando prolongamento no potencial de ação. São classificadas como α -KTxs (García *et al.*, 2001; Gwee *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2010).

- Polipeptídeos de cadeia longa, com 61 a 75 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, classificados como β -KTxs, os quais têm atividade bloqueadora dos canais para potássio (Diego-García *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010).

- Polipeptídeos de cadeia longa, com 58 a 76 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, que atuam interferindo com o fluxo do íon sódio através das membranas. Estes se subdividem em dois tipos: toxinas tipo α que retardam o fechamento dos canais voltagem-dependentes, e tipo β que alteram o mecanismo normal de abertura dos canais. Essas toxinas α e β interagem, respectivamente, com os domínios 3 e 4 da subunidade α do canal (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005; Caterall, 2012).

- Peptídeos e polipeptídeos que modulam a atividade dos canais para cálcio, que se subdividem em: inibidores das correntes iônicas nos canais para Ca^{2+} Tipo T, com quatro pontes dissulfeto e aproximadamente 63 resíduos de aminoácidos (Olamendi-Portugal *et al.*, 2002), e os peptídeos que especificamente modulam os canais para Ca^{2+} sensíveis a rianodina (Valdivia e Possani, 1998).

- Peptídeos moduladores do canal para cloreto, com 35-38 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. Já foram descritos três peptídeos isolados da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*: clorotoxina, que bloqueia a condutância dos canais para cloreto de células epiteliais de camundongo (Zhijian *et al.*, 2006), GaTx1, que inibe os canais seletivos a ânions da proteína CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Fuller *et al.*, 2007) e GaTx2, que inibe os canais CIC-2 (Thompson *et al.*, 2009).

1.5 ESTRUTURA E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS NaScTxS

1.5.1 CANAL PARA SÓDIO

Os canais proteicos melhor caracterizados são os canais iônicos que permitem a passagem de íons através da membrana plasmática. Estes canais estão localizados nas membranas de todas as células. Eles apresentam três propriedades importantes: condução de íons, reconhecimento de íons específicos e que se abrem e fecham em resposta a sinais específicos, sejam eles elétricos, mecânicos ou químicos (Kandel *et al.*, 2000).

O canal para sódio é formado por uma grande proteína α , com aproximadamente 260 kDa (quase 2000 resíduos de aminoácidos) e quatro domínios transmembrânicos homólogos (I-IV), associada a pequenas subunidades β com aproximadamente 30-40kDa. Cada um desses domínios possui seis regiões em α -hélice (1-6) transmembrânicas (Figura 2), sendo que o sensor da voltagem

está localizado na α -hélice número 4. Os quatro domínios associam-se formando o poro do canal (Catterall *et al.*, 2005; Caterall, 2012).

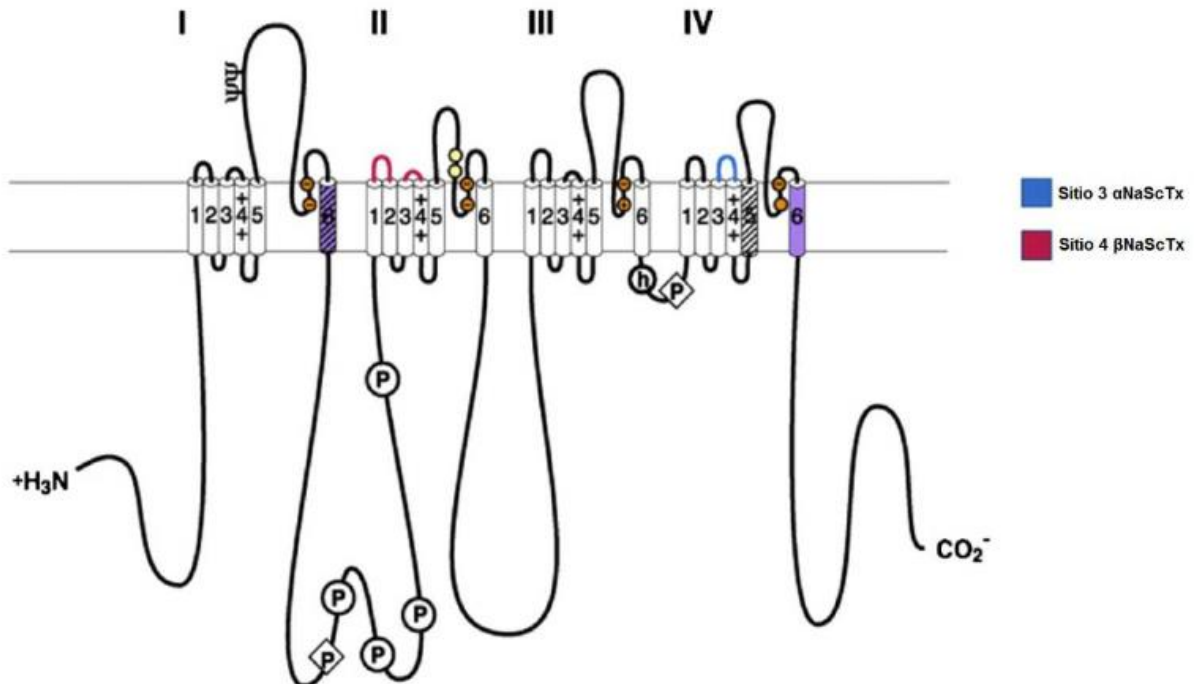


Figura 1. Representação esquemática do arranjo transmembrânico da subunidade α do canal para sódio dependente de voltagem, indicando os sítios de ligação das NaScTx de escorpião (Catterall *et al.*, 2007).

Diferentes canais para sódio dependentes de voltagem têm sido estudados graças a técnicas eletrofisiológicas. Caterall *et al.* (2005) sugeriram uma nomenclatura para estes canais: o nome dado pelo símbolo químico do íon permeável (Na⁺) seguido do principal regulador, por exemplo, voltagem (Na_v), seguido por um número que indica o gene da subfamília (Na_v1) e, por último, um número depois do ponto decimal que indica a isoforma específica do canal (Na_v1.1). Com base nessa nomenclatura, foram descritas nove isoformas de canal para sódio em mamíferos (Nav 1.1- Nav 1.9). Quatro delas (Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3 e Nav 1.6) são expressas no sistema nervoso central. Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 são expressas no sistema nervoso periférico e, finalmente, as isoformas Nav 1.4 e Nav 1.5 são expressas em músculo esquelético e cardíaco, respectivamente (Goldin *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2011; Catterall, 2012).

Em invertebrados, foram descritos os genes “para” de canal de sódio, clonados de *Drosophila melanogaster* (Na_vs) e de *Blattella germanica* (BgNa_v1-1), um gene do aracnídeo *Varroa mite* (VmNa), e os genes do escorpião *Buthus martensii* (BmNa_v1) e da aranha *Ornithoctonus huwena* (OhNa_v1) (Bosmans e Tytgat, 2007).

As toxinas que agem em canais para Na⁺ são de dois tipos: as α-toxinas e as β-toxinas, as quais se diferenciam por seus efeitos farmacológicos e eletrofisiológicos (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2005). Todas as estruturas tridimensionais determinadas mostram que as toxinas escorpiônicas que agem em canais para sódio (NaScTxs) têm uma estrutura com topologia βαββ (Figura 3) (Mouhat *et al.*, 2004).

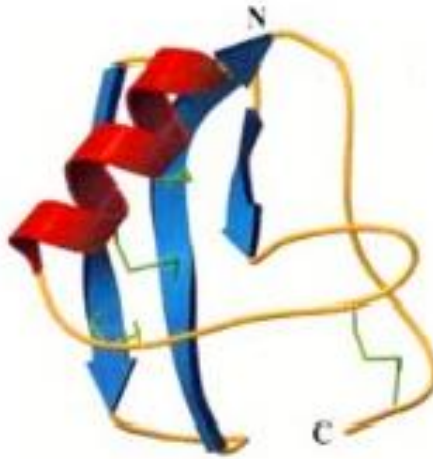


Figura 2. Exemplo de estrutura em 3D de uma NaScTx, a AahII de *Androctonus australis*. PDB Entry ID: 4AEI (Mouhat *et al.*, 2004)

As α NaScTxs, ao se ligarem ao sítio três (domínio IV) da subunidade α, prolongam a fase de abertura do canal, aumentando a condutância ao íon Na⁺ e retardando a inativação do canal. As β-toxinas desencadeiam explosões repetitivas do canal para sódio ligando-se ao sítio 4 (domínio II), diminuindo o limiar de excitabilidade para a abertura do canal para sódio (Rodríguez de la Vega, *et al.*, 2005) (Figura 2).

As α NaScTxs podem ser classificadas segundo suas características farmacológicas em três grupos (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2011)

- α NaScTxs clássicas que são ativas em canais para sódio de mamíferos.
- α NaScTxs inseticidas, altamente específicas para canais para sódio de insetos.
- α NaScTxs *like*, as quais atuam em canais para sódio de mamíferos e de insetos.

As β NaScTxs são formadas por 58-76 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (Catterall *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2011), as quais se dividem em quatro subgrupos segundo sua afinidade a canais para sódio de mamíferos ou insetos (Cohen *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2011):

- Anti-mamíferos ou β NaScTxs clássicas, altamente tóxicas para mamíferos.
- Anti-inseto β NaScTxs excitatórias, que produzem paralisia espasmódica dos nervos motores em insetos quando os potenciais estão mais negativos.
- Anti-inseto β NaScTxs depressoras, que induzem paralisia flácida e uma forte despolarização da membrana axonal.
- β NaScTxs β -*like*, que têm uma alta atividade a canais para sódio de mamíferos e insetos.

As figura 4 e 5 mostram um alinhamento de algumas α NaScTxS e β NaScTxS de espécies do género *Tityus* respectivamente. Borges *et al.* (2012), É importante ressaltar no alinhamento as principais características estruturais como a presença das quatro pontes dissulfeto que conferem uma grande estabilidade ao peptídeo. Para as α NaScTxS, o *core-domain* está constituído por resíduos que formam o *loop* conector entre a primeira folha β e a α -hélice, e o *NC-domain* contém os cinco resíduos entre as posições 8 a 12 na região N-terminal e um segmento de resíduos de aminoácidos que ocupam as posições 54-64 na extremidade C-terminal (Gurevitz, 2012). Para as β NaScTxS é importante ressaltar suas duas superfícies ativas, o farmacóforo, que está estritamente associado à α -hélice do peptídeo e a região C-terminal e o *loop* conector da estrutura secundária do peptídeo (Gurevitz *et al.*, 2001; 2007; Cohen *et al.*, 2005).

		1	10	20	30	40	50	60	70																																																																			
<i>T. serrulatus</i>	Ts3	-	K	D	G	-	Y	P	V	E	-	Y	D	N	C	A	Y	I	C	W	N	Y	D	N	A	-	Y	C	D	K	L	C	K	D	K	-	K	A	D	S	G	Y	C	-	Y	W	V	H	I	L	C	Y	C	Y	G	L	P	D	-	-	-	S	E	P	-	T	K	T	N	G	K	C	K	S		
<i>T. stigmurus</i>	Ts2	-	-	-	K	E	G	-	Y	A	M	D	-	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	A	G	-	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	-	A	W	P	-	-	A	C	Y	C	Y	G	V	P	D	H	I	-	K	V	W	-	D	Y	A	T	N	K	C	-	-
	Tst2	-	-	-	K	E	G	-	Y	A	M	D	-	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	A	G	-	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	-	A	W	P	-	-	A	C	Y	C	Y	G	V	P	D	H	I	-	K	V	W	-	D	Y	A	T	N	K	C	-	-
	Tb2	-	-	-	K	E	G	-	Y	A	M	D	-	H	E	G	C	K	F	S	C	F	P	R	P	A	G	-	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	-	A	W	P	-	-	A	C	Y	C	Y	G	V	P	S	N	I	-	K	V	W	-	D	Y	A	T	N	K	C	-	-
<i>T. bahiensis</i>	Tb2II	-	-	-	K	E	G	-	Y	A	M	D	-	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	S	G	-	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	-	A	W	P	-	-	A	C	Y	C	Y	G	V	P	S	N	I	-	K	V	W	-	D	Y	A	T	N	K	C	-	-
<i>T. costatus</i>	Tcogamma	-	-	-	K	E	G	-	Y	A	M	D	-	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	-	Y	C	G	R	E	C	G	Y	K	-	K	G	S	S	G	Y	C	-	A	W	P	-	-	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	-	K	V	W	-	E	R	A	T	N	R	C	-	-

Figura 3. Alinhamento de algumas α NaScTxS de espécies do género *Tityus*. Borges *et al.* (2012). É importante ressaltar no alinhamento as principais características estruturais como a presença das quatro pontes dissulfeto que conferem uma grande estabilidade ao peptídeo, o *core-domain* está constituído por resíduos que formam o *loop* conector entre a primeira folha β e a α -hélice, e o *NC-domain* contém os cinco resíduos entre as posições 8 a 12 na região N-terminal e um segmento de resíduos de aminoácidos que ocupam as posições 54-64 na extremidade C-terminal (Gurevitz, 2012).

		1	10	20	30	40	50	60	70
<i>T. serrulatus</i>	Ts1	--KEG-YLMD-HEGCKLS	CFIRPSG-YCGRE	CGIK-KGSSGYC-AWP--	ACYCYGLPNVW-KVW-DRATNKC--				
<i>T. clathratus</i>	Tc11	--KEG-YLMD-HEGCKLS	CFIRPAG-YCGRECS	IK-KGKNGYC-AWP--	ACYCYDLPGWA-KVW-DRATNRC--				
	Tc12	--KEG-YLMD-REGCKLS	CFIRPSG-YCGRECE	IK-KGSSGYC-AWL--	ACYCYGLPDRV-KVW-SYATNTC--				
<i>T. pachyurus</i>	Tst1	-GKEG-YLMD-HEGCKLS	CFIRPSG-YCGRECT	LK-KGSSGYC-AWP--	ACYCYGLPNVW-KVW-DRATNKC--				
<i>T. zuliaus</i>	Tpa2	-KKEG-YLVG-NDGCKY	SFTRPAQ-YCVHE	CELR-KGTDGYCYAWL--	ACYCYNMPDHV-RTW-SRATNRCGS				
	Tz1	--KDG-YLVG-NDGCKY	SFTRPGT-YCANEC	SRV-KGKDGICYAWM--	ACYCYSMPNWW-KTW-DRATNRCGR				
<i>T. discrepans</i>	Tz2	--KEG-YLLDKSNGCK	RSCFFGSTS-WCNTE	CKSK-SAEKGYC-AWP--	SCYCYGFSDDS-KMW-DLKTNKC-				
	Td1	--KDG-YLME-PNGCK	RGCLTRPAR-YCPNE	CSRL-KGKDGICYLWL--	ACYCYNMPESA-PVW-ERATNRCGK				
	Td2	--KEG-YLMG-ADGCK	RSLTRPGH-YCANEC	SRV-KGTDGYCYAWL--	ACYCYNMPNWW-KTW-DRATNTCGR				
	Td3	--KDG-YLMG-PDGCK	LDCMLRKGTFCAET	CSLR-KGKDGICYAWL--	ACYCYNMPDSV-KVW-ERATNRCGK				
	Td4	--KDG-YLVG-NDGCKY	SFTRPGT-YCANEC	SRV-KGKDGICYAWM--	ACYCYSMPNWW-KTW-DRATNRCGR				
	Td5	--KDG-YLVG-NDGCKY	SCSTRPGH-YCASE	SRV-KGKDGICYAWL--	ACYCYNMPNWA-PIW-NSATNRC-R				
	Td6	--KEG-YLME-ANGCK	RSLTRPGH-YCANEC	SYV-KGKNGICYAWV--	ACYCYNMPDSV-KIW-DSATNTCGR				
	Td7	--KDG-YLVG-ADGCKY	GCFTRPGH-FCASE	CSLL-KGKDGICYAWL--	ACYCYNLPDSV-PVW-DSATNRCGK				
	Td8	--KDG-YLVG-DDGCK	MHCFTRPGH-YCASE	SRV-KGKDGICYAWL--	ACYCYNMPNWA-PIW-NSATNRCR-				
	Td9	--KDG-YLVG-DDGCK	MHCFTRPGH-YCASE	SRV-KGKDGICYAWL--	ACYCYNMPNWA-PIW-NSATNSCGK				
	Td10	--KDG-YLMG-PDGCK	RGCLTRPAR-YCPNE	CSRL-KGKDGICYLWL--	ACYCYNMPESA-PVW-ERATNRCGK				
	Td11	--KDG-YLMG-SDGCK	LDCMLKKGTYCADE	CSRV-KGKDGICYLWL--	ACYCYNMPDSV-KVW-ERATNRCGK				
	Td12	--KDG-YLME-PNGCK	RGCLTRPAR-YCANEC	SRV-KGTDGYCYAWL--	ACYCYNMPNWW-KTW-DRATNTCGR				

Figura 4. Alinhamento de algumas β NaScTxs de espécies do género *Tityus*. Borges *et al.* (2012) no seu artigo comparam as sequências de aminoácidos das toxinas putativas Tc11 e Tc12 de *T. clathratus* com β -toxinas como a Ts1 do escorpião brasileiro *T. serrulatus*. É importante ressaltar no alinhamento as principais características estruturais como a presença das quatro pontes dissulfeto que conferem uma grande estabilidade ao peptídeo e suas duas superfícies ativas, o farmacóforo, que está estritamente associado à α -hélice do peptídeo e a região C-terminal e o *loop* conector da estrutura secundária do peptídeo (Gurevitz *et al.*, 2001; 2007; Cohen *et al.*, 2005).

1.6 INTERAÇÕES ENTRE AS TOXINAS E OS CANAIS PARA SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VGSCs)

As neurotoxinas que agem nos VGSCs podem se ligar em seis locais diferentes da subunidade alfa do canal, distinguindo a localização da toxina e ação dela no canal (Stevens *et al.*, 2011) (Figura 5).

Além dos receptores de neurotoxina, dois outros locais são determinados. O sítio piretróide de ligação, que é o sítio de ligação para alguns agentes inseticidas como o DDT, e o sítio LA, onde se ligam anticonvulsivantes, antiarrítmicos e anestésicos locais (Stevens *et al.*, 2011) (Figura 5).

