



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal –
PPG BioAni
Departamento de Ciências Fisiológicas – CFS
Laboratório de Toxinologia - LTx



THALITA SOARES CAMARGOS

Prospecção da peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* sob a perspectiva proteômica e transcritômica, e caracterização biológica de peptídeos moduladores de canais de Na⁺

Brasília, 2014

THALITA SOARES CAMARGOS

Prospecção da peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* sob a perspectiva proteômica e transcritômica, e caracterização biológica de peptídeos moduladores de canais de Na⁺

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de doutor.

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

Brasília, outubro de 2014

Dedico este trabalho ao meu marido, Gustavo Guimarães, que sempre me deu o suporte necessário, amizade, lealdade, confiança, amor e respeito. Obrigada pela sua maturidade e apoio, ainda que isto significasse anos de abdicção, privações e desapegos, para que este doutorado fosse executado. Obrigada por ser a pessoa que sempre está ao meu lado.

À nossa primogênita, ainda no meu ventre, nossa querida Larissa.

À minha família.

Agradecimentos

Graças à colaboração de muitas pessoas esse projeto pode ser realizado. Agradeço profundamente a todos que de alguma forma participaram da elaboração, execução e discussões.

À Dr^a Elisabeth Schwartz, que sempre me deu suporte científico e desde muito cedo acreditou em mim. Sou grata por tudo que me ensinou. Sua paciência e fé em seus alunos é sua qualidade mais marcante. Não tenho palavras pra descrever o meu sincero agradecimento pela confiança e pela amizade. Meu profundo respeito pela pessoa, pesquisadora e professora.

Ao Dr Lourival Possani, chefe do laboratório da Universidade Autônoma do México, ícone da pesquisa em Toxinas de escorpiões, que sempre ofereceu uma sólida colaboração e coleguismo aos trabalhos realizados pela equipe do Laboratório Toxinologia da UnB.

Ao Dr Ernesto Ortiz, pesquisador da Universidade Autônoma do México, pelas suas marcantes contribuições na área de Biologia Molecular, durante sua visita ao Brasil. Obrigada pelo seu exemplo de humildade e caráter. O período de sua visita foi breve, mas os ensinamentos acadêmicos, teóricos e práticos, assim como seu bom exemplo como ser humano e pesquisador serão lembrados para sempre.

À Dr^a Rita Restano Cassulini, pesquisadora da Universidade Autônoma do México, pelos primeiros ensinamentos práticos sobre eletrofisiologia. Obrigada pelos primeiros testes realizados com a toxina Tf4, com canais de sódio dependentes de voltagem. Obrigada por ser sempre tão solícita e amável conosco.

Ao Dr Frank Bosmans, que aceitou me orientar durante 4 meses de Doutorado Sanduíche. Obrigada por todo o aprendizado e suporte para que este trabalho fosse realizado. Pesquisador dedicado, humilde e sempre disposto a ajudar. No curto tempo em que fiz parte desse grupo de pesquisa, me senti honrada de dividir a bancada com pesquisadores tão dedicados e apaixonados pelo que fazem. Definitivamente, agregou diferentes perspectivas à minha visão acadêmica. Agradeço aos colegas John Gilchrist, Doung Chu (Izzy), Belete Regassa e Lisa Mangus, por toda paciência e aprendizado. Um agradecimento especial à amiga Darshani Rupasinghe, que me fez sentir em casa quando cheguei à JHU, e teve a paciência para me ensinar a operar o TEVC. Foi maravilhoso participar desse grupo.

Ao Dr Carlos Bloch, do laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilidade de todo o aparato físico do laboratório, e de seus recursos humanos. À Dr^a Maura Prates que contribuiu com o sequenciamento de Edman e com importantes sugestões nas metodologias cromatográficas.

À Dr^a Márcia Mortari, do laboratório de Toxinologia, pelas críticas construtivas, pelas sugestões, pelos questionamentos e por todo carinho que você sempre me dedicou. Sua amabilidade é apenas um adorno perto da sua competência e dedicação ao trabalho. Obrigada pelo exemplo de profissional e ser humano.

Ao Dr Carlos Schwartz, por todo ensinamento acadêmico e pessoal. Aprendi que mais do que saber algo, é preciso ser. “Seja feliz!”: Isso foi uma ordem que estou tratando de obedecer.

À doutoranda Caroline Mourão, com quem pude discutir inúmeras metodologias, dividir anotações, trocar inúmeros conhecimentos, construir pensamentos e com quem cultivei uma amizade muito sincera. Sempre foi um imenso prazer dividir a bancada e os trabalhos com você. Obrigada por toda a colaboração com espectrometria de massa, manuscritos, biblioteca transcritômica, coletas, enfim, por todos os anos de parceria. Sem você, tudo teria sido infinitamente mais árduo e sem graça.

À doutoranda Solange Rego, colaboradora da parte de modelagem molecular e de muitas discussões produtivas sobre as toxinas de peçonhas de escorpiões. Meu sincero apreço pela amizade que me oferece e pela profissional que se tornou. Serei sempre admiradora de seus esforços e empenho na pesquisa.