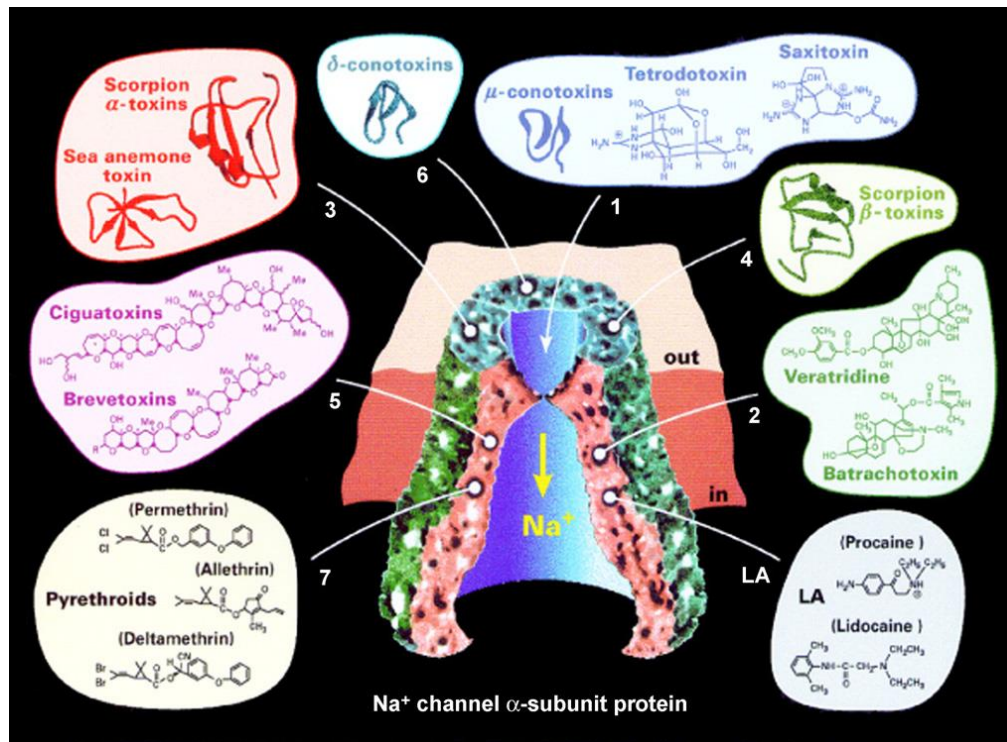


Figura 5. Representação esquemática da subunidade α do canal para sódio e os diferentes sítios de recepção de neurotoxinas segundo sua localização e função (Gordon *et al.*, 2007).

A interação entre as neurotoxinas e os VGSCs pode ocorrer de duas maneiras diferentes: ou obstruem o poro do canal inibindo a condutância do sódio, ou ela modificam o canal, levando a uma alteração cinética de propagação e voltagem-dependência dos canais (Stevens *et al.*, 2011).

As toxinas que agem no sítio 1 do canal para sódio (TTX, STX), usam o primeiro mecanismo de interação, inibindo a ação do canal. No sítio 2 toxinas como batracotoxina e grayanotoxina vão impedir a inativação do canal. As toxinas escorpiônicas do tipo α e as toxinas de anêmonas são exemplos típicos daquelas que agem no sítio 3; sua ação no canal para sódio é atrasar ou inibir a inativação. As toxinas de escorpião do tipo β e toxinas de aranha do tipo β se ligam ao sítio 4 do canal e mudam a dependência de voltagem da ativação rumo a potenciais mais hiperpolarizados, reduzindo a amplitude da corrente. No sítio 5, as brevetoxinas e ciguatoxinas exibem efeitos de inibição da ativação e mudança na

hiperpolarização da ativação dependente de voltagem, sobre a ligação nos VGSC. Por último, estão as δ -conotoxinas agindo no local seis do canal que fará os mesmos efeitos que as toxinas que se ligam no sítio 3 diminuindo ou inibindo a inativação (Stevens *et al.*, 2011).

1.7 PESQUISAS COM A PEÇONHA DE ESCORPIÕES DO GÊNERO *Tityus* NA COLÔMBIA.

Estudos com a peçonha de *Tityus* têm despertado grande interesse devido a que contém as espécies mais perigosas do mundo.

Em um estudo da toxicidade da peçonha do escorpião *Tityus pachyurus* em camundongos, foi determinado sua DL_{50} no valor de 4,8 mg/kg, e descreveu-se sinais de envenenamento como sialorréia, dispneia, ataxia e alterações do comportamento (Barona *et al.*, 2004), posteriormente também foi descrita na peçonha desse escorpião uma NaScTx, a Tpa2, classificada como β NaScTx clássica (Barona *et al.*, 2006).

Em 2008, estudos histopatológicos em camundongos com a peçonha do escorpião *T. pachyurus*, demonstram lesões tissulares, alterações miocárdicas e disfunção do sistema nervoso autônomo (Rodríguez, 2008).

Existem também estudos mais recentes com *T. pachyurus*, onde foram identificadas e caracterizadas novas toxinas moduladoras de canais para sódio, graças à construção da biblioteca de cDNA, com a qual se identificaram cinco novas toxinas putativas com atividade prevista nos canais para sódio, e por similaridade estrutural três que foram classificadas como α NaScTxs: Tpa4, Tpa5, Tpa6 e duas como β NaScTxs: Tpa7 e Tpa8 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012).

Foi descrito o caso de um menino de 12 anos de idade, que foi picado por um escorpião *T. pachyurus* em Tolemaida a duas horas de Bogotá D.C.

(Colômbia) apresentando inicialmente sinais e sintomas locais de envenenamento e posteriormente, envolvendo uma sintomatologia severa como disfunção miocárdica, colapso cardiovascular e falha cardíaca, que foi favoravelmente tratado com o antiveneno específico (Izquierdo e Rodríguez, 2012).

Para determinar algumas características clínicas e epidemiológicas do escorpionismo, foi feito um estudo descritivo em diferentes hospitais da Colômbia. Cento e vinte e nove casos foram admitidos em duas regiões da Colômbia: Antioquia e Tolima durante um ano. As espécies de escorpiões envolvidas foram: *T. pachyurus*, *T. fuehrmanni*, *T. asthenes*, *Centruroides gracilis* e *Chactas* spp. As sinais e sintomas sistêmicas foram vômito, taquipnéia e hipertensão. Do total de pacientes das duas regiões da Colômbia (Antioquia e Tolima), 98 apresentaram envenenamento leve, 27 envenenamento moderado e 4 envenenamento severo (Otero *et al.*, 2004).

Também foi feita uma revisão sobre a ecoepidemiologia dos escorpiões de importância médica e sua incidência nas populações humanas, incluindo espécies da família Buthidae como: *T. pachyurus*, *T. fuehrmanni*, *T. asthenes*, *C. gracilis* (Gómez e Otero, 2007), demonstrando que *T. pachyurus*, *T. fuehrmanni*, *T. asthenes*, são as espécies que podem causar envenenamento moderado ou severo em crianças. *Tityus pachyurus* e *C. gracilis* na região do Tolima e Valle del Alto y Medio Magdalena (Colômbia); *T. asthenes*, *T. fuehrmanni* e *C. gracilis*, na região da Antioquia (Colômbia).

Foram determinadas também as características toxicológicas da peçonha de *T. fuehrmanni*: a DL₅₀ em camundongos é de 3,9mg/kg e os sintomas do envenenamento incluem sialorréia, piloereção, sudorese e sonolência, além de taquipnéia, ataxia e convulsões (Gómez *et al.*, 2002).

Na região noroeste da Colômbia (Mutatá), foram analisados os aspectos epidemiológicos, clínicos e toxicológicos do escorpião *T. asthenes* em

camundongos, apresentando sintomas como sialorréia, dispneia, lacrimejamento e ataxia. A DL₅₀ foi de 6,1 mg/kg (Gómez *et al.*, 2010).

O único trabalho que se tem com o escorpião *Tityus* sp pertencente ao grupo *forcipula* ainda em descrição, é o estudo de toxicidade da sua peçonha, pela determinação da DL₅₀ de 3,5mg/kg, sendo observando em camundongos os sinais e sintomas, sialorréia, rinorréia, lacrimejamento, dispneia, priapismo, ataxia, e convulsões, causadas pelo envenenamento (Morales-Duque *et al.*, em preparação para publicação). O grupo *forcipula* ao qual pertence este escorpião faz referência às espécies do gênero *Tityus* que se caracterizam por apresentar granulações grossas em todo seu corpo, todas as espécies deste grupo são semelhantes à *Tityus forcipula* (Gervais, 1843).

A DL₅₀ do *Tityus* sp foi comparada com algumas DL₅₀ de escorpiões do gênero *Tityus* (tabela 1) mostrando que sua DL₅₀ de 3,5mg/kg está entre os valores mas altos observados ao ser comparados com outras espécies deste gênero, que são consideradas como as espécies mais perigosas do mundo.

Tabela 1: Valores de DL₅₀ de algumas espécies do gênero *Tityus*

Espécie	Linhagem Camundongo	Via de administração	DL₅₀(mg/kg)
<i>T. stigmurus</i>	C57BL/6	Subcutânea	0,773
<i>T. bahiensis</i>	CD1	Subcutânea	1,38
<i>T. serrulatus</i>	Swiss	Subcutânea	1,49
<i>T. costatus</i>	CD1	Subcutânea	1,59
<i>T. zulianus</i>	CD1	Intravenosa	1,68
<i>T. discrepans</i>	C57BL/6	Subcutânea	2,5
<i>Tityus sp.</i>	Swiss	Subcutânea	3,5
<i>T. pachyurus</i>	Swiss	Subcutânea	4,8
<i>T. ivicnancor</i>	C57BL/6	Subcutânea	8,43
<i>T. obscurus</i>	Swiss	Subcutânea	12,14
<i>T. caripitensis</i>	Swiss	Subcutânea	14,56

2. JUSTIFICATIVA

A picada de escorpião é uma ocorrência habitual na Colômbia. Existem casos graves de envenenamento em diferentes regiões do país; a população com maior risco de envenenamento sistêmico com complicação e morte são as crianças menores de 10 anos (Otero *et al.*, 1998; Rodríguez, 2006, Izquierdo e Rodríguez, 2012). No entanto, infelizmente, há um desconhecimento geral sobre seu acidente e seu quadro clínico.

Os estudos bioquímico-farmacológicos, envolvendo os componentes que constituem as peçonhas de escorpiões colombianos do gênero *Tityus* e seus efeitos, são escassos, e as exceções são representadas pelos trabalhos feitos com a peçonha do escorpião *Tityus pachyurus* (Barona *et al.*, 2004; 2006; Otero *et al.*, 2004; Gómez e Otero, 2007; Rodriguez, 2008; Guerrero-Vargas *et al.*, 2012; Izquierdo e Rodríguez, 2012), *T. fuhrmanni* (Gómez *et al.*, 2002) e *T. asthenes* (Gómez *et al.*, 2010), sendo de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas que incluam a peçonha dessas espécies.

É primordial destacar que os peptídeos que atuam nos canais para sódio dependentes de voltagem (NaScTx) são os principais responsáveis pelos sintomas neurotóxicos após o envenenamento escorpiônico em mamíferos, e por isso é extremamente importante o estudo dessas toxinas, devido a sua grande importância médica e caracterização dos seus efeitos farmacológicos.

Os estudos com toxinas de escorpiões têm ajudado grandemente a conhecer a estrutura e a fisiologia dos canais dependentes de voltagem das membranas celulares. Essas toxinas atuam com enorme afinidade e especificidade em canais iônicos de vertebrados e invertebrados, por exemplo, nos canais para sódio. Além disso essas toxinas têm sido empregadas para conhecer melhor as diferentes patologias que afetam a função desses canais e na busca de novos fármacos (Bosmans e Tygat, 2007).

Estudos envolvendo espécies de escorpiões estão aumentando e devido ao enorme potencial médico, biotecnológico e farmacológico que têm suas toxinas, esta área está sendo cada vez mais explorada, usando os peptídeos isolados das peçonhas como importantes fontes de compostos neuroativos. A noção da epidemiologia do envenenamento com escorpiões sublinha a necessidade de gerar novas pesquisas para ampliar o conhecimento no campo do escorpionismo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar biologicamente peptídeos moduladores de canais para sódio na peçonha do escorpião Colombiano *Tityus* sp. pertencente ao grupo *forcipula*.

3.2 Objetivos específicos

- Fracionar os componentes peptídicos da peçonha, mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Analisar as frações cromatográficas de interesse por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF.
- Caracterizar quimicamente os peptídeos moduladores de canal para sódio encontrados na peçonha do escorpião *Tityus* sp.
- Avaliar a atividade eletrofisiológica do peptídeo caracterizado em canais para sódio por meio da técnica de *patch-clamp*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos escorpiões

Cinquenta escorpiões *Tityus* sp. pertencente ao grupo *forcipula* foram coletados na cidade de Popayán - Cauca - Colômbia, geograficamente localizada 18° 00' 57" Norte, 99° 31' 32" Oeste a uma altitude de 857 metros acima do nível do mar. A coleta realizou-se durante a noite entre as 18 e 24 horas com lâmpadas de luz ultravioleta e pinças cirúrgicas.

4.2 Manutenção dos escorpiões em cativeiro

Os escorpiões coletados foram mantidos no Biotério da *Universidad del Cauca (Centro de Investigaciones Biomédicas de La Universidad Del Cauca - CIBUC)* em terrários de plástico individuais, alimentados com baratas e água *ad libitum*.

4.3 Obtenção da peçonha

A peçonha dos 50 escorpiões foi obtida usando o método de estimulação elétrica do télson com um gerador de impulsos elétricos Square Wave Stimulator 1999 (82415IS *Lafayette Instrument Company*) na cidade de Popayán – Colômbia. Este procedimento foi realizado a cada 30 dias. A peçonha coletada foi centrifugada a 15.000 g durante 15 minutos e 8°C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi recuperado, liofilizado e armazenado a -70°C.

4.4 Fracionamento da peçonha bruta do escorpião *Tityus* sp por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Alíquotas de 1 mg da peçonha foram ressuspensas em água Milli-Q-TFA 0,12% (solução A) e fracionadas em coluna de fase reversa

C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), previamente equilibrada com a solução A.

A eluição foi realizada utilizando-se um gradiente linear de TFA 0,12% (v/v) em água Milli-Q (solução A) a 60% da solução B (TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila) em 60 minutos a um fluxo de 1mL/min e detecção a 216 e 230 nm. As frações cromatográficas foram coletadas manualmente, secas sobre vácuo e armazenadas a -20 °C.

As frações de maior interesse foram recromatografadas usando-se a mesma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, USA), utilizando-se mesmas soluções A e B, sob condições otimizadas quanto ao gradiente linear da solução B.

4.5 Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF e sequenciamento *de novo*

A pureza e as massas moleculares das frações de interesse foram determinadas por espectrometria de massa. As frações recromatografadas foram reconstituídas em água Milli-Q e diluídas na matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). Cada fração foi aplicada, em triplicata, na placa de MALDI e secada à temperatura ambiente por 15 minutos. A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

As sequências de aminoácidos dos peptídeos purificados foram determinadas por espectrometria de massa (MS/MS). Os peptídeos de interesse foram ressuspensos em água Milli-Q e diluídos na matriz redutora

1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay* (ISD) usando o programa *FlexControl* 3.0 e *FlexAnalysis* 3.0 (*Bruker Daltonics*, Alemanha).

As sequências obtidas foram submetidas à busca por similaridade por meio da ferramenta *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os alinhamentos foram feitos com o programa *CLUSTALX software* (Thompson *et al.*, 1998).

4.6 Caracterização da atividade do peptídeo em canais de sódio

4.6.1 Modelos Animais

Foram utilizados ratos albinos, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com massa corporal entre 250-350g. Os animais foram mantidos em caixa de propileno à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum* no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais.

O manuseio e a utilização desses animais nos diversos protocolos experimentais obedeceram às normas estabelecidas pelas diretrizes para cuidados com animais de experimentação da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), sendo o projeto submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da instituição (CEUA-UFMG, nº de protocolo 115166653-0/64).

4.6.2 Dissecção e Dissociação

Os animais foram eutanaziados por meio de asfixia com dióxido de carbono (CO_2) para remoção dos gânglios da raiz dorsal dos ratos (DRG), os quais foram dissecados cuidadosamente, os tecidos em anexos removidos e imediatamente

imersos em solução de TYRODE (em mmol/L: NaCl 140; KCl 5; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,5; HEPES 5 e glicose 5).

Após a dissecação, os DRG foram acondicionados em solução salina balanceada de Hanks livre de Ca²⁺/Mg²⁺ (HBSS, em mmol/L: NaCl 137,93; KCl 5,33; KH₂PO₄ 0,44; NaHCO₃ 4,0; Na₂HPO₄ 0,3 e glicose 5,6.) suplementado com 1 mg/mL de colagenase tipo I (Sigma ChemicalCo., St. Louis, EUA) durante 75 minutos a 37°C, seguido de uma solução de HBSS com 0,25% m/v de tripsina (Gibco, Carlsbad, EUA) por 15 minutos, a 37°C. Para assegurar que a cultura neuronal não sofreria contaminação, foi acrescentado 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) do volume da solução total.

Os gânglios foram então separados dos tecidos adjacentes por uma suave trituração em meio de Eagles modificado por Dulbecco. A esse meio, foram acrescentados 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina-estreptomicina.

As células da glia foram depositados em lamínulas tratadas com Poli-D-Lisina 0,5%, incubados em ar atmosférico saturado com 5% CO₂, mantidos a 37°C e utilizados no período de 12 a 48 h.

4.6.3 Registro em *patch clamp*

As correntes iônicas nos neurônios foram registradas por meio da técnica de *patch clamp* em modo "*Whole cell*" usando o clampeamento de voltagem, onde é possível manter constante o potencial da membrana da célula em um valor definido de acordo com o experimento e registrar correntes macroscópicas dos canais iônicos presentes na membrana da célula.