Ao Dr Jimmy Guerrero Vargas, por toda colaboração durante a pós-graduação. Obrigada pelo exemplo de amor à pesquisa e às ciências. Obrigada pela amizade e pelas inúmeras discussões sobre toxinologia.

Ao doutorando Harry Morales, obrigada pelo seu ingresso em nosso grupo de pesquisa. Pelas coletas de campo, pelo aprendizado conjunto com as técnicas em Biologia Molecular, pelas cromatografias, extrações de RNA, pela atenção ao biotério, enfim, por toda colaboração durante esses anos. E não menos importante, por sua amizade sincera.

Aos colegas do Laboratório de Bioinformática, BioCel-UnB, sob supervisão do Dr Marcelo Brígido. Aos colegas João Victor de Araujo Oliveira, Rafael Costa e à Dr^a Tainá Raiol, pela montagem da biblioteca de sequências de RNA da glândula de peçonha de *Tityus fasciolatus*, pelas discussões e colaboração para que os dados fossem montados.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, UnB, Dr^a Ildinete e Dr^a Andréa Maranhão, pelas sugestões para a construção de bibliotecas de cDNA. Ao Dr Marciano Rubini, à Dr^a Calliandra Souza e ao Dr Daniel Agostinho que sempre estiveram prontos a nos ajudar.

Ao Dr Leandro Ambrósio, pelas coletas de campo e discussões durante os seminários do laboratório. Aos amigos e colegas de toxilogia que dividiram a bancada comigo e muito me ensinaram ao longo dos anos: Fagner Neves, Andréa Carvalho, Jéssica Macêdo, Claudia Jimena, Beatriz Sarmiento, Luciana Macedo, Priscilla Galante. À minhas queridas amigas que conquistei na toxilogia, Janaína Starling, Natíela Oliveira e Édelyn Silva. Obrigada pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa: Éder Barbosa, Nathália Mundim e Daniel Sifuentes.

Aos técnicos Washington e César. Ao Biólogo Pedro Ivo pelas bem sucedidas coletas de campo. Ao Químico Adolfo Carlos, por sempre estar disposto a nos ajudar com seu conhecimento.

À todos aqueles, que mesmo sem ter seus nomes citados neste agradecimento, participaram de alguma forma do trabalho e contribuíram com sua execução e/ou planejamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por todo o apoio durante o processo de doutorado, especialmente à coordenadora, Dr^a Carolina Madeira Lucci. Às Assistentes de coordenação Daniele Cristiane de Lara Brito e Ana Paula Cabral pela orientação sobre todos os procedimentos burocráticos com que me confrontei ao longo dos anos.

Às agências financiadoras CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas durante a tese. Ao DPP pelo auxílio financeiro nas coletas de campo. À Universidade de Brasília, UnB, minha segunda casa, que sempre me deu acesso à educação acadêmica e a professores de alta qualidade. À Johns Hopkins University, JHU, que tão bem me recebeu e permitiu a colaboração durante o estágio de Doutorado Sanduíche (bolsa CAPES).

Resumo

O escorpião *Tityus fasciolatus* faz parte da família Buthidae, que contém espécies causadoras de envenenamentos graves em humanos. As moléculas responsáveis pelos efeitos mais severos são conhecidas como neurotoxinas que, em sua maioria, são componentes peptídicos cujos principais alvos são os canais iônicos, os quais são relevantes para o funcionamento dos diversos sistemas orgânicos. Os compostos relacionados aos envenenamentos por peçonhas de escorpiões são conhecidos por agirem com especificidade nos canais iônicos. Os constituintes proteicos de *T. fasciolatus* foram caracterizados com o auxílio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), com coluna C18 analítica, espectrometria de massa MALDI/ TOF-MS e uma biblioteca transcritômica da glândula de peçonha. Mais de 200 diferentes massas moleculares foram identificadas nas frações cromatográficas, assim como 9.130 transcritos na biblioteca transcritômica, dentre os quais foram identificados 278 que codificam toxinas. A atividade biológica de três toxinas e de uma fração foram testadas com canais iônicos expressos em oócitos de *Xenopus laevis*, através da técnica de *Voltage clamp* de dois eletrodos. Foram utilizados canais de Na⁺ de mamíferos hNa_v1.1/β1, hNa_v1.2/β1, hNa_v1.3/β1, hNa_v1.4/β1, hNa_v1.5/β1, hNa_v1.6/β1, hNa_v1.7/β1 e rNa_v1.8/β1. Duas toxinas (Tf3 e Tf4) foram classificadas como α-NaScTx (Sodium Scorpion Toxins), por causarem aumento da corrente de Na⁺ e retardo da inativação rápida do canal. A Tf3 foi ativa em hNa_v 1.1 à hNa_v1.7, enquanto a Tf4 agiu apenas nos hNa_v1.2 e hNa_v1.7. A fração 63 também apresentou atividade α, sendo sua atividade significativa em hNa_v1.7. A toxina Tf2 foi identificada como β-NaScTx, cuja característica é a ativação dos canais de Na⁺ em potenciais onde antes os canais estavam em repouso. Dentre os oito canais de Na⁺ de mamífero testados, a Tf2 foi seletiva para hNa_v1.3, à concentração de 1 μM. Além da descrição das atividades dessas toxinas de Na⁺, este trabalho gerou um acervo de sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos, um perfil das massas moleculares associadas aos seus respectivos tempos de retenção, 18 sequências de prováveis NaScTxs e 15 sequências de prováveis KTxs.