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C). As células ficaram em uma câmara de perfusão preenchida com solução de banho

montada em um microscópio invertido (Olympus IMT-2, Tokyo, Japan). Os protocolos de estimulação, de registro e análise dos dados foram pré-programados e gerados por um *software* em computador (Pulse, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemanha).

Os registros das correntes iônicas foram conduzidos com pipetas de vidro preenchidas com uma solução interna específica para cada corrente iônica a ser registrada. Quando colocadas na solução de banho, essas pipetas tinham uma faixa de resistência de 1,0 a 3M Ω e eram conectadas por um fio de Ag-AgCl a um amplificador HEKA-EPC 9/2 (Lambrecht, Alemanha). O movimento da pipeta foi controlado pelo micromanipulador (MWO-3, NarishigeInternational Inc., LongIsland, NY, EUA).

Para o registro das correntes de Na⁺, são necessárias soluções de banho, de perfusão externa e interna de pipeta. A finalidade da solução de banho (TYRODE) é manter as células viáveis enquanto ainda não são feitos os registros eletrofisiológicos de *patch-clamp*. A solução externa utilizada é em mmol/L: NaCl 40, cloreto de colina 70, KCl 3, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, TEA-Cl 20, CdCl₂ 0,1, Hepes 10 e glicose 10. Essa solução é usada somente durante os registros das correntes e distribuída por um sistema de microperfusão, posicionado nas vizinhanças da célula a ser estudada. O pH das soluções acima foi ajustado para 7,40 com HCl. A solução interna de pipeta consistiu de (em mmol/L): NaCl 10, CsCl 100, Hepes 10, ácido etileno glicol tetraacético (EGTA) 11, TEA-Cl 10, MgCl₂ 5 e teve seu pH ajustado para 7,2 com CsOH. A colina serviu como cátion monovalente não permeante em substituição ao Na⁺ extracelular e foi utilizada para reduzir a amplitude da corrente de Na⁺. Cs⁺ e tetraetilamônio (TEA) foram utilizados para o bloqueio dos canais para K⁺ e Cd²⁺ utilizado como bloqueador dos canais para Ca²⁺.

Reservatórios contendo as soluções foram conectados em um solenoide, que permite a troca rápida entre as soluções a serem testadas com um pequeno volume inutilizado (100 a 200 μL).

As frações de interesse escolhidas do cromatograma geral foram aliqüotadas em tubos eppendorff aproximadamente com 22 μg da toxina de *Tityus* sp em cada um. Cada fração foi diluída em 30 μL de água e aliqüotada em três tubos de 10 μL cada um para serem injetados 2 μL da toxina em 5 repetições com concentrações de 25 e 100nmol/L para a primeira toxina e 100nmol/L para a segunda toxina.

4.6.4 Caracterização dos parâmetros e registros das correntes relacionadas aos canais para sódio

Todas as células foram mantidas em um potencial de “reposito” de -80 mV.

A célula foi despolarizada até 0 mV a partir de um potencial de -120 mV durante 100 ms para a obtenção da corrente total de Na^+ . O intervalo entre um estímulo e outro foi de 5 s.

De forma a registrar a ativação e inativação estacionária (também conhecida como inativação “*steady-state*”) da corrente de Na^+ utilizou-se um protocolo de pulsos de potencial. No protocolo, utilizamos um pré-pulso de 400 ms, onde o potencial foi levado a -120 mV para maximizar a fração de canais para Na^+ no estado fechado. Ao final do pré-pulso e a partir desse novo potencial, pulsos despolarizantes de duração de 80 ms e a uma taxa de incremento de 5 mV em sua amplitude foram aplicados até o alcançar o potencial de + 60 mV. Com essa estratégia, a corrente de Na^+ é deflagrada nessa região do protocolo e, assim, é possível construir a relação corrente-voltagem (relação IxV) para a ativação. Ao final desse pulso despolarizante, foi criado um pulso de 20 ms de duração e potencial fixo em 0 mV para a investigação da inativação do estado estacionário.

5. RESULTADOS

5.1 Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta

A cromatografia de 1mg de peçonha bruta do escorpião *Tityus* sp pertencente ao grupo *forcipula*, em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) resultou em 54 frações, das quais as de maior abundância eluíram entre os tempos de retenção de 33 e 46 minutos, correspondendo a 33-46% de acetonitrila (figura 6).

Foram feitas aproximadamente 25 cromatografias com 25mg de peçonha do escorpião *Tityus* sp, usando 1mg de peçonha por cada.

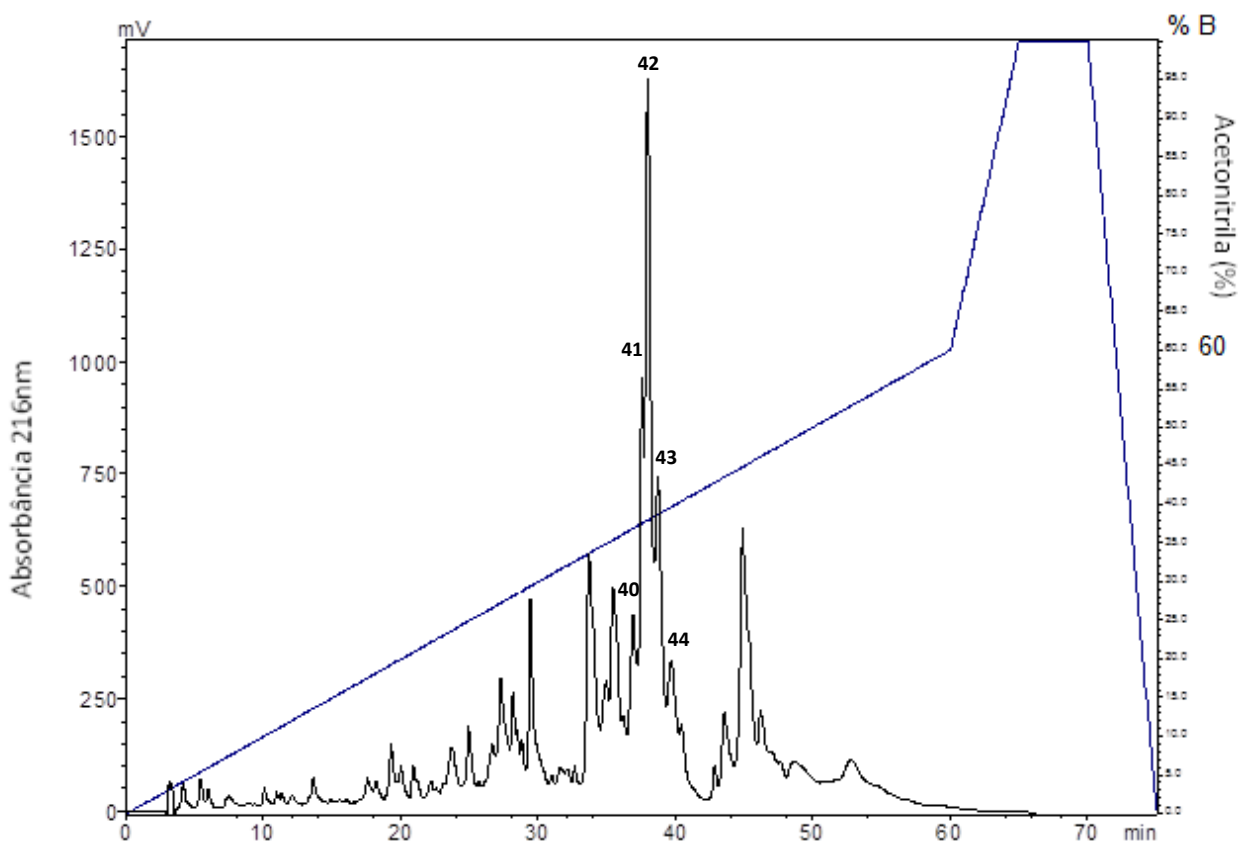


Figura 6. Perfil cromatográfico da peçonha do escorpião *Tityus* sp. em coluna de fase reversa C18. Alíquotas de 1mg da peçonha foram dissolvidas em água com 0,12% de TFA (v/v) (solução A) e aplicadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) previamente equilibrada com água com 0,12% de TFA (v/v). As frações foram eluídas sob um gradiente linear de acetonitrila (linha azul) com 0,1% de TFA (v/v) (solução B) com um fluxo constante de 1mL/min e monitoramento a 216 nm.

Estudos de proteômica da peçonha de espécies do gênero *Tityus* (Pimenta *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2004; Diego García *et al.*, 2005; Barona *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2006) têm mostrado que entre 30-40 % de acetonitrila eluem os peptídeos moduladores de canais para sódio. Por essa razão, foram submetidas a uma nova etapa cromatográfica, as frações 40, 41, 42, 43 e 44.

5.2 Recromatografia, análise de massa e sequenciamento *de novo* das frações de interesse.

5.2.1 Fração 40

A Fração 40 foi submetida a uma nova etapa cromatográfica, empregando-se uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) e um gradiente linear de 20% a 45% do solvente B, em 65 minutos. Duas frações foram obtidas (figura 7).

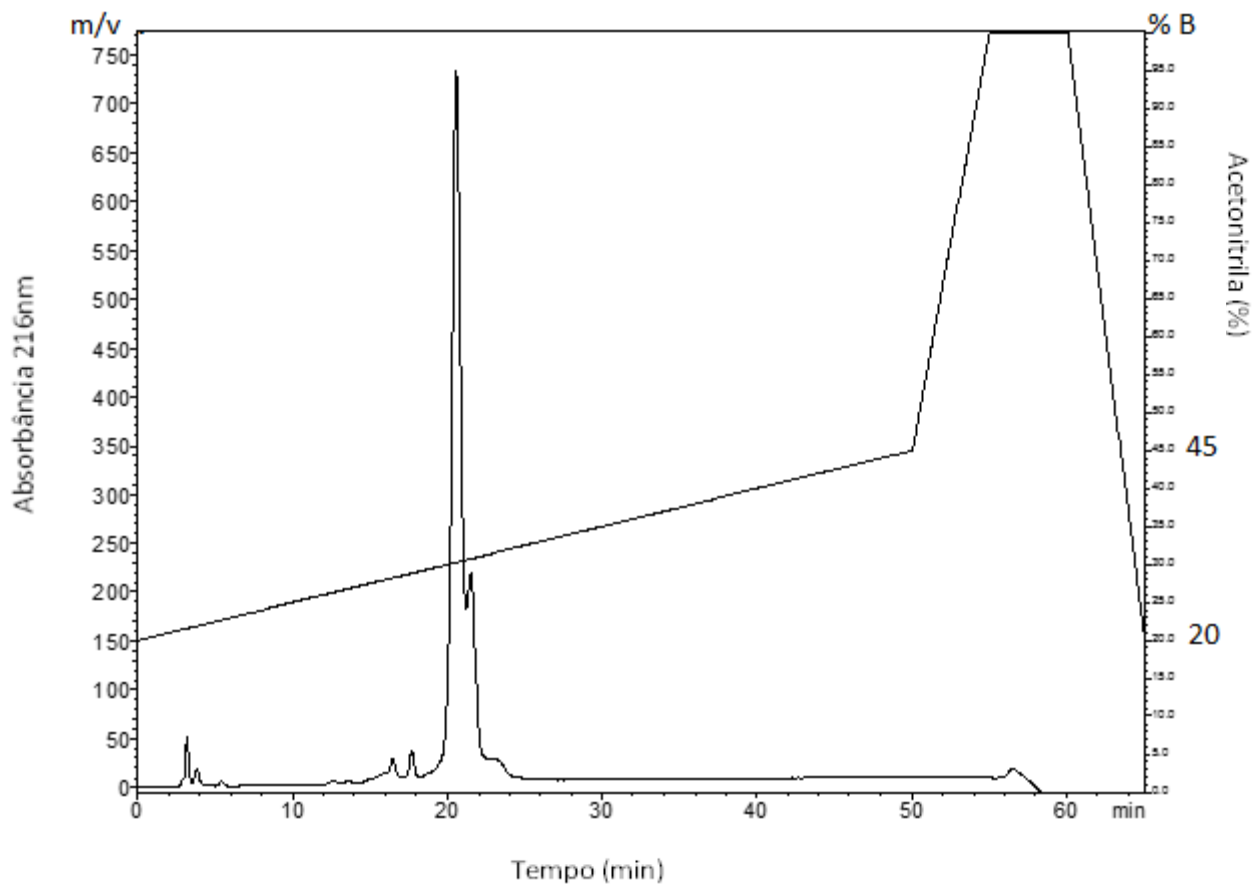


Figura 7. Perfil cromatográfico da fração 40. A fração 40 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A fração mais abundante foi submetida a uma segunda recromatografia em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, resultando em uma fração predominante (figura 8).

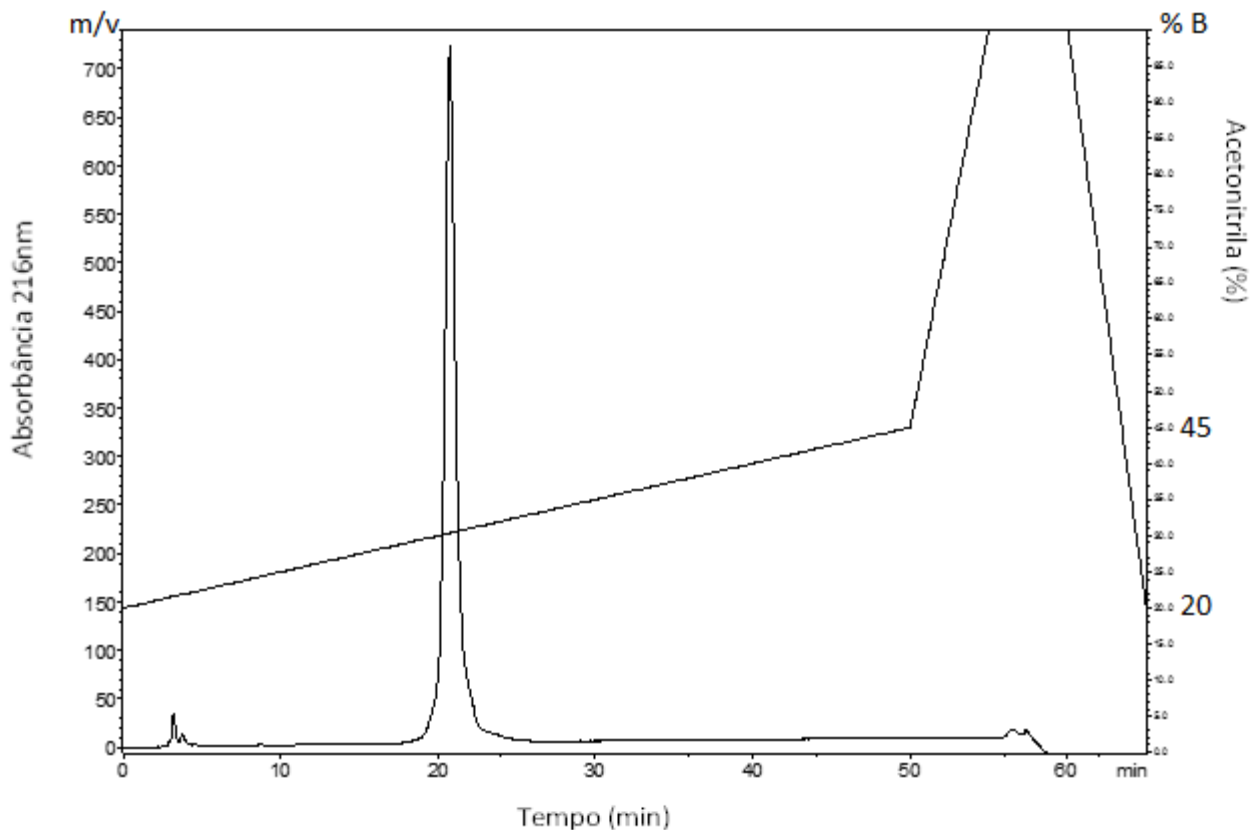


Figura 8. Perfil cromatográfico da fração 40. A fração 40 teve uma segunda recromatografia por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A massa molecular e a pureza da fração 40, que passará a ser denominada de Tpy10 no presente trabalho, foram conferidas por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, e observam-se três valores de massa, onde 2442,9 Da é a tripla carga, 3670,4 Da é a carga dupla e 7342,7 Da carga única (Figura 9).