Abstract

Tityus fasciolatus is a scorpion belonging to the Buthidae family, known by the species that cause severe envenomation in humans. The molecules responsible for the most severe effects are known as neurotoxins, which are mostly peptide components, targeting ion channels, which are relevant to the functioning of the various organ systems. The compounds responsible for envenomation are usually known to act with specificity on ion channels. The proteic components of *T. fasciolatus* venom were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), MALDI/TOF mass spectrometry and a transcriptomic library of the venom gland. More than 200 different molecular masses were detected in chromatographic fractions, as well as 9,130 transcripts that encode compounds, among them 278 encode toxins. Two Electrodes Voltage Clamp was used to test the biological activity of three toxins and a fraction in *Xenopus laevis* oocytes expressing ion channels. The Na_v channels used were all mammals, hNa_v1.1/β1, hNa_v1.2/β1, hNa_v1.3/β1, hNa_v1.4/β1, hNa_v1.5/β1, hNa_v1.6/β1, hNa_v1.7/β1 and rNa_v1.8/β1. Two toxins (Tf3 and Tf4) were classified as α-NaScTx (Sodium Scorpion toxins), since they cause an increase in Na⁺ currents and a delay in the rapid inactivation of the channel (Tf3 and Tf4). The Tf3 was active in hNav 1.1 to hNav1.7, while Tf4 affected only hNav1.2 and hNav1.7. Fraction 63 also showed α activity in hNav1.7. Tf2 was identified as β-NaScTx, whose characteristic is the activation of Na_v channels at more negative potentials. Among the eight mammal Na_v channels tested, Tf2 was hNav1.3 selective, at 1 μM. This work led to a collection of sequences of nucleotides and amino acid residues, a molecular mass profile with their respective retention times, and 18 putative NaScTxs and 15 putative KTxs sequences.

Abreviaturas

Abs Absorbância

ACN Acetonitrila

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*

DAN 1,5 diaminonaftaleno

cDNA DNA complementar

HPLC *High Performance Liquid Chromatography*

hNa_v Canais de Sódio dependentes de voltagem de Humanos

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais

ISD *In Source Decay*

K_v Canais de potássio dependente de voltagem

MALDI/TOF *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time Of Flight*

mRNA RNA mensageiro

MS *Mass Spectrometry*

NaScTx *Sodium Scorpion Toxin* (Toxinas de escorpião que atuam em canal de sódio)

Na_v Canais de Sódio dependentes de voltagem

PDB *Protein Data Bank*

rNa_v Canais de Sódio dependentes de voltagem de Rato

RP-HPLC *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia

Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa)

TFA Ácido Trifluoroacético

Uniprot *Universal Protein Resource*

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Transcritoma	3
1.2. A Proteômica	8
1.3. Canais de Na ⁺	10
1.3.1. Classificação das NaScTx	16
1.4. <i>Tityus fasciolatus</i>	18
2. Justificativa	24
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. Material.....	27
4.1. Soluções HPLC	27
4.1.1. Solução de Acetonitrila (Solvente B) 0,1% TFA	27
4.1.2. Solução TFA 0,12% - HPLC.....	27
4.2. Soluções Eletrofisiologia	27
4.2.1. Ca ⁺⁺ -free solution	27
4.2.2. Meio Barth de cultura para oócitos.....	27
4.2.3. Solução ND100	28
5. Métodos.....	29

5.1. Obtenção De Animais.....	29
5.2. Análise Transcritômica	29
5.2.1. Obtenção de RNA.....	29
5.2.2. Quantificação de RNA e qualidade do RNA.....	29
5.2.3. Biblioteca Transcritômica - RNAseq.....	30
5.2.4. Bioinformática	30
5.3. Análise Proteômica.....	31
5.3.1. Extração e Quantificação da peçonha	31
5.3.3. Análise de Massas Moleculares.....	32
5.3.4. Sequenciamento de resíduos de aminoácidos.....	33
5.4. Modelagem molecular	33
5.5. Atividades Biológicas.....	34
5.5.1. Eletrofisiologia.....	34
5.5.2. Ensaio Inseticida.....	36
6. Resultados e Discussão	37
6.1. Biblioteca transcritômica.....	37
6.2. Sondagem dos componentes peptídicos.....	46
6.3. Recromatografias, espectrometria de massa e sequências de resíduos de aminoácidos.....	49
✓ Tf2.....	49

✓ Tf3	51
✓ Tf4	52
✓ Fração 63	53
6.4. Atividade Biológica	55
6.5. Modelos por homologia	64
7. Conclusão.....	72
8. Perspectivas	74
9. Referência Bibliográfica.....	75
Anexo I.....	i
Anexo II.....	l