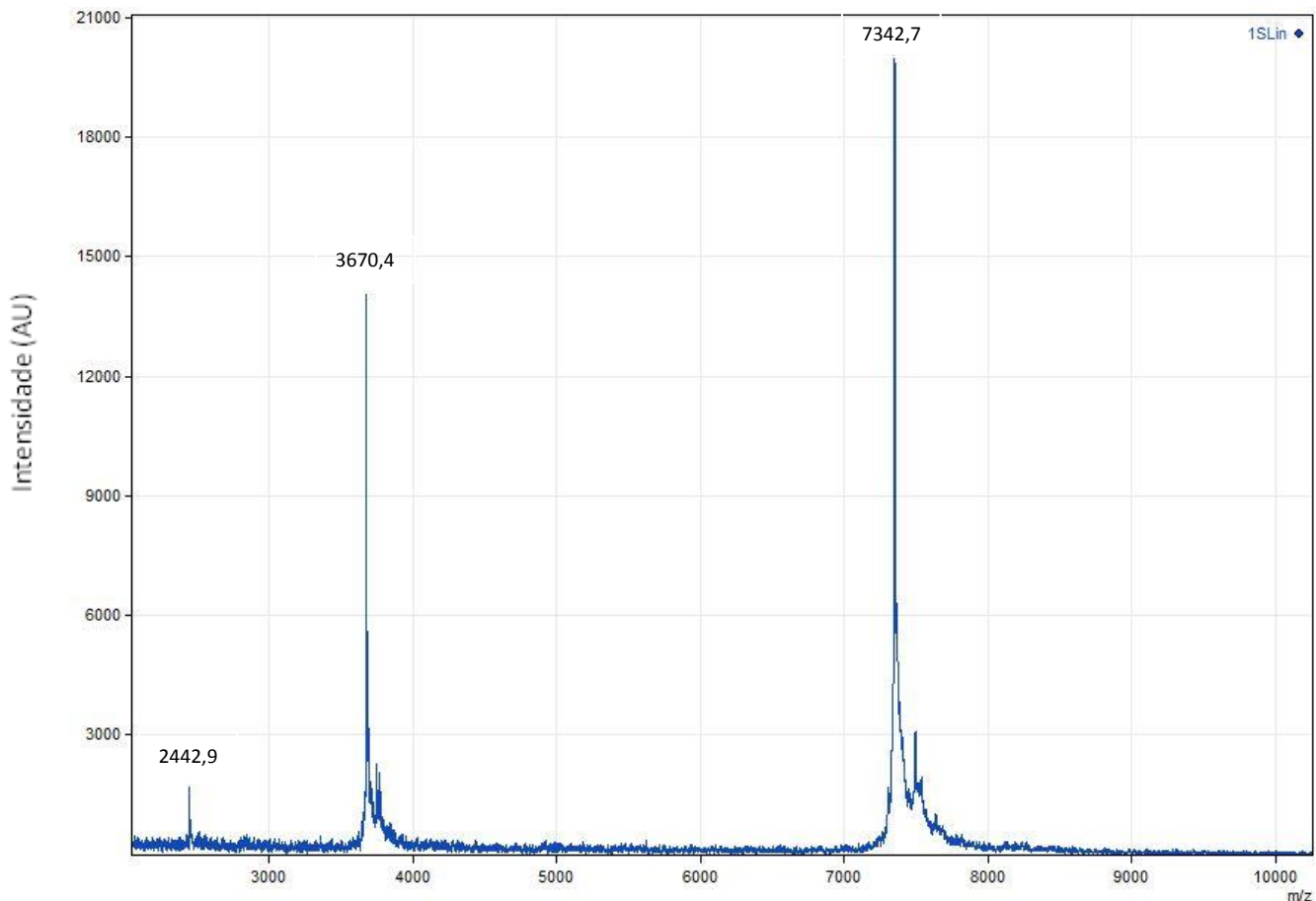


Figura 9. Espectro de massa molecular da Tpy10, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)*.

5.2.1.1 Sequenciamento *de novo* da Tpy10

A sequência parcial da Tpy10 foi determinada por espectrometria de massa (MS/MS), a sequência parcial de 32 resíduos de aminoácidos obtida foi:

NNYCKI/LYCPNTKVCKETCKNRASAPDGECGDGW

As ambiguidades de alguns resíduos de aminoácidos como I/L foram resolvidas depois de alinhar a Tpy10 com outras NaScTxns já descritas e foi escolhido o resíduo de aminoácido que se conservava entre elas.

A sequência parcial da nova toxina Tpy10 possui 91% de identidade com a Tpa5 ($4e^{-17}$) e 75% com a Tpa6 ($2e^{-17}$), ambas de *T. pachyurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), 64% com a TdNa9 ($5e^{-11}$) e 72% com a TdNa10 ($3e^{-8}$), ambas de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009).

As toxinas Tpa5, Tpa6, TdNa9 e TdNa10 não foram ensaiadas em canais para sódio, mas estão catalogadas como toxinas do tipo alfa segundo sua similaridade estrutural (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012; D'Suze *et al.*, 2009). Uma identidade acima dos 60% da Tpy10 com essas toxinas sugere que a Tpy10 seria uma nova toxina tipo alfa. No entanto, no teste eletrofisiológico da Tpy10 nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG), foi observada uma modificação das correntes iônicas de canais para sódio próprio das β NaScTx.

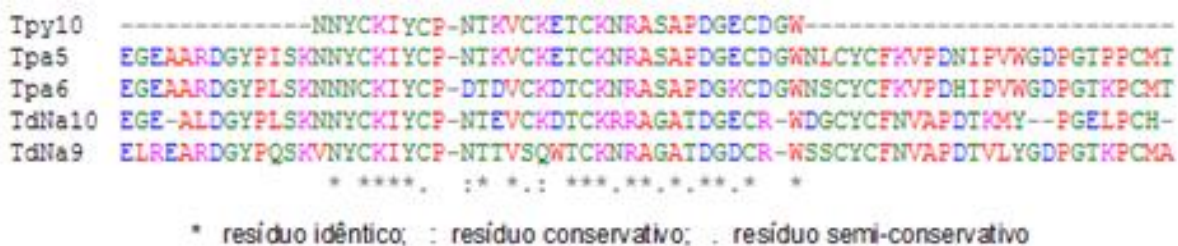


Figura 10. Alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpy10 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade.

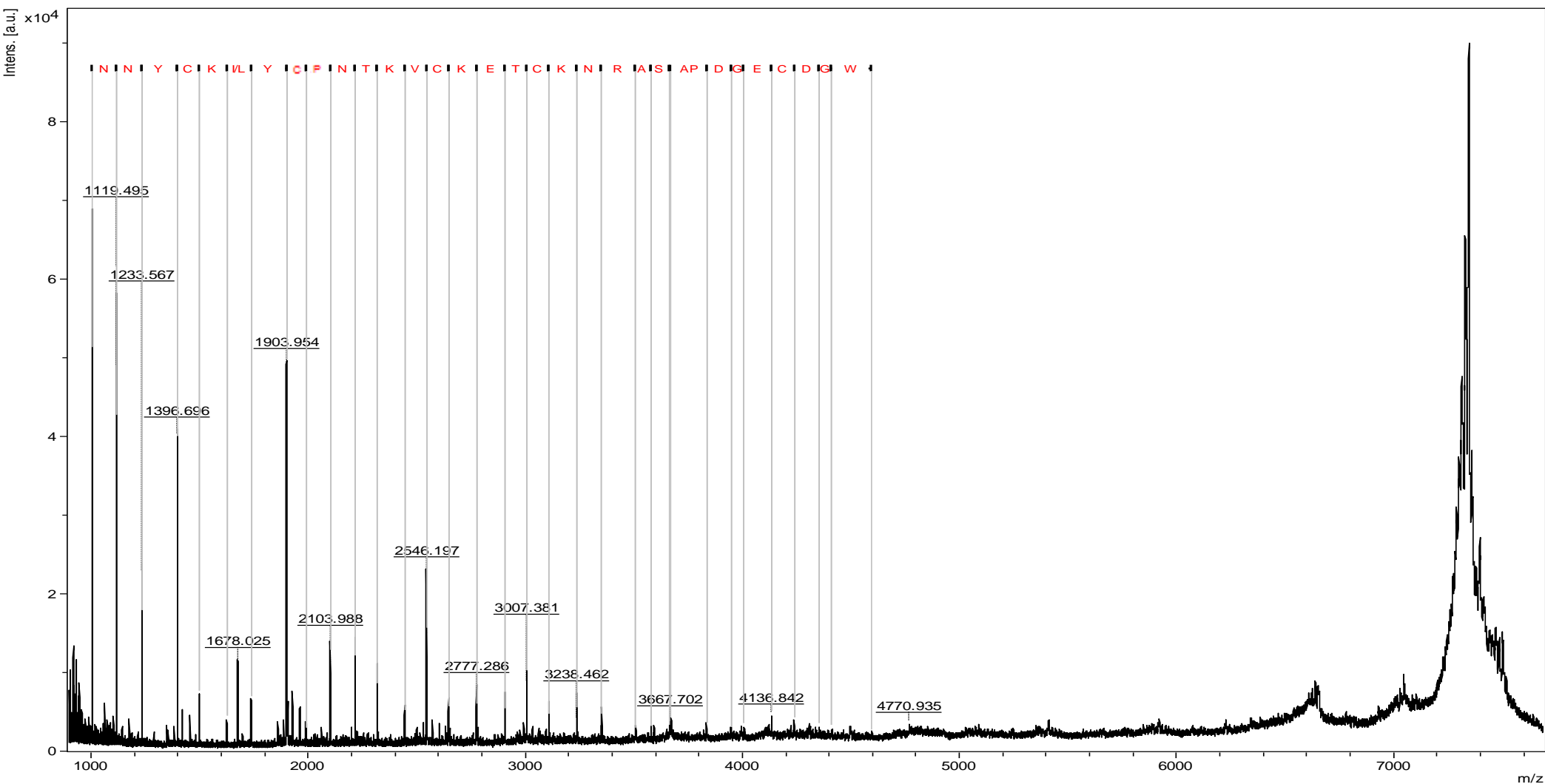


Figura 11. Sequência parcial de aminoácidos da Tpy10, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspenso em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay* (ISD) usando o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics, Alemanha).

5.3 AVALIAÇÃO ELETROFISIOLOGICA

5.3.1 Análise eletrofisiológica da Tpy10

A Tpy10 em uma concentração de 25nmol/L causou uma redução da amplitude de corrente de sódio, e com uma concentração maior, de 100nmol/L, inibiu completamente a corrente, sendo esse um efeito próprio de toxinas pertencentes à família das β NaScTxs (figura 12). Considerando-se a atividade em canais para sódio, a Tpy10 é classificada como uma nova β NaScTxs.

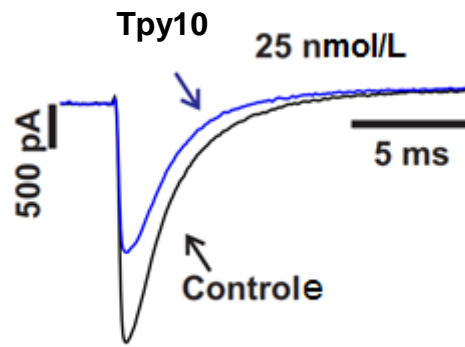


Figura 12. Efeito da toxina Tpy10 (25nmol/L) aplicando 500pA de corrente em 5ms sobre as correntes iônicas nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).

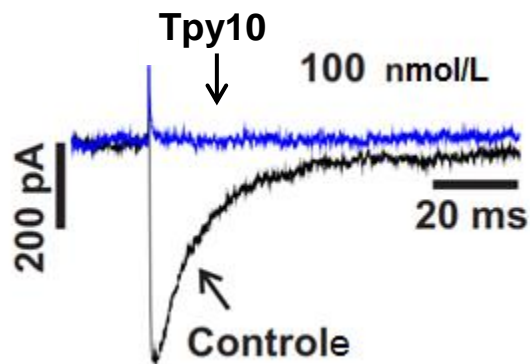


Figura 13. Efeito da toxina Tpy10 (100nmol/L) aplicando 200pA de corrente em 20ms sobre as correntes iônicas nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).

5.4 Fração 41

A Fração 41 foi submetida a uma nova etapa cromatográfica, empregando-se uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) e um gradiente linear de 20% a 45% do solvente B, em 65 minutos. Duas frações foram obtidas (figura 14).

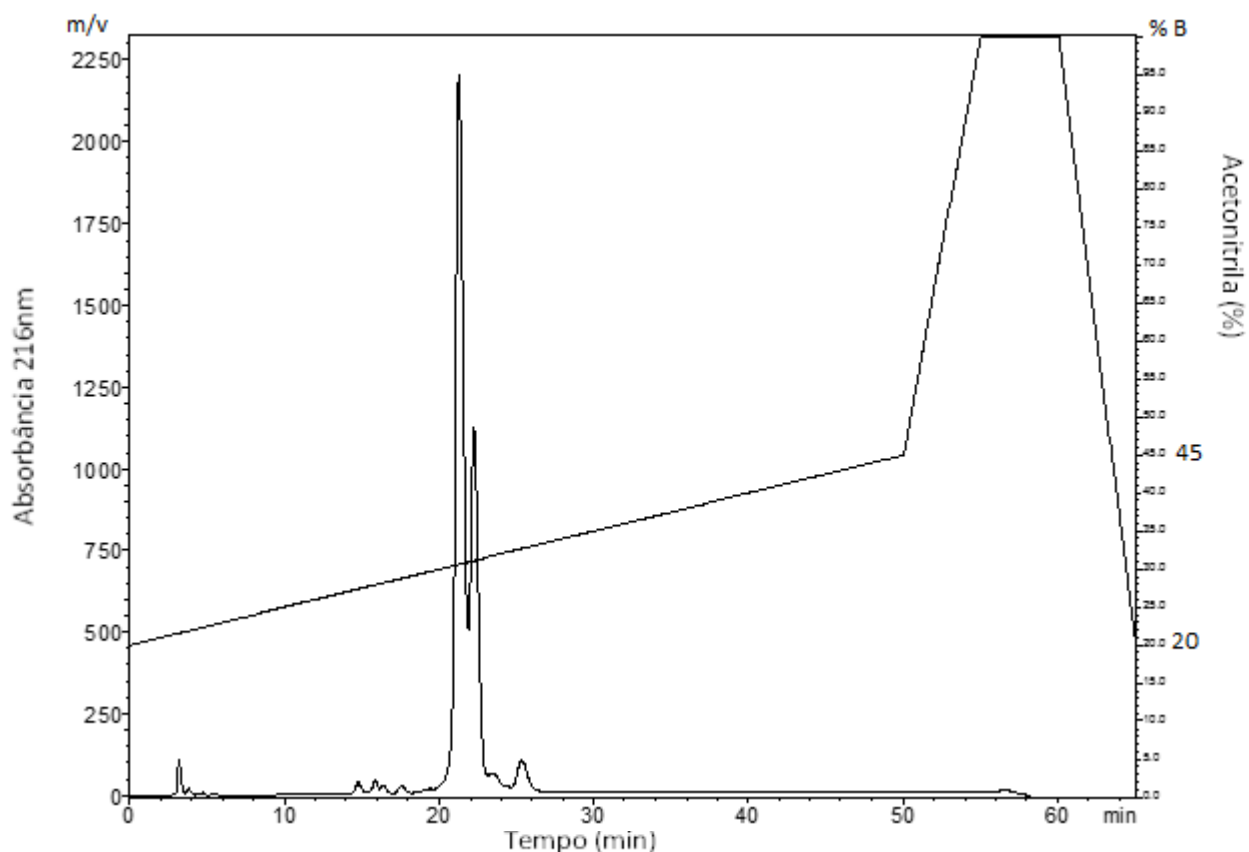


Figura 14. Perfil cromatográfico da fração 41. A fração 41 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A pureza e a massa molecular da fração 41, denominada de Tpy11 neste trabalho, foram verificadas por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, e observam-se três valores de massa, onde 2323,7 Da é da tripla carga, 3486,4 Da é a carga dupla e 6971,9 Da é da carga única (Figura 15).

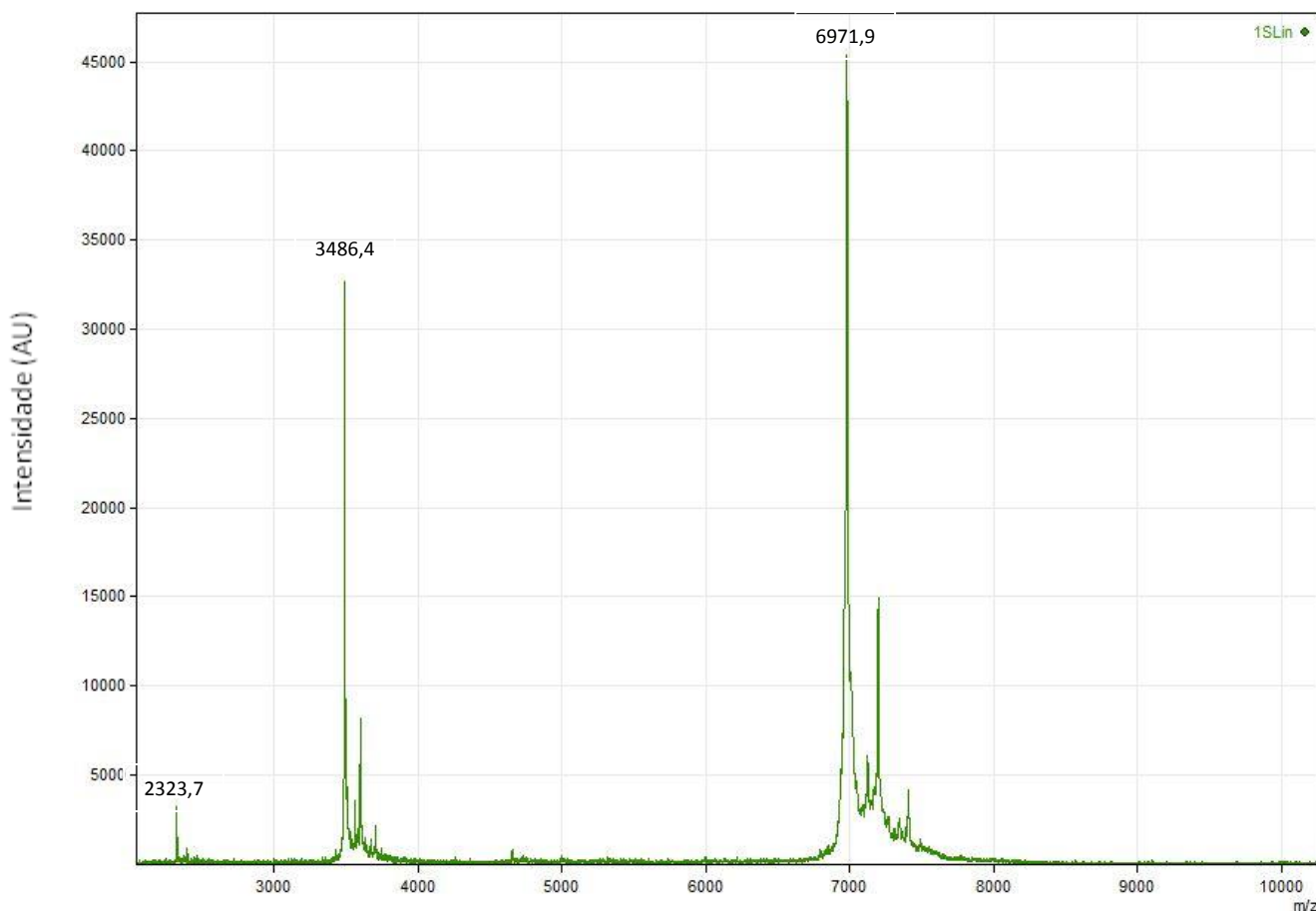


Figura 15. Espectro de massa molecular da Tpy11, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)*.