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição dos escorpiões ao redor do mundo.	1
Figura 2. Representação do Canal de Sódio e Respectivos Alvos de Toxinas.....	13
Figura 3. Estrutura de um canal Na_vAb e estrutura do sensor de voltagem.....	15
Figura 4. <i>Tityus fasciolatus</i>	19
Figura 5. Alinhamento da Tf 2.7 com as hipotensinas TITSE 1 e 2 de <i>Tityus serrulatus</i>	20
Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Tf4 com outras toxinas do gênero <i>Tityus</i> (Adaptado de Guimarães, 2009)	21
Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Tf1 com outras toxinas do gênero <i>Tityus</i> (Adaptado de Guimarães, 2009)	22
Figura 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Tf3 com outras toxinas do gênero <i>Tityus</i> (Adaptado de Guimarães, 2009)	22
Figura 9. Representação gráfica da eletroforese da amostra de RNA de <i>T. fasciolatus</i> em Bioanalyser	37
Figura 10. Gráfico representativo das 18 funções mais frequentes	39
Figura 11. Gráfico de porcentagem das toxinas identificadas na biblioteca transcritômica.....	40
Figura 12. Sequência precursora da toxina Tf2 obtida pela biblioteca transcritômica.....	42
Figura 13. Alinhamento do precursor da Tf2 e de precursores de β -NaScTxS de escorpiões do gênero <i>Tityus</i>	42
Figura 14. Sequência precursora da toxina Tf3, obtida pela biblioteca transcritômica....	43

Figura 15. Alinhamento do precursor da Tf3 com outros precursores do gênero <i>Tityus</i>	43
Figura 16. Sequência precursora da toxina Tf4 obtida pela biblioteca transcritômica.....	44
Figura 17. Alinhamento do precursor da Tf4 com outros precursores de NaScTx do gênero <i>Tityus</i>	44
Figura 18. Perfil cromatográfico de 1mg de peçonha de <i>Tityus fasciolatus</i>	47
Figura 19. Recromatografias da toxina Tf2 e massa molecular	50
Figura 20. Sequência completa da toxina Tf2.....	51
Figura 21. Recromatografias da toxina Tf3 e massa molecular	52
Figura 22. Recromatografias da toxina Tf4	53
Figura 23. Alinhamento de fragmento da fração 63	54
Figura 24. Avaliação da atividade da toxina Tf2 em diferentes canais de Na ⁺ e suas respectivas GVs.....	57
Figura 25. Avaliação da atividade da toxina Tf3 em diferentes subtipos de canais de Na ⁺ e suas respectivas GVs.....	59
Figura 26. Avaliação da atividade da toxina Tf4 em diferentes canais de Na ⁺ e suas respectivas GVs.	61
Figura 27. Avaliação da atividade da fração 63 em diferentes canais de Na ⁺ e suas respectivas GVs	63
Figura 28. Comparação dos potenciais eletrostáticos das α-NaScTxs Tf3, Tf4 e da AaHII.	66

Figura 29. Comparação das sequências de aminoácidos da Tf2 com outras toxinas caracterizadas em canais de Na⁺ e potencial eletrostático da Tf2 com outras β-NaScTx descritas na literatura (Ts1, Css2, Css4) e com a Ts2.....67

Índice de Tabelas

Tabela 1. Relação dos Na _v s com seus respectivos genes, sensibilidade a TTX, tecido de distribuição e efeito de mutação.....	12
Tabela 2. Tabela resumo da montagem da biblioteca transcritômica.	38
Tabela 3. Massas moleculares das frações cromatográficas da peçonha de <i>T. fasciolatus</i>	48

1. Introdução

Desde o apogeu da civilização egípcia até os dias de hoje, os escorpiões permeiam diferentes culturas como personagens de histórias, mitos, lendas e medicina. No contexto mitológico, esse animal é frequentemente relacionado à malevolência, graças às suas dolorosas, e até mesmo letais, picadas (Cloudsley-Thompson, 1990). Porém, em outras culturas, como a asiática, é tido como componente medicinal. São encontrados em todos os continentes, exceto Antártida, distribuindo-se nas regiões tropicais e subtropicais (Fig.1), onde foram catalogadas mais de 1500 espécies (Fet et al., 2000).

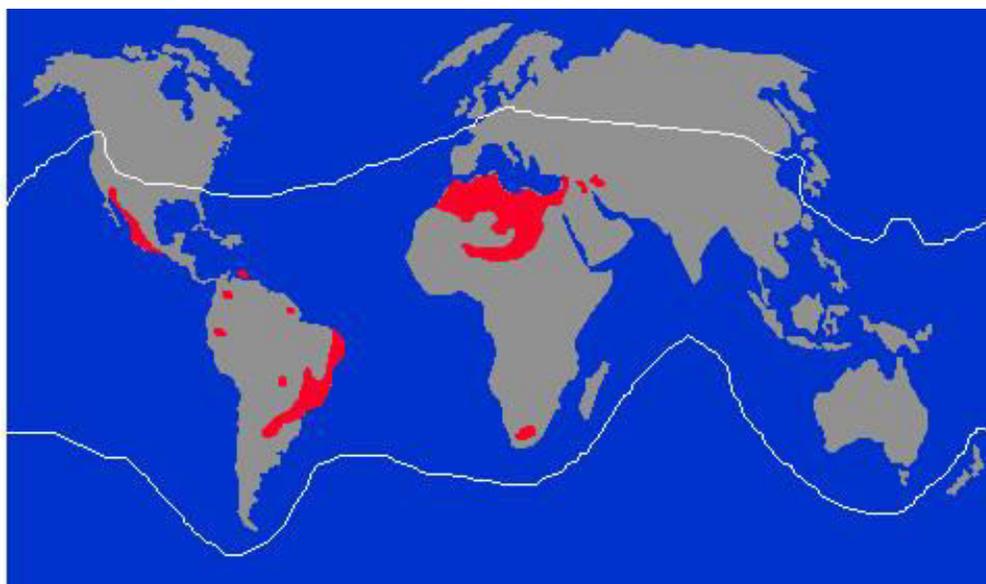


Figura 1. Distribuição dos escorpiões ao redor do mundo. Os escorpiões são encontrados em regiões tropicais e subtropicais (entre as linhas brancas). As áreas em vermelho possuem grande incidência de acidentes provocados por picadas de escorpiões. Retirado de (Lourenço et al., 1996).

Os registros fósseis desses invertebrados datam de 400 milhões de anos, sendo considerados os mais antigos aracnídeos, e sua estrutura morfológica sofreu poucas alterações desde então (Dunlop, 2010). Pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Scorpiones, e são dotados de um aparato inoculador de peçonha chamado télson, que contém as glândulas produtoras de peçonha (Ruppert et al., 2005). A peçonha é uma mistura complexa de moléculas bioativas, das quais se destacam os peptídeos que atuam em canais iônicos de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} , e interagem com estes canais com alta especificidade e afinidade (De Lima et al., 2007).

A interação com os canais iônicos é responsável pela maior parte dos sintomas observados nos casos de picadas por escorpiões. Os sintomas do envenenamento são causados por diferentes moléculas, destacando-se, nesse cenário, aquelas que causam alterações em canais iônicos envolvidos na propagação do impulso nervoso, como canais de Na^+ e K^+ . As toxinas de escorpião que atuam em canais de Na^+ (NaScTx) agem nos canais das terminações neuronais, levando à despolarização das membranas axonais que, conseqüentemente, liberam catecolaminas e acetilcolina que estimulam vários órgãos como intestinos, coração e tecido vascular (Vasconcelos et al., 2005). As picadas de escorpiões podem causar desde dor local, dor irradiada pelo membro, e em casos mais severos complicações cardiorrespiratórias, que podem levar a óbito (Cologna et al., 2009). A mortalidade é mais frequente em crianças, idosos e adultos com saúde debilitada.

Os acidentes de importância médica são, em sua maioria, causados por escorpiões da família Buthidae. Essa família inclui escorpiões dos gêneros *Tityus*, *Centruroides*, *Mesobuthus*, entre outros. Os gêneros *Tityus* e *Centruroides* são

encontrados na América Central e América do Sul, e os gêneros *Mesobuthus* e *Lychas* são encontrados na Ásia.

Dentre as mais 1500 espécies de escorpiões catalogadas, apenas 25 são consideradas de interesse médico. Alguns escorpiões possuem grande adaptabilidade ao ambiente antropizado, o que implica em um maior número de encontros entre esses animais e o homem, aumentando a quantidade de acidentes com envenenamento. No Brasil, as espécies que causam acidentes considerados de moderados a graves são *Tityus serrulatus*, *T. stigmurus*, *T. bahiensis* e *T. obscurus* (Ministério da Saúde, 2009). Devido à sua relevância clínica, a família Buthidae é a mais estudada.

A toxilogia abrange diferentes estratégias e metodologias para identificar e caracterizar componentes das peçonhas, o que proporciona uma melhora na terapêutica do envenenamento e na identificação de moléculas com potencial biotecnológico, especialmente no que tange o estudo com canais iônicos.

1.1. Transcritoma

O transcritoma é o conjunto de RNAs presentes em uma determinada célula, tecido ou órgão em um tempo qualquer, e pode ser afetado pela idade e condição à qual o organismo se encontra (Rendón-Anaya et al., 2014). As análises do transcritoma têm contribuído para melhor descrever a diversidade de componentes presentes nas peçonhas e têm sido realizadas em diferentes animais, como serpentes (Margres et al., 2013, Boldrini-Franca et al., 2009, Neiva et al., 2009), peixes (Magalhaes et al., 2006), aranhas (Jiang et al., 2013, He et al., 2013, Fernandes-Pedrosa Mde et al., 2008) e *Conus* (Lluisma et al., 2012, Hu et al., 2011, Lavergne et al., 2013, Pi et al., 2006), por exemplo. Com escorpiões, os estudos foram realizados com as famílias

Caraboctonidae (Schwartz et al., 2007), Liochelidae (Silva et al., 2009), Buthidae (Valdez-Velazquez et al., 2013, Rendon-Anaya et al., 2012, Alvarenga et al., 2012, D'Suze et al., 2009, Kozminsky-Atias et al., 2008, Ruiming et al., 2010, Morgenstern et al., 2011, Ma et al., 2012, Almeida et al., 2012), Scorpionidae (Diego-Garcia et al., 2012, Ma et al., 2010, Abdel-Rahman et al., 2013), Euscorpidae (Ma et al., 2009) e Urodacidae (Luna-Ramirez et al., 2013).