5.4.1 Sequenciamento *de novo* da Tpy11

A sequência parcial da Tpy11 foi determinada por espectrometria de massa (MS/MS), a sequência parcial da nova toxina Tpy11, de 36 resíduos de aminoácidos foi:

AGYCGSECSI/LVKGKDG YCAWPACYCYSMPN WAKTWS

As ambiguidades de alguns resíduos de aminoácidos como I/L foram resolvidas depois de alinhar a Tpy11 com outras NaScTxns já descritas e foi escolhido o resíduo de aminoácido que se conservava entre elas.

Essa sequência apresentou identidade com β NaScTxns já descritas: 90% de identidade com a To11 ($9e^{-17}$) e 80% com a Tc48b/Tc49a ($6e^{-14}$), ambas de *T. obscurus*, (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) 75% com a Tc11 ($5e^{-17}$) de *T. clathratus* (Borges *et al.*, 2010), 69% com a TsVII ($1e^{-15}$) de *T. serrulatus* (Martin-Eauclaire *et al.*, 1992) e 80% com a Tz1 ($2e^{-15}$) de *T. zulianus* (Borges *et al.*, 2004).

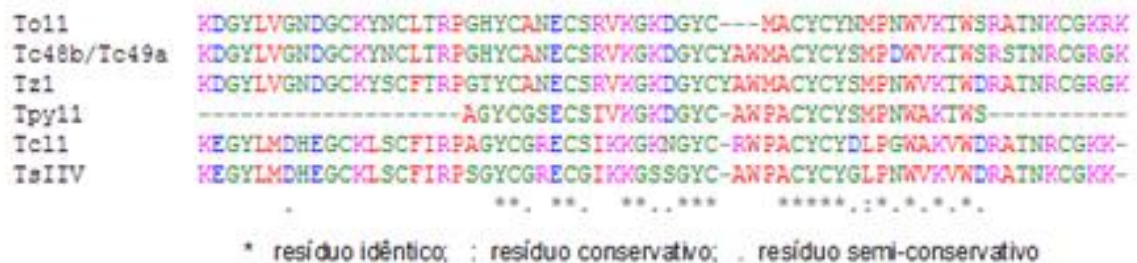


Figura 16. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy11 com as toxinas que apresentou maior porcentagem de identidade.

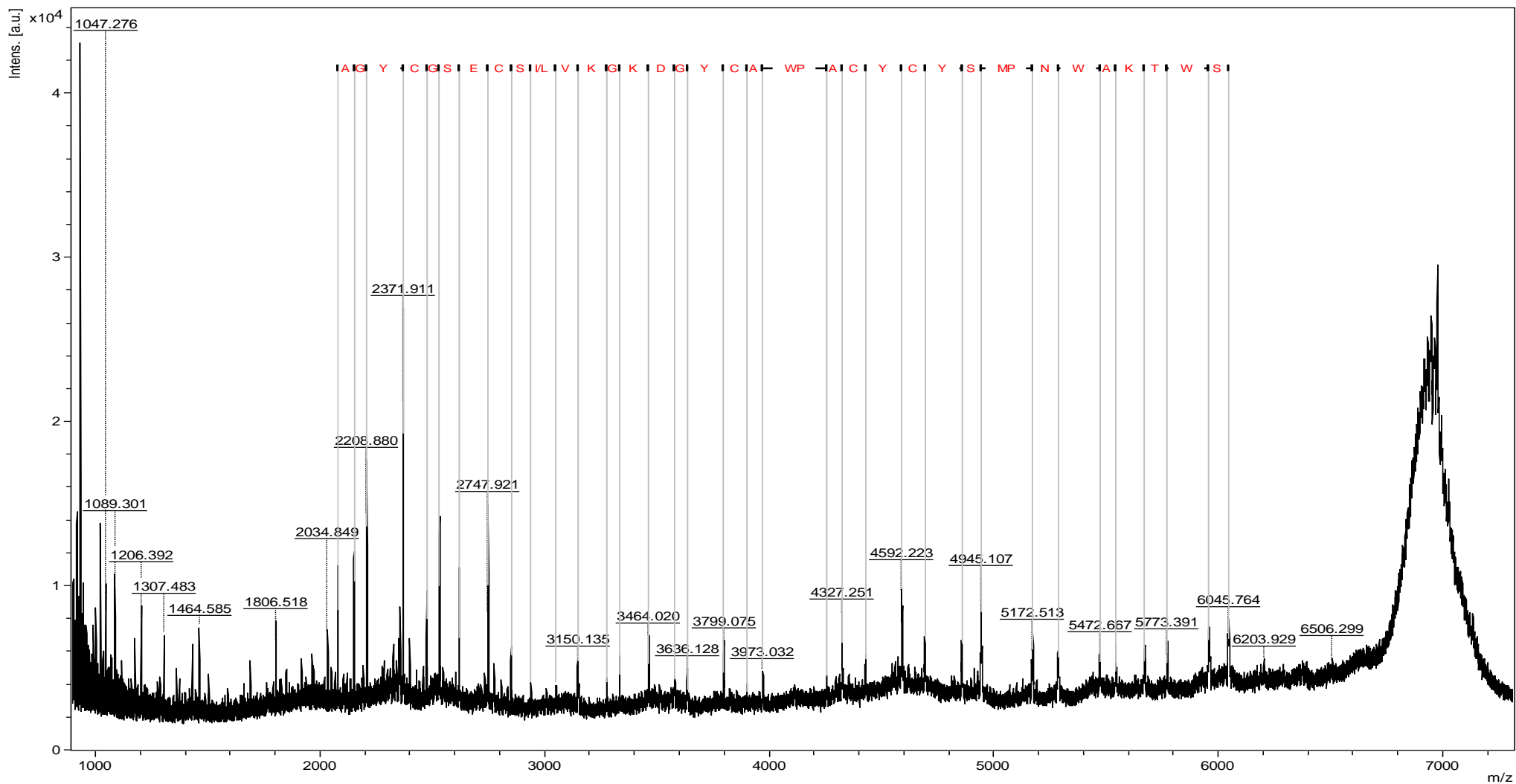


Figura 17. Sequência parcial de aminoácidos da Tpy11, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspenso em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay (ISD)* usando-se o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (*Bruker Daltonics, Alemanha*).

5.4.1.1 Análise eletrofisiológica da Tpy11

A Tpy11 (100nmol/L) apresentou um efeito similar às β NaScTx. A figura 18 mostra como a toxina altera a ativação dos canais para sódio reduzindo a amplitude da corrente. Considerando-se esses resultados e a porcentagem de similaridade estrutural da Tpy11 com β NaScTx, a Tpy11 é classificada como uma nova β NaScTx.

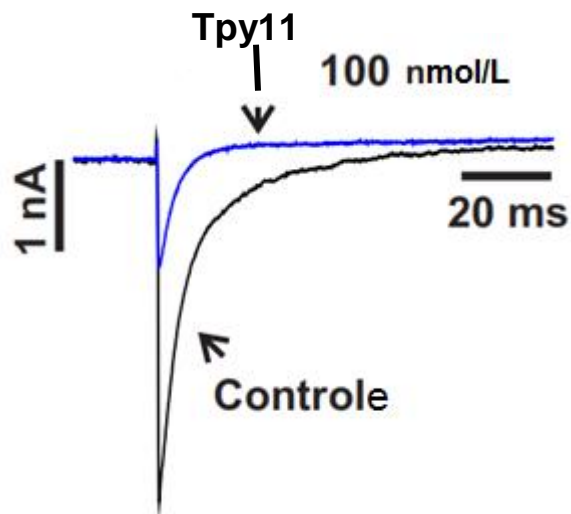


Figura 18. Efeito da toxina Tpy11 (100nmol/L) aplicando 1nA de corrente em 20ms sobre as correntes iônicas nos canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).

Na figura 19 são mostrados os efeitos eletrofisiológicos observados pelas toxinas Tpy10 e Tpy11 na concentração de 25nmol/L e 100nmol/L, sobre as correntes iônicas de canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG).

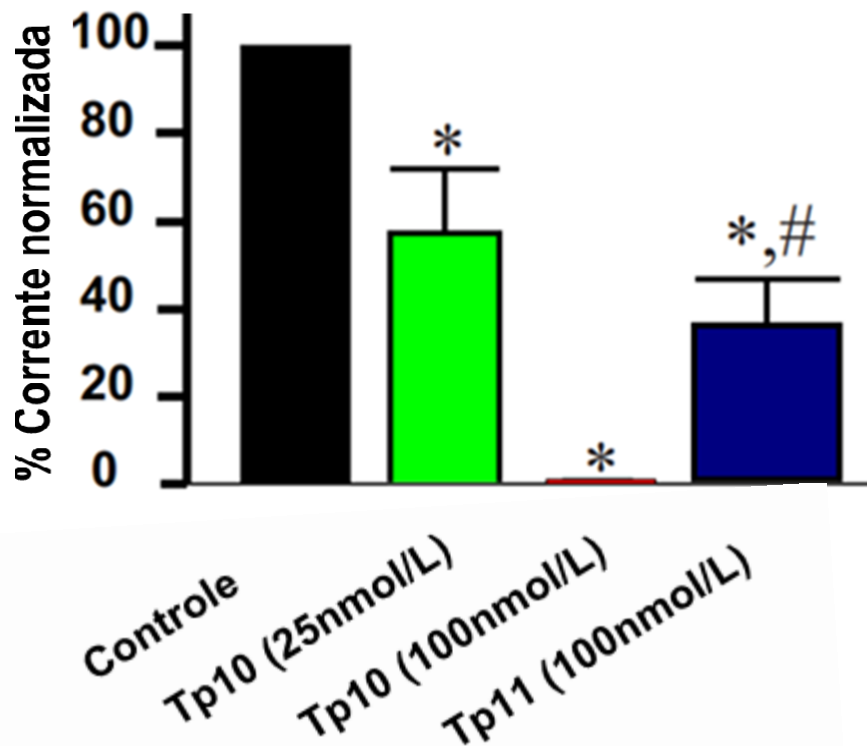


Figura 19. Resumo dos efeitos apresentados pelas toxinas Tpy10 e Tpy11 na concentração de 25nmol/L e 100nmol/L, sobre as correntes iônicas de canais para sódio de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de ratos (DRG). A * significa a diferença do efeito apresentado entre as toxinas e o controle, e o # significa a diferença do efeito apresentado entre a Tpy11 e a Tpy10 na mesma concentração 100nmol/L.

5.5 Fração 42

A Fração 42 foi submetida a uma etapa cromatográfica, empregando-se uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) e um gradiente linear de 20% a 45% do solvente B, em 65 minutos (figura 20).

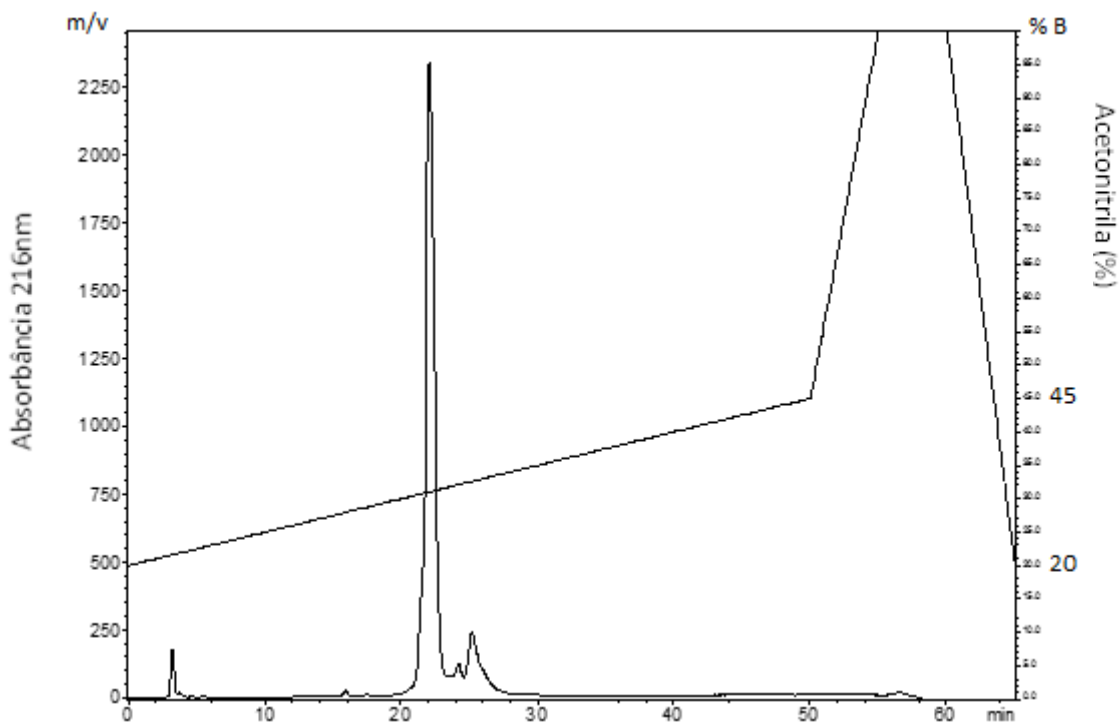


Figura 20. Perfil cromatográfico da fração 42. A fração 42 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A massa molecular e a pureza da fração 42, denominada Tpy12 neste trabalho, foram conferidas por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, e observam-se três valores de massa, onde 2321,7 Da é a tripla carga, 3484,6Da é a carga dupla e 6970,7 Da carga única (Figura 21).

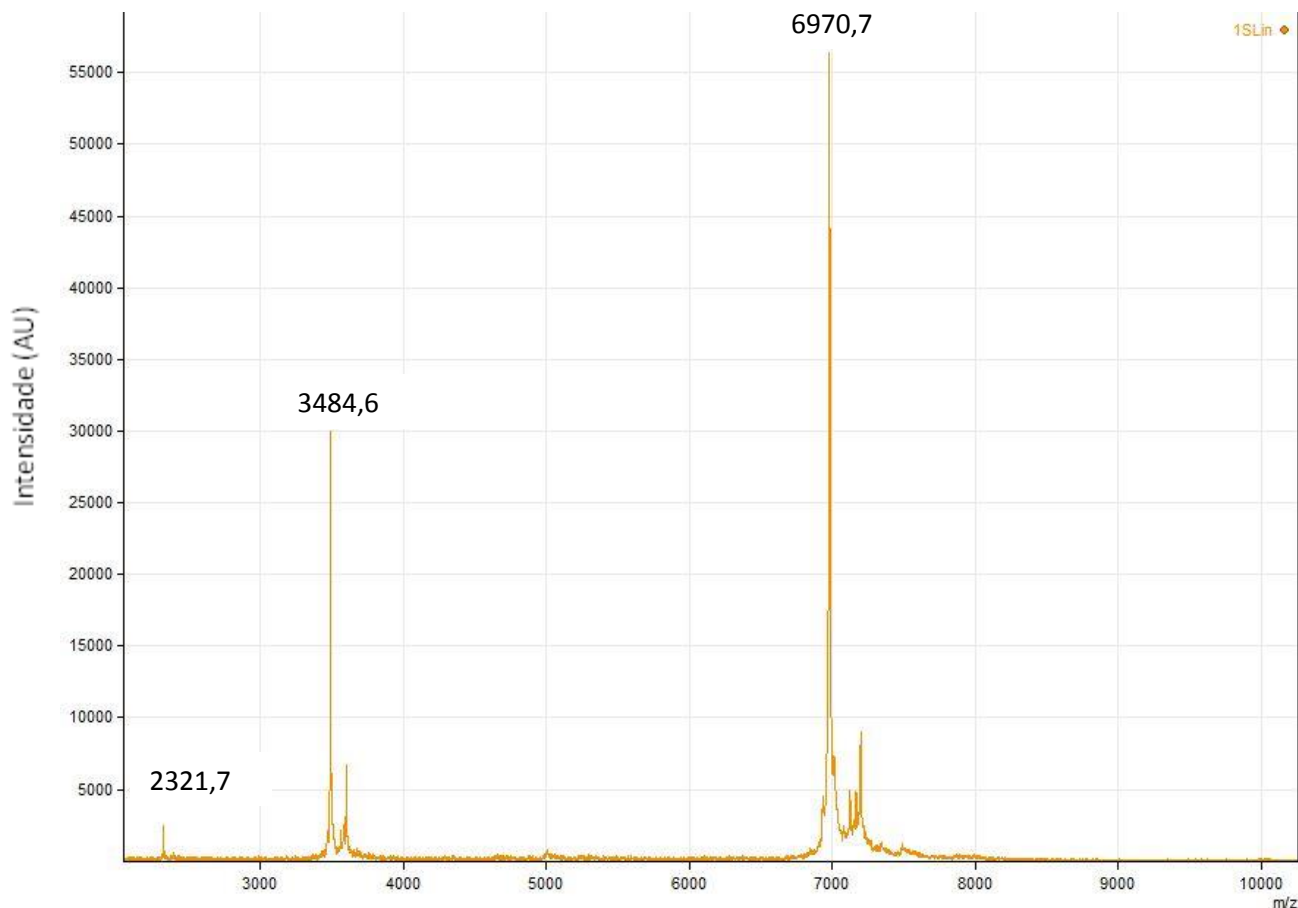


Figura 21. Espectro de massa molecular da Tpy12, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).*

5.5.1 Sequenciamento *de novo* da Tpy12

Após do sequenciamento por espectrometria de massa (MS/MS) da Tpy12 obteve-se a sequência parcial de 42 resíduos de aminoácidos:

GCKVGCFFGSNSWCNDKCKSKTAAKGYCAWPSCYCYGFTDD

Essa sequência possui identidade estrutural da cadeia de aminoácidos com β NaScTxS assim: 98% com a Tpa7 ($2e^{-26}$) de *T. pachyurus* e 83% com a To15 ($2e^{-22}$) de *T. obscurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), 83% com a TdNa6 ($1e^{-21}$) de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009) e 80% com a Tz2 ($1e^{-20}$) de *T. zulianus* (Borges, *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que a Tpy12 seja possivelmente uma toxina de tipo beta.

```

TdNa6  KEGYLLDRSNGCKRSCFFGSTISWCNTECKSKSADKGYCAWPSCYCYGFTDDSKMWHLKINKC
Tz2    KEGYLLDKSNGCKRSCFFGSTISWCNTECKSKSAEKGYCAWPSCYCYGFSDDSKMWDLKINKC
Tpy12  -----GCKVGCFFGSNSWCNDKCKSKTAAKGYCAWPSCYCYGFTDD-----
Tpa7   KEGYPLDTLNGCKVGCFFGINSWCNDKCKSKTAAKGYCAWPSCYCYGFTDDSKIWDLKINKC
To15   KEGYPLDS-SGCKAGCFFGINSWCNTECKRKSAAKGYCAWPSCYCYEFTDDSKIWNAKINKC
          ***  _*****:*****  :**  *-*  *****  *:-**

```

* resíduo idêntico; : resíduo conservativo; . resíduo semi-conservativo

Figura 22. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy12 com as toxinas que apresentou maior porcentagem de identidade.