Além de aperfeiçoarem a identificação de novas moléculas, como ferramenta indireta na caracterização de peptídeos expressos pela glândula de peçonha (predição das sequências primárias), estes trabalhos podem auxiliar os estudos sobre a evolução da composição das peçonhas de diversas famílias de escorpiões (Ma et al., 2009).

Uma das vantagens das bibliotecas de cDNA é que o mRNA maduro, do qual é produzida uma cópia de cDNA, não contém íntrons. Dessa forma, as sequências de cDNA podem ser usadas em sistemas de expressão heteróloga para produção de toxinas de interesse, uma vez que o protocolo de expressão e dobramento de peptídeos esteja estabelecido, diminuindo assim a necessidade de coleta de grandes quantidades de escorpiões (Quintero-Hernandez et al., 2011).

Uma alternativa para a identificação de sequências e compreensão dos genes que codificam essas toxinas emergiu na década de 1990, com diversos trabalhos que descreveram as primeiras clonagens de genes de glândulas de peçonha de escorpiões (Becerril et al., 1993, Vazquez et al., 1995, Becerril et al., 1996, Selisko et al., 1996, Corona et al., 1996). Essa metodologia consiste na formação de uma coleção de DNAs complementares a partir de mRNAs obtidos da glândula de peçonha. Posteriormente os genes são amplificados por PCR, com *primers* desenhados de peptídeos

previamente descritos, e clonados em sistemas heterólogos, amplificando o material e, posteriormente, sequenciando-o. O gargalo para essa metodologia foi o conhecimento prévio de toxinas, que naquele tempo enfrentava desafios para identificação de sequências. Essa vertente é menos utilizada atualmente, porém ainda pode ser encontrada na busca por maiores informações acerca de uma determinada sequência de resíduos de aminoácidos de peptídeos de peçonhas de escorpiões (Caliskan et al., 2012b, Caliskan et al., 2012a, Caliskan et al., 2006). Informações relevantes foram geradas a partir dessa abordagem, como o gene que codifica a toxina mais potente da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, conhecida como gamma-toxina (Ts1) (Becerril et al., 1993). Posteriormente, toxinas similares foram identificadas em *Tityus bahiensis* (Tb1) e *Tityus stigmurus* (Tst1), onde a presença de epítomos similares sugeriu a utilização de um soro multivalente contra as três espécies (Becerril et al., 1996).

Uma abordagem mais recente é o transcrito da glândula de peçonha, em que as bibliotecas de cDNA são exploradas em um nível maior: o sequenciamento de um grande número de clones, de modo a obter uma representação dos componentes expressos pelas glândulas, sem a inclusão dos íntrons, o que inclui os peptídeos e outros produtos proteicos, e de maquinaria celular. Em 2007, Schwartz e colaboradores, publicaram o primeiro transcrito da glândula de peçonha de escorpião, *Hadrurus gertschi*, família Caraboctonidae. Esse trabalho identificou uma variedade de moléculas que são transcritas na glândula. Além das novas toxinas, o trabalho mostrou uma variedade de componentes celulares necessários para o funcionamento das glândulas. De um total de 147 transcritos, cerca de 30% corresponderam às toxinas da peçonha. Nos anos seguintes, muitos trabalhos

adotaram a mesma estratégia. O trabalho com *Opisthacanthus cayaporum*, família Liochelidae, revelou que 36% dos transcritos codificam componentes da peçonha (Silva et al., 2009). Com *Scorpiops jendeki*, família Euscorpidae, esse número foi de 50% (Ma et al., 2009) e com *Heterometrus petersii*, família Scorpionidae, cerca de 53% (Ma et al., 2010). Em comum, todas essas análises transcritômicas realizadas com a glândula de peçonha de escorpiões não-Buthidae, não mostraram a presença de toxinas putativas que atuam em canais de Na^+ entre os transcritos. Este fato pode explicar por que essas peçonhas não são letais para os mamíferos, uma vez que tais toxinas são responsáveis pelos envenenamentos graves. No entanto, essas bibliotecas têm uma presença expressiva de toxinas que atuam em canal de potássio e peptídeos sem ligações dissulfeto (NDBP), que podem atuar como peptídeos antimicrobianos ou citolíticos. Em uma biblioteca não amplificada, é razoável assumir que as porcentagens relativas de toxinas correspondem aos níveis de expressão.