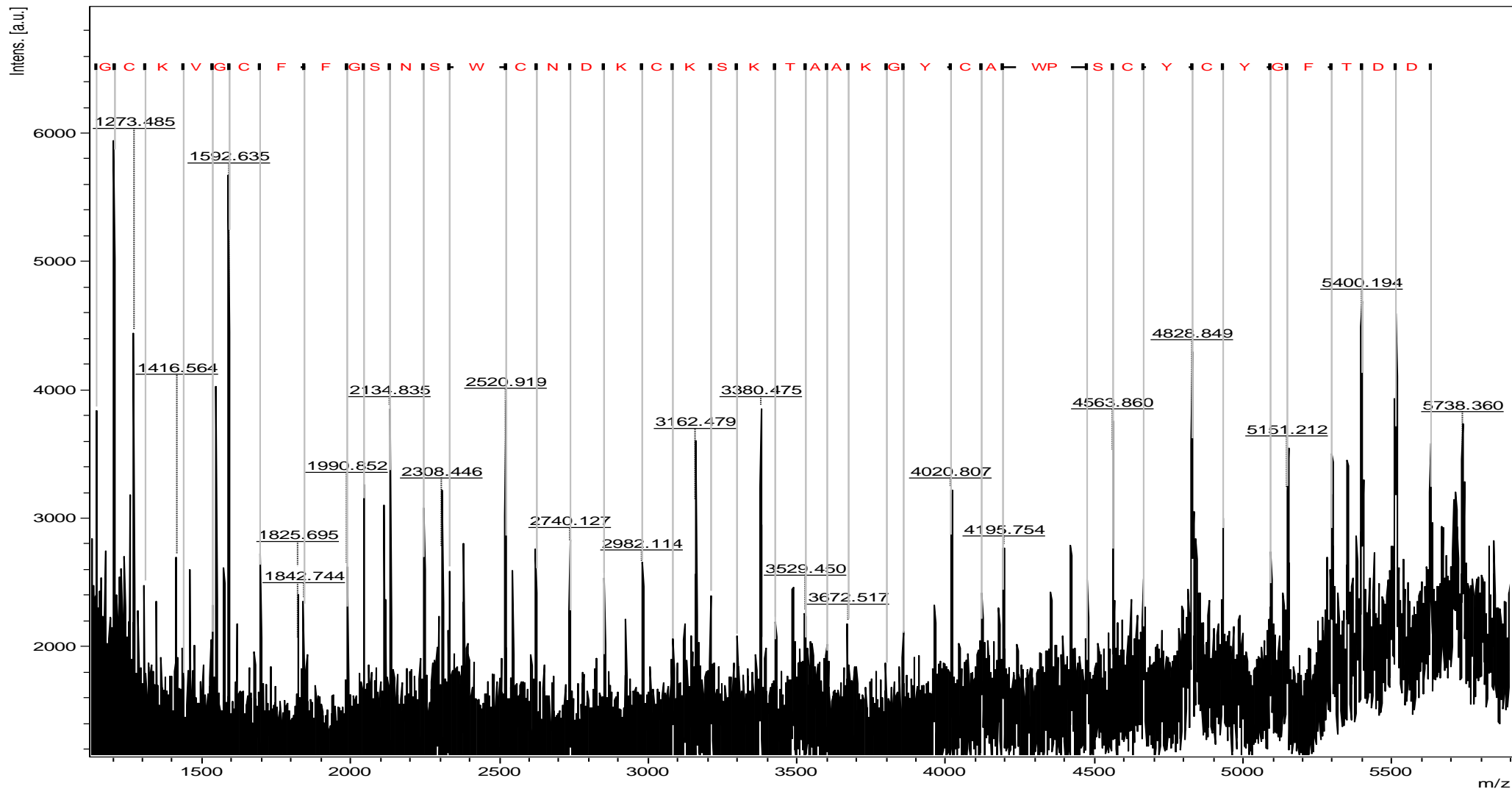


Figura 23. Sequência parcial de aminoácidos da Tpy12, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspensionado em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay* (ISD) usando-se o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics, Alemanha).

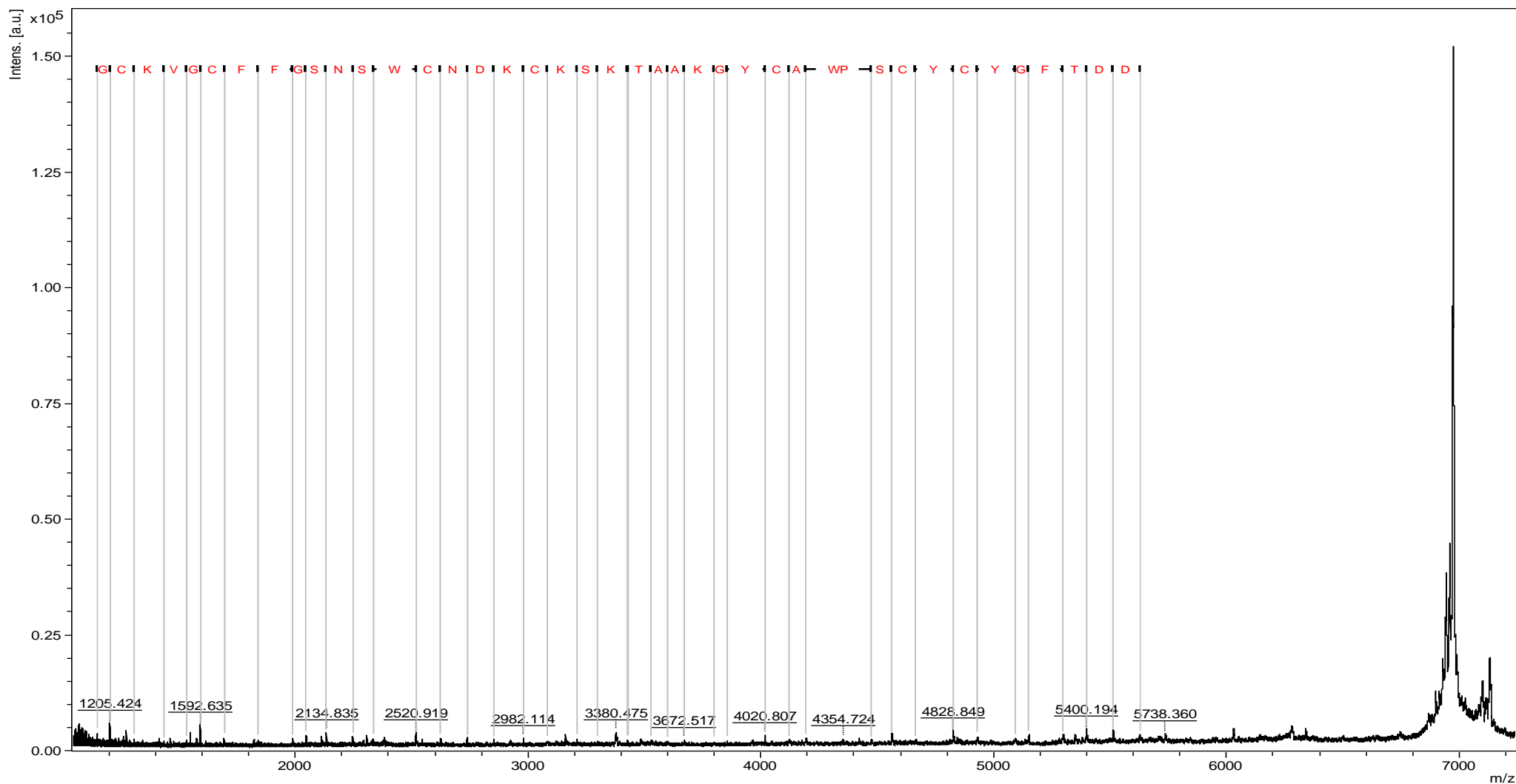


Figura 23. Sequência parcial de aminoácidos da Tpy12, obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. O peptídeo foi ressuspenso em água Milli-Q e diluído na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de MALDI-TOF e secadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay (ISD)* usando-se o programa *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics Alemanha).

```

Tpy12  --GCKVGCFFGSNSWCNDKCKSK-TAAKGYC-AWPSCYCYGFTDD-----
Tpy11  --AGYCGSE-----SIV-KGK-----DGYC-AWPACYCYSMPNWAKTWS
Tpy10  NNYCKIYCP-NTK-VCKETCKNRASAPDGECDGW-----
          .::  *  *::  .:  *  *  .
* resíduo idêntico: : resíduo conservado: . resíduo semi-conservado

```

Figura 24. Alinhamento múltiplo das sequências parciais das NaScTxS identificadas na peçonha do escorpião *Tityus* sp.

5.6 FRAÇÃO 43

A Fração 43 foi submetida a uma etapa cromatográfica, empregando-se uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) e um gradiente linear de 20% a 45% do solvente B, em 65 minutos. (figura 25).

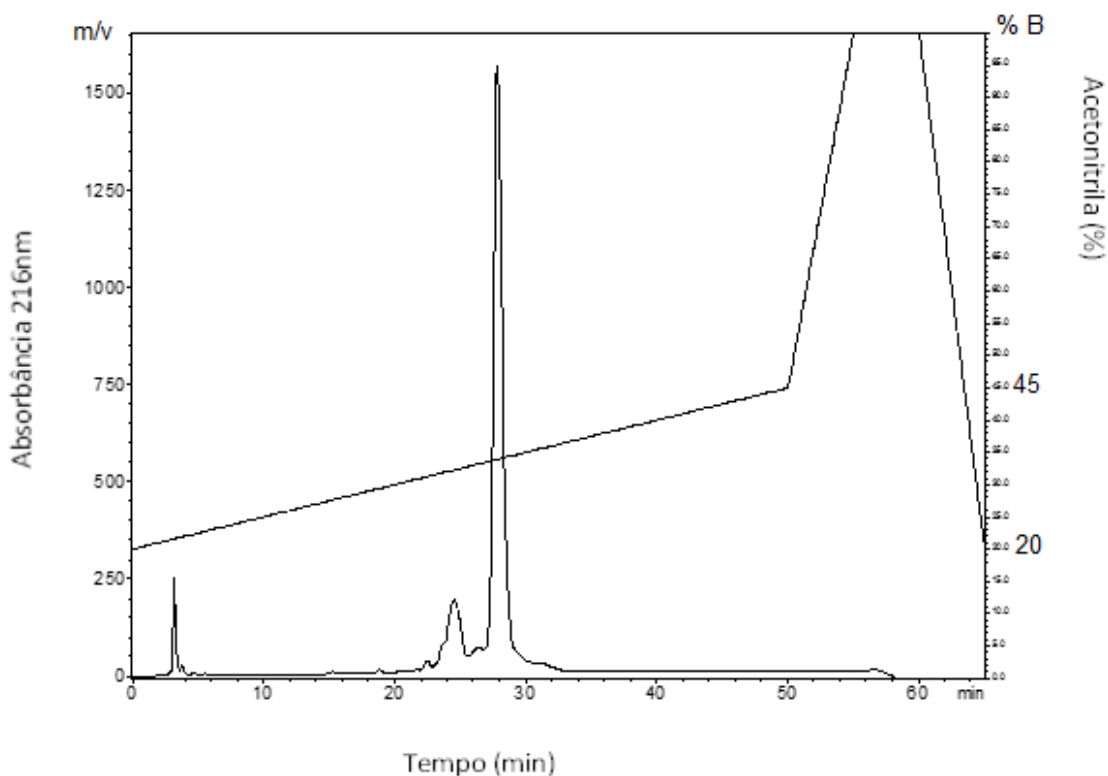


Figura 25. Perfil cromatográfico da fração 43. A fração 43 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A massa molecular e a pureza da fração 43 foram conferidas por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF* em modo linear, e observam-se dois valores de massa, onde 5451,8 Da foi da carga dupla e 10903,9 Da da carga única (Figura 26).

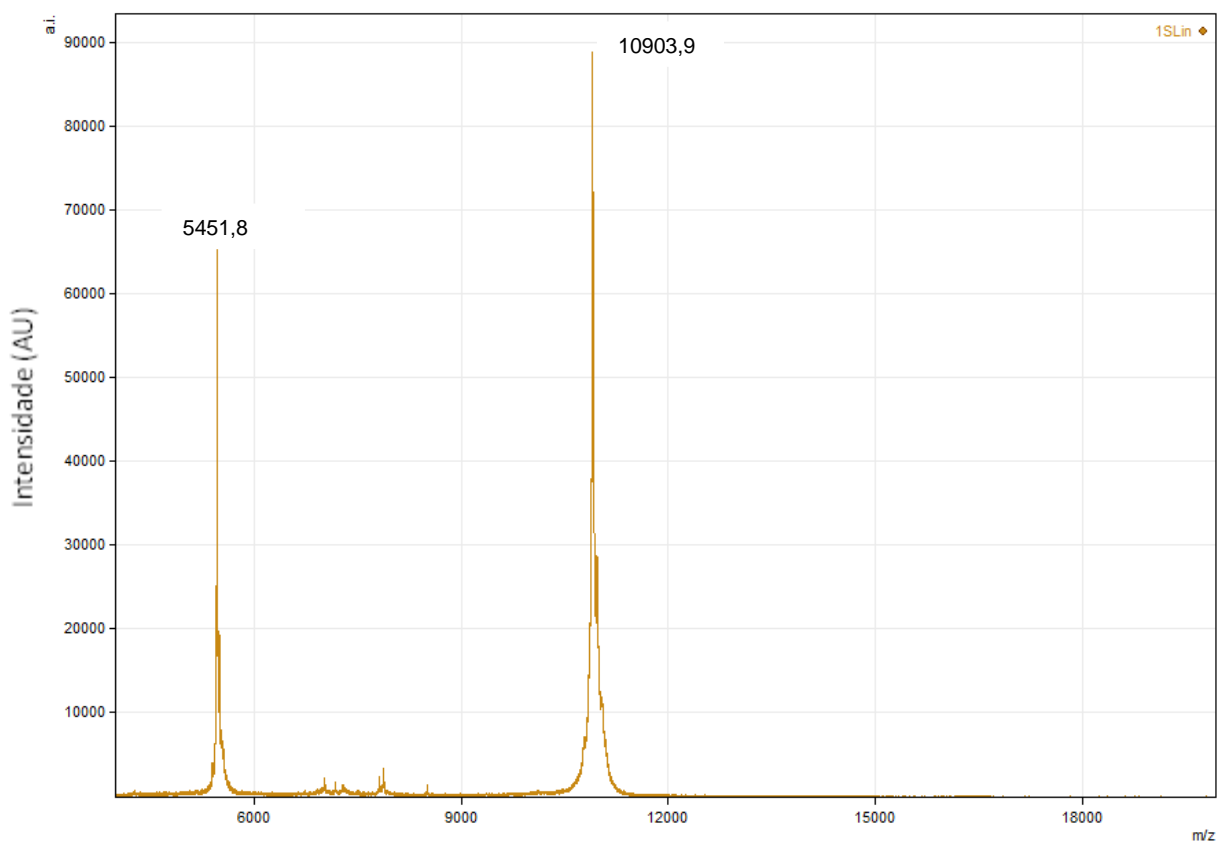


Figura 26. Espectro de massa molecular da fração 43, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA)*.

5.7 FRAÇÃO 44

A Fração 44 foi submetida a uma etapa cromatográfica, empregando-se uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA) e um gradiente linear de 20% a 45% do solvente B, em 65 minutos. (figura 27).

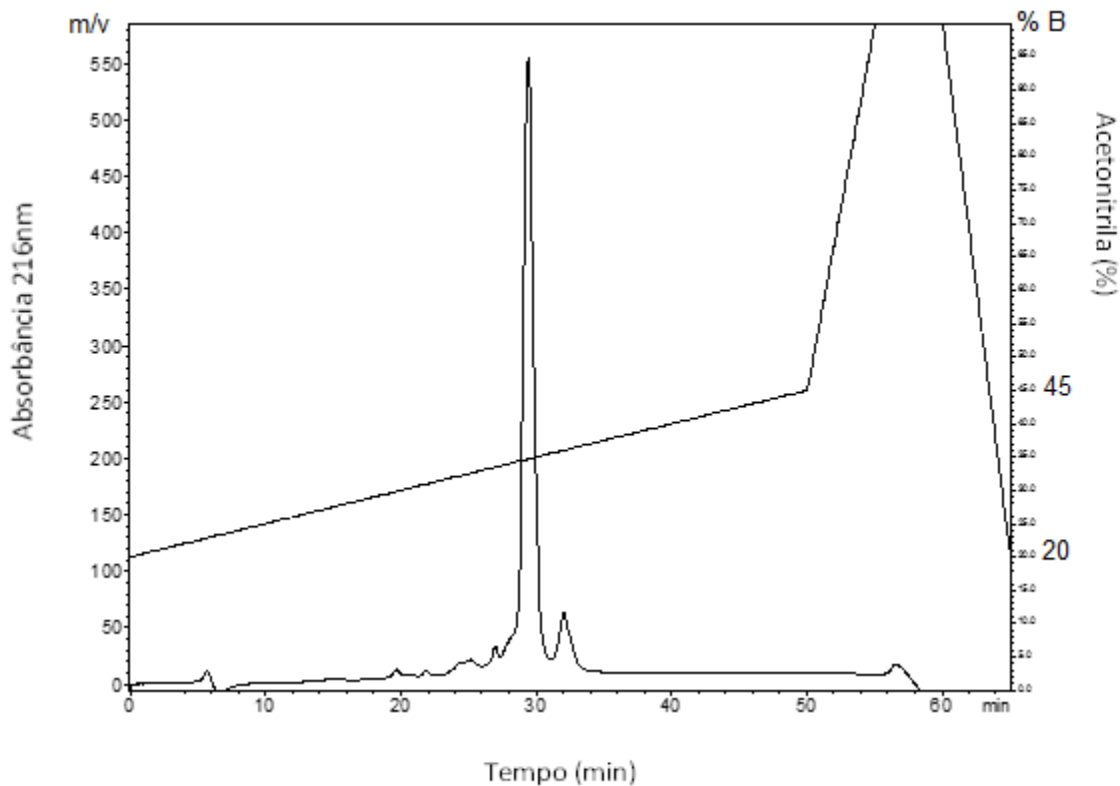


Figura 27. Perfil cromatográfico da fração 44. A fração 44 foi recromatografada por HPLC em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Phenomenex, EUA), em gradiente linear de 20% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A massa molecular e a pureza da fração 44 foram conferidas por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF* em modo linear, e observam-se dois valores de massa, onde 5412,0 Da foi da carga dupla e 10840,3 Da da carga única (Figura 28).

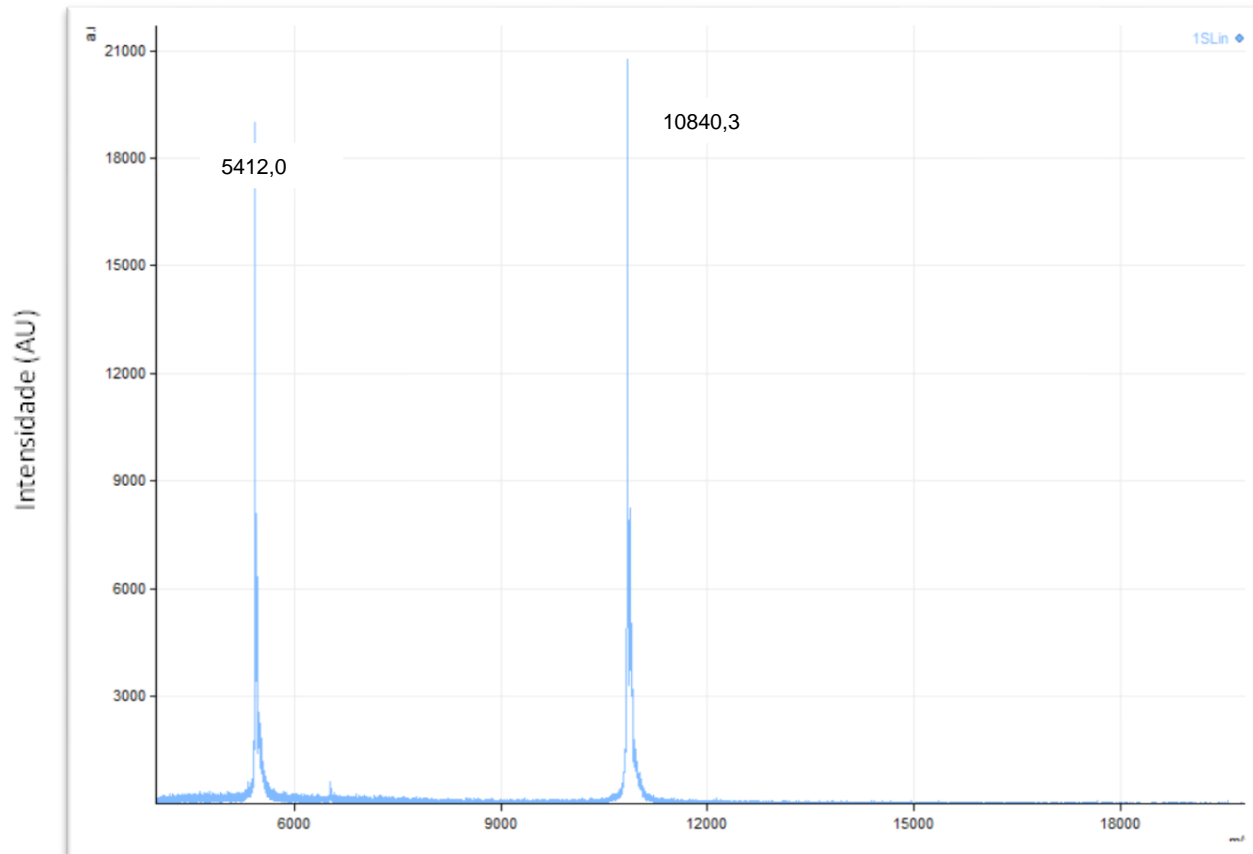


Figura 28. Espectro de massa molecular da fração 44, obtido em MALDI-TOF. A fração recromatografada foi reconstituída em água Milli-Q e diluída na matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção de 3:1 (matriz:amostra). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modos refletivo e linear usando solução calibrante PeptideCalibStandard. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *software FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

Depois de conhecer a massa molecular das frações 43 (10903,864 Da) e 44 (10840,331 Da) e ver que os valores superam os valores normais (6000-8000 Da) reportados para os peptídeos moduladores de canais para sódio (Catterall *et al.*, 2005), não foram usadas neste trabalho.

6. DISCUSSÃO

O fracionamento da peçonha bruta do escorpião *Tityus* sp. resultou na eluição de 54 frações. A análise por espectrometria de massa resultou na detecção de três peptídeos presentes na peçonha de *Tityus* sp que possuem massa molecular entre 6000-8000 Da. É conhecido que, nas peçonhas de escorpiões, principalmente butídeos, esses peptídeos correspondem aos que atuam em canais para sódio dependentes de voltagem (Pimenta *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2004; Diego García *et al.*, 2005; Barona *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2006), tais toxinas possuem cadeia longa, entre 58-76 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto e são chamadas de α NaScTx e β NaScTx (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005). Estes peptídeos podem ser divididos em subgrupos segundo sua afinidade a canais para sódio de mamíferos ou insetos (Cohen *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2007; Catterall *et al.*, 2007; Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011; Gurevitz, 2012).

As novas NaScTx putativas identificadas neste estudo e encontradas na peçonha do escorpião *Tityus* sp. apresentam similaridade na sequência de aminoácidos com outras NaScTx previamente descritas.

Uma das três novas NaScTx identificadas, a Tpy10, foi classificada como β NaScTx conforme o efeito observado nas correntes de sódio na avaliação eletrofisiológica sobre gânglios da raiz dorsal de rato (DRG). Esta toxina diminuiu a amplitude da corrente nos canais para sódio. Parece que a toxina Tpy10 provoca mudanças na conformação necessária para a ativação rápida do canal, possivelmente ao se ligar com o sítio quatro da subunidade alfa do canal (Cestèle *et al.*, 1998, 2006).

A Tpy10 apresentou identidade estrutural na sequência de resíduos de aminoácidos com toxinas putativas como a Tpa5 e Tpa6 de *Tityus pachyurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) e com a TdNa9 e TdNa10 de *Tityus discrepans*

(D'Suze *et al.*, 2009). As sequências de resíduos de aminoácidos desses peptídeos estão relacionadas com α NaScTx, segundo Guerrero-Vargas *et al.*, 2012, por apresentarem alta similaridade nas suas características estruturais, e compartilharem as mesmas superfícies ativas, propriamente no "NC-domain"; embora elas não tenham sido testadas eletrofisiologicamente por Guerrero-Vargas *et al.* (2012) por tanto não foi possível afirmar que apresentaram efeito de α -toxinas.

Na análise filogenética feita por Guerrero-Vargas *et al.* (2012), as toxinas Tpa5, Tpa6, TdNa9, TdNa10 e To6, To7 (as duas últimas de *T. obscurus*) agrupam-se na subfamília NaTx7, ao qual pertencem toxinas isoladas de escorpiões que habitam a região norte da América do Sul. A Tpy10 ao ter identidade nas características estruturais da sequência parcial de aminoácidos com a Tpa5, Tpa6, TdNa9, TdNa10, To6 e To7, sugere que estaria agrupada nesta mesma classificação filogenética.

A sequência parcial da Tpy10 apresentou resíduos de aminoácidos conservados no farmacóforo (Tirosina na posição 7, Lisina 15, Aspartato 37, Glicina 38, Triptófano 43), ao ser comparada às β -toxinas β -like já descritas (Borges *et al.*, 2004). Tal similaridade estrutural sugere que a Tpy10 apresenta importantes características estruturais conservadas ao ser comparadas com outras β -toxinas.

A figura 29 mostra um alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpy10 com β NaScTxs β -like, mostrando os resíduos de aminoácidos que se conservam entre elas.

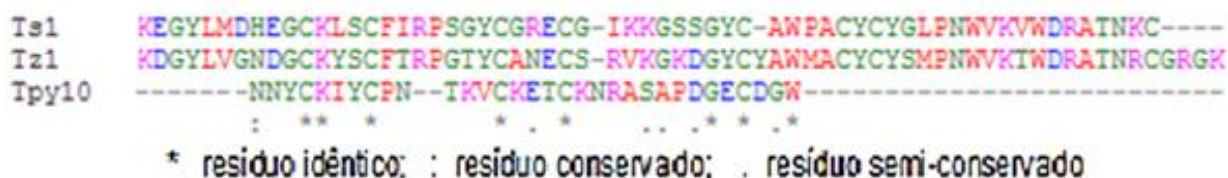


Figura 29. Alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpy10 com β NaScTxs.

A nova toxina descoberta, a Tpy11 foi classificada como uma β NaScTx, ao reduzir a corrente de sódio nos DRG, efeito típico das β NaScTx. Estudos de estrutura e função têm proposto que as β NaScTx têm duas superfícies ativas, a primeira é o farmacóforo, que está estritamente associado à α -hélice do peptídeo é a região C-terminal, e a segunda, o *loop* conector da estrutura secundária do peptídeo (Gurevitz *et al.*, 2001; 2007; Cohen *et al.*, 2005). O efeito apresentado pela Tpy11 sugere que esses resíduos de aminoácidos que estão localizados nas superfícies ativas da β NaScTx, cumprem um papel importante na determinação da afinidade e eficácia da toxina, parece que os resíduos de aminoácidos localizados nestas posições significativamente alteram o efeito dela.

Já foi citado em artigos prévios (Cestèle *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2004; Gurevitz *et al.*, 2007) que as β NaScTx identificam resíduos de aminoácidos carregados positivamente e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos nos canais para sódio como importantes resíduos para a ligação da toxina no canal e para a sua função.

É possível observar que a toxina Tpy11 apresenta um farmacóforo em comum com outras β NaScTx descritas como a Tpa2 de *T. pachyurus*, Ts1, Ts2, Ts3, Ts5, Ts6, Ts7 de *T. serrutalus* (Martin-Eauclaire *et al.*, 1992), Tcl1, Tcl2 de *T. clathratus* (Borges *et al.*, 2012), Tst1 e Tst2 de *T. stigmurus*, Tb1 e Tb2 de *T. bahiensis*, Na1, Na2, Na3, Na4, Na5 e Na7 de *T. costatus*, Td1, Td2, Td3, Td4, Td5, Td6, Td7, Td8 e Td9 de *T. discrepans*, Tz1 e Tz2 de *T. zulianus* (Borges *et al.*, 2004), Tc48a, To11, Tc48b/Tc49a de *T. obscurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), Tf4 de *T. fasciolatus* com resíduos de aminoácidos como a tirosina localizada na posição 24, 40 e 47, glutamato 28, lisina 35, glicina 36 e 39, alanina 45 e 55, triptofano 58, altamente conservados, os quais são específicos das β NaScTx anti-mamífero e β -like (Gurevitz *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2012), indicando assim que estes resíduos de aminoácidos são cruciais para a determinação da toxina como uma β NaScTx (Cestèle *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2004; Gurevitz *et al.*, 2007).

A presença desses resíduos de aminoácidos na toxina Tpy11 de *Tityus* sp. sugere que ela pode ser classificada segundo sua afinidade a canais para sódio como uma β NaScTx β -like.

Seguindo a classificação proposta por Guerrero-Vargas *et al.* (2012) por semelhança estrutural e reforçado pelo efeito causado em canais para sódio estaria agrupada na subfamília NaTx14 na classificação filogenética, na qual são agrupadas toxinas de escorpiões que abitam a região norte da Amazônia, como a Tc48b/Tc49a e To11 de *T. obscurus*, a Bactridin-2 uma β NaScTx de *T. discrepans* toxica em mamíferos, segundo D'Suze *et al.* (2009), a Td4, Td5, Td7, Td8, Td9 de *T. discrepans*, a Tz1 de *T. zulianus*, classificada eletrofisiologicamente como β NaScTx segundo Borges *et al.* (2004).

Nas figuras 30 e 31, observa-se o alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpy11 com β NaScTx anti-mamífero e β -like, mostrando os resíduos de aminoácidos que se conservam entre elas.

```

Tpy11 -----AGYCGSECSIV--KGKDGycAWPACyCYSMPNwAKTWS-----
Cn2    KEGLYVDKNTGCKYECLKLGDNdyCLRECKQqYGKGAGGYCYAFACwCTHLYEQaIVWPLPNKRC-
Cn3    KEGLYVELGTGCKYECFKLGDNDyCLRECKARyGKGAGGYCYAFGCwCTQLYEQaVVWPLKNKRCR
Css2   KEGLYVSKSTGCKYECLKLGDNdyCLRECKQqYGKSSGGYCYAFACwCTHLYEQaVVWPLPNKRCN
Css4   KEGLYVNSyTGCKFEcFKLGDNDyCLRECRQqYGKSGGYCYAFGCwCTHLYEQaVVWPLPNKRCN
Tcl1   KE-GYLMDHEGCKLSCFI-RPAGyCGRECSIK--KGKNGyCAWPACyCYDLPGwAKVWDRATNRC-
Tcl2   KE-GYLMDREGCKLSCFI-RPSGyCGRECEIK--KGSSGyCAWLACyCYGLPDRVKVWSyATNtC-
Ts1    KE-GYLMDHEGCKLSCFI-RPSGyCGRECGIK--KGSSGyCAWPACyCYGLPNwVKVWDRATNKC-
          **  **      *  ***  .:*  :  .  .*
```

* resíduo idêntico; : resíduo conservado; . resíduo semi-conservado

Figura 30. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy11 com β NaScTxs mostrando os resíduos de aminoácidos mais conservados entre elas.

```

Tpy11 -----AGYCGSECSIVKGDGYC-AWPACYCYMNPWAKTWS-----
Ts1      KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKSSGYC-AWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC----
Tz1      KDGYLVGNDGCKYSCFTRPGTYCANECRSRVKGDGYCYAWMA-----
Td1      KDGYLMEPNGCKRGLTRPARYCPNECSRKLGKGDGYCYLWLACYCYNMPESAPVWERATNRCGKGGK
Td2      KEGYLMGADGCKRSCCLTRPGHYCANECRSRVKGTIDGYCYAWLACYCYNMPNWKVWDRATNTCGRGGK
Td8      KDGYLVGDDGCKMHCFTTRPGHYCASECSRVKGDGYCYAWLACYCYNMPNWPAPIWNSATNRCRGRK
Tpa2     KEGYLVGNDGCKYSCFTRPAQYCVHECELRKGTIDGYCYAWLACYCYNMPDHRVTRWSRATNRCGS--
          . **  **  ** , , * * * * *

```

* resíduo idêntico; : resíduo conservado; . resíduo semi-conservado

Figura 31. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy11 com β NaScTx mostrando os resíduos de aminoácidos mais conservados entre elas.

A toxina Tpy12 foi classificada como β NaScTx por apresentar similaridade estrutural da sua sequência parcial de aminoácidos com toxinas testadas eletrofisiologicamente como a Tpa7 de *T. pachyurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), TdNa6 de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009) e a Tz2 de *T. zulianus* (Borges, *et al.*, 2006). Com base no alinhamento da figura 32, encontraram-se domínios altamente conservados como: glicina 11, 36, 47, lisina 13, 27, 29, 31, 35, fenilalanina 17,18, 48, serina 30, 43, asparagina 25, triptofano 23, 41, aspartato 26, 50, 51, treonina 32, 49, alanina 33, 34, 40, prolina 42 e tirosina 44, 46, 87; indicando, como é citado por Zhang *et al.* (2011) e Gurevitz *et al.* (2007), que as interações desses resíduos de aminoácidos são decisivas para classificação das β NaScTx.

```

Tpy12 -----GCKVGCFFGSNSWCNDKCKSKTAAKGYC-AWPSCYCYGFTDD-----
TdNa     KEGYLME-ANGCKRSCCLTRPGHYCANECYVVKGNKGYCYAWVACYCYNMPDSVKIWDSATNTCGRT
Tpa7     KEGYPLDTLNGCKVGCFFGTNSWCNDKCKSKTAAKGYC-AWPSCYCYGFTDDSKIWDLKKNK----
Tz2      KEGYLLDKSNGCKRSCFFGSTSWCNTECKSKSAEKGYC-AWPSCYCYGFSDDSKMMDLKTNK----
          *** . * : : * : * . . : * * * * * : * *

```

* resíduo idêntico; : resíduo conservado; . resíduo semi-conservado

Figura 32. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpy12 com β NaScTx mostrando os resíduos de aminoácidos mais conservados entre elas.

A toxina Tpy12, por apresentar uma similaridade estrutural na sequência de aminoácidos com a Tpa7 de *T. pachyurus*, sugere seu agrupamento na classificação filogenética proposta por Guerrero-Vargas *et al.* (2012) junto com as toxinas To15 de *T. obscurus*, TdNa6 de *T. discrepans* e Tz2 de *T. zulianus* pertencentes à subfamília NaTx1, onde são agrupadas algumas das toxinas de escorpiões que abitam a região norte da Amazônia, sendo a Tpa7 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) e a Tz2 (Borges *et al.*, 2006), testadas eletrofisiologicamente e apresentando um efeito de β NaScTx.