Em relação à família Buthidae, transcritomas foram realizados com *Tityus discrepans* (D'Suze et al., 2009), *Tityus serrulatus* (Alvarenga et al., 2012), *Lychas mucronatus* (Ruiming et al., 2010), *Tityus stigmurus* (Almeida et al., 2012), *Hottentotta judaicus* (Morgenstern et al., 2011). Os dois últimos foram realizados com a glândula em repouso, ou seja, sem extração de peçonha anterior à extração do mRNA da glândula. Uma diferença importante entre glândula em repouso e a glândula ativa é a quantidade de toxinas de Na^+ . Os dados da literatura sugerem que a glândula ativa produz uma maior quantidade dessas moléculas. A abundância relativa de toxinas de Na^+ em *T. discrepans* foi de cerca de 27%, para *T. serrulatus* foi de cerca de 14% e cerca de 10% para *L. mucronatus*, enquanto a glândula em repouso de *T. stigmurus*

apresentou 1,3% e *H. judaicus* com 5%. Em uma glândula ativa é esperada uma maior expressão de mRNA que codificam toxinas, uma vez que a peçonha precisa ser completamente reconstituída para uma eventual predação ou defesa. Essas bibliotecas de cDNA feitas a partir de clonagem, possuem alto custo devido ao sequenciamento de Sanger.

Com o advento de tecnologias de sequenciamento massivo de RNA, a quantidade de informações obtidas através das bibliotecas de sequências nucleotídicas sofreram forte incremento. O pirosequenciamento 454, por exemplo, também é chamado de sequenciamento por síntese, onde uma fita complementar é sintetizada enzimaticamente a partir de um molde de fita simples de cDNA. Os quatro nucleotídeos são adicionados a cada ciclo e os nucleotídeos não incorporados são degradados em seguida. Cada vez que um nucleotídeo é incorporado, existe a liberação pirofosfato, que é detectado por quimioluminescência em uma reação enzimática, daí surgiu o nome pirosequenciamento. O sequenciamento por RNA-seq, é realizado através de adaptadores ligados a ambas as extremidades do RNA, sem necessidade de síntese de cDNA. Por esse motivo, pode ser realizado com menores quantidades de RNA.

Os fragmentos de sequência obtidos por essas tecnologias possuem em média até 1000 nucleotídeos, dependendo da plataforma utilizada. Os dados obtidos são organizados com o auxílio de ferramentas de bioinformática, que podem se utilizar de um genoma de referência para a montagem das bibliotecas de sequências; porém, podem ser feitas *de novo*.

Com glândulas de peçonha de escorpiões, o sequenciamento em larga escala foi realizado com *Pandinus imperator* (Roeding et al., 2009) e *Centruroides noxius*

(Rendon-Anaya et al., 2012), ambas realizadas com plataforma de pirosequenciamento 454. O trabalho com *P. imperator* teve como foco a compreensão da análise filogenética de artrópodes, enquanto com *C. noxius* analisou-se o transcrito global da espécie, incluindo corpo inteiro sem as glândulas de peçonha e transcrito da glândula de peçonha em repouso e ativa.

Em uma era genômica, surge uma enorme quantidade de dados originados das diferentes metodologias de sequenciamento, e a bioinformática é o instrumento essencial para a filtragem, avaliação da qualidade e interpretação das informações obtidas.

A abordagem do transcrito torna possível comparar peçonhas produzidas pela mesma espécie isoladas geograficamente, sem a interferência de modificações pós-traducionais (Ruiming et al., 2010), revelando uma diversificação de componentes da peçonha exposta a diferentes desafios ambientais. As diferenças populacionais podem indicar o caminho para entender por que a peçonha de escorpiões de uma mesma espécie provocam diferentes intensidades na sintomatologia da picada (Oliveira et al., 2013, Rodriguez-Ravelo et al., 2013). Além disso, é possível descobrir as modificações pós -traducionais, comparando a massa molecular experimental exata do composto expresso com a massa molecular teórica gerada pela tradução das bases nucleotídicas em resíduos de aminoácidos, o que facilita a etapa de caracterização proteômica, sendo, portanto, abordagens complementares.

1.2. A Proteômica

A abordagem proteômica, no contexto da toxinologia, abrange a purificação e identificação dos peptídeos e proteínas em peçonhas e venenos. O objetivo da

proteômica é decifrar de que forma a diversidade de componentes pode promover um ganho de eficiência no desempenho do organismo, gerando assim, conhecimento para embasar as próximas gerações de fármacos, diagnósticos e avanços em biotecnologia. O fator limitante para essa abordagem é a diminuta quantidade de peçonha produzida por alguns animais, como aranhas e escorpiões. Para obtenção de quantidades suficientes da amostra biológicas para executar essa tarefa, às vezes é necessária a coleta de muitos indivíduos e proceder com a extração da peçonha por longos períodos de tempo.