Na figura 24 observa-se o alinhamento múltiplo das sequências parciais das NaScTx identificadas até o momento na peçonha de *Tityus* sp. É possível verificar no alinhamento que se conservam alguns resíduos de aminoácidos entre elas (serina, lisina, glicina, tirosina, alanina, triptofano e prolina), os quais ao ser comparados com outras β NaScTx, demonstram que são resíduos de extrema importância para sua classificação.

As novas NaScTx identificadas neste estudo, apresentam similaridade na estrutura e função das suas sequências de resíduos de aminoácidos, conservando as superfícies ativas como o farmacóforo, com outras NaScTx previamente descritas. Segundo essa similaridade estrutural e o efeito causado nos canais para sódio, as toxinas Tpy10, Tpy11, Tpy12 são classificadas como β NaScTx *β -like*.

Autores como Cestèle *et al.* (1998, 2006) afirmam que as peçonhas de escorpiões do novo mundo são a maior fonte de β -ScTx, elas se ligam ao sítio quatro da subunidade alfa do canal para sódio, induzindo a redução na amplitude da corrente e levando a potenciais de membrana mais hiperpolarizados. Com este trabalho verifica-se que as três novas toxinas encontradas na peçonha do escorpião do Novo Mundo, *Tityus* sp pertencente ao grupo *forcipula* foram classificadas como β NaScTx, reafirmando o reportado por esses autores.

7. CONCLUSÕES

- Três novas NaScTx foram identificadas na peçonha do escorpião *Tityus* sp. pertencente ao grupo *forcipula* (Tpy10 com massa molecular de 7342 Da, Tpy11 com 6971 Da, e a Tpy12 com 6970 Da).

- Demonstra-se que a toxina Tpy10, é classificada como β NaScTx segundo sua avaliação eletrofisiológica, apesar da sua similaridade estrutural com α NaScTx já descritas, mas que não tinham sido ensaiadas em canais para sódio (Guerrero *et al.*, 2012).

- Os efeitos eletrofisiológicos confirmam a classificação da Tpy11 como uma β NaScTx que segundo a similaridade com outras β NaScTx anteriormente descritas teve atividade na modulação em canais para sódio de mamíferos.

- Sugere-se que a Tpy12 seja classificada como uma β NaScTx segundo a similaridade apresentada com outras β NaScTx já descritas.

8. BIBLIOGRAFIA

- BARONA, J.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V. 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica Programa de Ofidismo/Escorpionismo. Biomédica. 42-49.
- BARONA, J.; BATISTA, C.; ZAMUDIO, F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; WANKE, E.; OTERO, R.; POSSANI, L. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺ channels from the colombian scorpion *Tityus Pachyurus*. Biochimica Et Biophysica Acta. 1764, 76-84.
- BATISTA, C.; DEL POZO, L.; ZAMUDIO, F.; CONTRERAS, S.; BECERRIL, B.; WANKE, E.; POSSANI, L. 2004. Proteomics of the venom from the amazonian scorpion *Tityus cambridge* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in biomedical and life sciences 803 (1): 55-66.
- BRACKENBURY, W. ISOM, L. 2011. Na⁺ Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. Frontiers in Pharmacology; 2: 53.
- BORGES, A.; GARCÍA, C.; LUGO, E.; ALFONZO, M.; JOWERS, M.; OP DEN CAMP, H. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. Comparative Biochemistry and Physiology and Physiology. Toxicology and Pharmacology; 142(3-4):240-52.
- BORGES, A.; JOWERS, M.; BÓNOLI, S.; DE SOUSA, L. 2012. Scorpions from the primeval subgenus *Archaeotityus* produce putative homologs of *Tityus serrulatus* toxins active on voltage-gated sodium channels. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 18(4): 432-440.

- BOSMANS, F.; TYTGAT, J. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon* 49(2): 142-58.
- BOSMANS, F.; PUOPOLO, M.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.; BEAN, B.; SWARTZ, K. 2011. Functional properties and toxin pharmacology of a dorsal root ganglion sodium channel viewed through its voltage sensors. *The Journal of General Physiology*. 1-14.
- CATTERALL, W.; GOLDIN A.; WAXMAN, S. 2005. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*. 57:397-409.
- CATTERALL, W.; CESTÈLE, S.; YAROV-YAROVOY, V.; YU, F.; KONOKI, K; SCHEUER, T. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49(2) 124-41.
- CATTERALL, W. 2012. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of Physiology* 590.11, 2577-2589.
- CESTÈLE, S.; QU, Y.; ROGERS, J.; ROCHAT, H.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. 1998. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neurona* 21, 919-31.
- CESTÈLE, S.; YAROV-YAROVOY, V.; QU, Y.; SAMPIERI, F.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. 2006. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a β -scorpion toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 332–344.

- COLONGA, C.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.; SOARES, A. ARANTES. 2009. *Tityus serrulatus* Scorpion venom and toxins: an overview. Protein and peptide letters 16(8):920-32.
- COHEN, L.; KARBAT, I.; GILLES, N.; FROY, O.; CORZO, G.; ANGELOVICI, R.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. 2004. Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative "hot spot" common to all scorpion beta-toxins affecting Na⁺ channels. The Journal of Biological Chemistry. 279(9):8206-11.
- COHEN, L.; KARBAT, I.; GILLES, N.; ILAN, N.; BENVENISTE, M.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. 2005. 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 280(6):5045-53.
- COLOGNA, C.; PEIGNEUR, S.; RUSTIGUEL, J.; NONATO, M.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. 2012. Investigation of the relationship between structure and function of Ts2, a neurotoxina from *Tityus serrulatus* venom. The Journal of Federation of European Biochemical Societies FEBS 279(8):1495-1504.
- DEMEURE, K.; GABELICA, V.; DE PAUW, E. 2010. New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 21(11):1906-17.
- DIEGO-GARCÍA, E.; ABDEL-MONTTALEB, Y.; SCHWARTZ, E.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.; TYTGAT, J.; POSSANI, L. 2008. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. Cellular Molecular Life Sciences (65)187-200.

- D'SUZE, G.; SCHWARTZ, E.; GARCÍA-GÓMEZ, B.; SEVCIK, C.; POSSANI, L. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of scorpion *Tityus discrepans*. *Biochemistry* 91(8):1010-9.
- EITAN, M.; FOWLER, E.; HERRMANN, R.; DUVAL, A.; PELHATE, M.; ZLOTKIN, E. 1990. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure and mode the action. *Biochemistry*. 29, 5941-5947.
- FLÓREZ, E. 1990. Escorpiones de Colombia Catálogo de Especies. *Cespedesia* (57): 117-125.
- FLÓREZ, E. 2001. Escorpiones de la Familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. *Biota Colombiana*. 2(1): 25-30.
- FLÓREZ, E. 2007. Los escorpiones, enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. *Innovación y ciencia*. (4) 26-33.
- FULLER, M.; THOMPSON, C.; ZHANG, Z.; FREEMAN, C.; SCHAY, E.; SZAKÁCS, G.; BAKOS, E.; SARKADI, B.; MCMASTER, D.; FRENCH, R.; POHL, J.; KUBANEK, J.; MCCARTY, N. 2007. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *TheJournal of Biological Chemistry* 282 (52): 37545-55.
- GARCÍA, M.; GAO, Y.; MCMANUS, O.; KACZOROWSKI, G. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39, 739-748.
- GOLDIN, A., BARCHI, R.; CALDWELL, J.; HOFMANN, F.; HOWE, J.; HUNTER, J.; KALLEN, R.; MANDEL, G.; MEISLES, M.; NETTEL, Y.; NODA, M.;

- TAMKUN, M.; WAXMAN, S.; WOOD, J. E. CATERALL, W. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neurona* 28 (2): 365-8.
- GOLDIN, A. 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annual review of Physiology* 63: 871-94.
- GÓMEZ, J.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A.; VELÁSQUEZ, P. 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *Medunab*, 5(15) p. 159-65.
- GÓMEZ, J.; E OTERO, R. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública* 25 (1): 50-60.
- GÓMEZ, J.; QUINTANA, J.; ARBELÁEZ, P.; FERNÁNDEZ, J.; SILVA, J.; BARONA, J.; GUTIÉRREZ, J.; DÍAZ, A.; OTERO, R. 2010. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud* 30(1): 126-39.
- GORDON, D.; KARBAT, I.; ILAN, N.; COHEN, L.; KAHN, R.; GILLES, N.; DONG, K.; STÜHMER, W.; TYTGAT, J.; GUREVITZ, M. 2007. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon* 49(4): 452-72.
- GUERRERO, J., 2002. Aislamiento, Purificación y Evaluación de Neurotoxinas del escorpión *Centruroides margaritatus* (BUTHIDAE) del municipio de El Patía, Departamento del Cauca, Colombia. Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo. Universidad del Cauca – Colombia.

- GUERRERO, J. 2008. Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841). (M. Sc em Biologia Animal). Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de pós-graduação em Biologia Animal. 79.
- GUERRERO-VARGAS, J. 2012. Identificação e caracterização biológica de peptídeos isolados da peçonha do escorpião colombiano *Tityus pachyurus*, que atuam nos canais para Na⁺. (PhD em Biología Animal). Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de pós-graduação em Biologia Animal. 117.
- GUERRERO, J.; MOURÃO, C.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; POSSANI, L.; SCHWARTZ, E 2012. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus*. Novel putative Na⁺ Channel scorpion toxin. Plos One (7): 1-12.
- GUREVITZ, M.; GORDON, D.; BEM-NATAN, S.; TURKOV, M. FROY, O. 2001. Diversification of neurotoxins by C-tail “wiggling”: a scorpions recipe for survival. The FASEB journal 15(7):1201-5.
- GUREVITZ, M.; KARBAT, I.; COHEN, L.; ILLAN, N.; KAHN, R.; TURKOV, M.; STANKIEWICZ, M.; STYHMER, W.; DONG, K.; GORDON, D. 2007. The insecticidal potencial of scorpion beta-toxins. Toxicon 49(4):473-89.
- GUREVITZ, M. 2012. Mapping of scorpion toxin receptor sites at voltage-gated sodium channels. Toxicon. 15;60(4):502-11.
- GWEE, M.; NIRTHANAN, S.; ENGHOO, H.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; MANJUNATHAKINI, R.; CHEAH, L. 2002. Autonomic effects of some

scorpions venoms and toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. (29) 795-801.

IZQUIERDO, L., E RODRÍGUEZ, J. 2012. Cardiovascular dysfunction and pulmonary edema secondary to severe envenoming by *Tityus pachyurus* sting. Case report. *Toxicon* 60(4):603-6.

JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J.; GOUY, M.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends of Biochemistry* 23(10):403-5.

KALAPOTHAKIS, E.; JARDIM S.; MAGALHÃRES, C.; MENDES, T.; MARCO, L.; AFONSO, L., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. 2001. Screening of expression. Libraries using ELISA: Identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 39(5):679-85.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. E JESSELL T. 2000. Principles of neural science. 4th ed. McGraw-Hill.

KHATTABI, A.; SOULAYMANI-BENCHEIKH, R.; ACHOUR, S.; SALMI, L. 2011. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(7), 364-9.

MARTIN-EAUCLAIRE, M.; CÉARD, B.; RIBEIRO, A.; DINIZ, C.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *The Journal of Federation of European Biochemical Societies FEBS letters* 302(3):220-2.

- MORALES-DUQUE, H; CALDAS, L.; GUERRERO-VARGAS, J.; Biological activities of the venom from a Colombian new species of *Tityus* genus (Scorpiones Buthidae). Artigo em preparação para publicação.
- MOUHAT, S.; JOUIROU, B.; MOSBAH, A.; DE WAARD, M.; SABATIER, J. 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *The Journal of Biochemistry* 378,717-726.
- NASCIMENTO, D.; RATES B.; SANTOS, D.; VERANO-BRAGA, T.; BARBOSA-SILVA, A.; DUTRA, A.; BIONDI, I.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.; DE LIMA, M.; PIMENTA, A. 2006. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some Scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 47(6): 628-39.
- NELSON, D.; COX, M. 2005. Biological Membranes and Transport. 375-420, Biosignaling p, 421-479. Em: *Lehninger Principles of Biochemistry*.
- LORET, E.; SAMPIERI, F.; MIRANDA, F.; GRANIER, C.; ROCHAT, H. 1992. Scorpion toxins active on insects. *Methods Neuroscience*. 8.381-395.
- LORET, E.; HAMMOCK, B. 2001. Structure and neurotoxicity of venoms. In: Brownell, P.; Polis, G. Ed. *Scorpion Biology and Research*. Oxford. New York Oxford University Press. 204-233.
- MOTTA, J. E SEVCIK, C. 1999. Reseña del Tratamiento del Emponzoñamiento por Escorpiones del Género *Tityus* en Venezuela. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).12.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GRACÍA, B.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, I.; VAN DER WALT, J.; DYAON, K.; ULENS, C.; TYTGAT, J.; FELIX, R.; DARSZON, A.; POSSANI, L. 2002. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺

and Na⁺ channels. Biochemical and Biophysical Research Communication 299 (4): 562-568.

OTERO, R.; URIBE, F.; SIERRA, A. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. Actualizaciones Pediátricas. 8(3): 88-92.

OTERO, R.; NAVÍO, E.; CÉSPEDES, F.; NÚÑEZ, M.; LOZANO, L.; MOSCOSO, E.; MATAALLANA, C.; ARSUZA, N.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, D.; RODAS, J.; RODRÍGUEZ, J.; ZULETA, J.; GÓMEZ, J.; SALDARRIAGA, M.; QUINTANA, J.; NÚÑEZ, V.; CÁRDENAS, S.; BARONA, J.; VALDERRAMA, R.; PAZ, N.; DÍAZ, A.; RODRÍGUEZ, L.; MARTÍNEZ, M.; MATURANA, R.; BELTRÁN, L.; MESA, M.; PANIAGUA, J.; FLÓREZ, E.; LOURENÇO, R. 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: Clinical, epidemiological and therapeutic aspects. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 98(12) 742-750.

PEDRAZA, M.; POSSANI, L. 2013 Scorpions beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. Artigo em processo de publicação na revista Frontiers in Bioscience, PMID 23276943. (18): 572-587.

PIMENTA, M.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.; ROCHAT, H.; FIGUEIREDO, S.; KALAPOTHAKIS, E.; AFONSO, L.; DE LIMA, M. 2001. Purification, aminoacids sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). Toxicon 39(7): 1009-19.

PINEDA, D.; CASTELLANOS, J., 1998. Escorpionismo en Girardot Hospital San Rafael enero - junio de 1.994. Tribuna Médica. 98(1): 19-28.

- POSSANI, L.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.; BECERRIL, B. 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochemistry* 82(9-10): 861-8.
- RODRÍGUEZ, J. 2006. CIGITOX-BASE DE DATOS (Centro de información, manejo e investigación en Toxicología) Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- RODRÍGUEZ, J. 2008. Determinación del efecto clínico e histopatológico causado por el veneno del escorpión *Tityus Pachyurus* (Buthidae), en ratones cepa ICR. tesis de grado magister en toxicología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R; POSSANI, L. 2003. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *TRENDS in pharmacological sciences*. 24, 222-227.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.; POSSANI, L. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. (46): 831-844.
- STEVENS, M.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology*, 1-13
- TEIXEIRA, A.; FONTOURA, B.; FREIRE-MAIA, L.; MACHADO, C.; CAMARGOS, E.; TEIXEIRA, M. 2001. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*. (39): 703-9.
- THOMPSON, J.; GIBSON, T.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. 1998. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple

sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24): 4876-82.

THOMPSON, C.; OLIVETTI, P.; FULLER, M.; FREEMAN, C.; MCMASTER, D.; FRENCH, R.; KUBANEK, J.; MCCARTY, N. 2009. Isolation and characterization of high affinity peptide inhibitor of CIC-2 chloride channels. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 26051-62.

TYTGAT, J.; CHANDY, K.; GARCIA, M.; GUTMAN, G.; MARTIN-EAUCLAIRE, J.; VAN DER WALT, J. e POSSANI, L. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpions venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences*. (20): 444-447.

VALDIVIA, H. e POSSANI, L. 1998. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *Trends in Cardiovascular Medicine* 8(3):111-8.

VEGA, A. e FELIX, R. 2001. Fisiopatología de los canales iónicos sensibles a voltaje. *Avance y Perspectiva*. (20): 83-96.

WAGNER, S.; CASTRO, M.; BARBOSA, J.; FONTES, W.; SCHWARTZ, E.; SEBBGEN, A.; RODRIGUES, O.; SOUSA, M.; SCHWARTZ, C. 2003. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon* 41(7), 737-45.

XIAN-CHUM, Z.; SAN-XIA, W.; YAN, Z.; SHUN-YI, Z.; WEN-XIN, L. 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii*. *Peptides* (25): 143-150.

- YE, XIANG.; BOSMANS, F.; LI, CHONG.; ZHANG, Y.; WAND, D.; TYTGAT, J. 2005. Structural basis for the voltage-gated Na⁺ channel selectivity of the scorpion α -like toxin BmK M1. *Journal of Molecular Biology* 353, 788-803.
- ZHANG, J.; YAROV-YAROVYOY, V.; SCHEUER, T.; KARBAT, I.; COHEN, L.; GORDON, D.; GUREVITZ, M.; CATTERALL, W. 2011. Structure-function map of the receptor site for β -scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *Journal Biological of Chemistry* (38): 33641–33651.
- Zeng, X.; Coezo, G. e Hahin, R. 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology IUBMB* 57(1): 13-21.
- ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M.; WENXIN, L. 2006. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* 47(3): 348-55.
- ZHU, S.; GAO, B.; AUMELAS, A.; RODRÍGUEZ, M.; LANZ-MENDOZA, H.; PEIGNEUR, S.; DIEGO-GARCÍA, E.; MARTIN-EAAUCLAIRE, M.; TYTGAT, J.; POSSANI, L. 2010. MeuTXK β 1, scorpion venom-derived two domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 872-883.