Apesar dos fatores limitantes, análises proteômicas foram conduzidas com algumas espécies de escorpiões, principalmente da família Buthidae, entre as quais: *T. cambridgei* (*T. obscurus*) (Batista et al., 2004), *T. costatus* (Diego-Garcia et al., 2005), *T. pachyurus* (Barona et al., 2006), *T. stigmurus* (Batista et al., 2007) e *T. serrulatus* (Pimenta et al., 2001b, Rates et al., 2008). Além desses, escorpiões de famílias de menor importância médica também tiveram seus componentes identificados, como *Opisthacanthus cayaporum* (Schwartz et al., 2008). Estes estudos proteômicos demonstram a grande diversidade e quantidade de moléculas encontradas na peçonha de escorpiões. Os trabalhos básicos para execução dessa tarefa incluem a coleta dos indivíduos, extração e purificação da peçonha e identificação das massas moleculares das frações purificadas. Quando as moléculas atingem grau de pureza elevado, é possível obter as sequências de resíduos de aminoácidos por metodologias como sequenciamento de Edman ou sequenciamento por espectrometria de massa.

Apesar da grande quantidade de dados gerados pelas abordagens proteômicas e transcritômicas, o desafio, para muitos, continua sendo encontrar os alvos biológicos

das moléculas identificadas, assim como a possível aplicabilidade em termos biotecnológicos.

Após a caracterização das moléculas pode-se prosseguir com a caracterização biológica. Dentre os peptídeos identificados em peçonhas de escorpiões, merecem destaque os que atuam em canais de Na^+ e K^+ . Para tal, frequentemente utiliza-se técnicas de eletrofisiologia para registrar a modulação das correntes de iônicas.

1.3. Canais de Na^+

Os sinais elétricos biológicos, desde organismos procariontes ao homem, dependem da resposta rápida dos canais iônicos dependentes de voltagem às pequenas diferenças nos potenciais de membrana (Catterall, 2010). Os canais iônicos que respondem a diferenças de potencial permitem a passagem de cátions com taxas próximas à difusão, sendo responsáveis por distintos processos fisiológicos. Os Na_v iniciam o potencial de ação. Os Ca_v iniciam processos como a transmissão sináptica, contração muscular e secreção hormonal. Os K_v terminam o potencial de ação, levando a membrana a seu estado de repouso. Em comum, esses canais iônicos compartilham uma arquitetura similar, com subunidades homólogas que formam um poro central, seletivo a íons, cercados por sensores de voltagem (Yu et al., 2005). O impulso elétrico gerado após um determinado estímulo percorre os neurônios, promovendo a transmissão da informação ao SNC.

Até o momento já foram identificados nove subtipos de canais de Na^+ dependentes de voltagem em mamíferos, sendo quatro isoformas altamente expressas no sistema nervoso central ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ e $\text{Na}_v1.6$), duas isoformas expressas em músculo ($\text{Na}_v1.4$ e $\text{Na}_v1.5$) e três isoformas expressas no sistema

nervoso periférico (Na_v 1.7, Na_v 1.8, Na_v 1.9) (Bosmans and Tytgat, 2007) (Tabela 1). Alguns autores relacionam o canal $hNa_v1.3$ à epilepsia e percepção de estímulos nociceptivos após lesão da medula espinhal (Estacion et al., 2010, Hains and Waxman, 2007, Vanoye et al., 2014). Esses canais possuem alta homologia entre si e conseqüentemente compartilham similaridades biofísicas e farmacológicas. São formados por uma subunidade α , de 260 kDa, que é composta de quatro domínios transmembrana (DI-DIV), que se organizam formando um poro (Fig. 2) (Catterall et al., 2005).

Cada domínio possui seis segmentos em α -hélice que atravessam a membrana (S1-S6), onde os segmentos S1-S4 são sensíveis à voltagem e os segmentos S5-S6 são os formadores do poro do canal (Catterall et al., 2005). O segmento S4 possui uma série de aminoácidos carregados, em especial um conjunto de argininas, seguido de dois resíduos hidrofóbicos, e se desloca em resposta à despolarização, iniciando a abertura do poro do canal iônico (Bezanilla, 2006, Catterall, 2010). As subunidades α estão ligadas a subunidades β , que geralmente interferem na cinética do canal e melhoram a fixação do canal na membrana, assim como âncoras (Tseng et al., 2007).

As subunidades α são funcionais sem as subunidades β quando expressas em sistemas de expressão. Cada canal iônico é expresso de maneira diferencial em determinado tecido. Já foram descritas mutações em genes que codificam determinados canais iônicos e a expressão desses canais “defeituosos” levam a condições hereditárias e adversas, sendo chamadas de canalopatias. Dentre as canalopatias, são conhecidas epilepsias, enxaqueca, paralisia periódica, arritmia cardíaca e síndrome de dor crônica (Tabela 1). Apesar dos mecanismos moleculares

para os efeitos dessas mutações não terem sido totalmente definidos ainda, algumas dessas canalopatias resultam em falhas do sensor de voltagem dos canais iônicos e seus respectivos mecanismos de ativação e inativação (Catterall, 2010).

Tabela 1. Relação dos Na_vs com seus respectivos genes, sensibilidade a TTX, tecido de distribuição e efeito de mutação (Adaptado de England and Groot, 2009).

Canal	Gene	Sensibilidade		Tecido	Efeito de mutações
		TTX			
Na _v 1.1	SCN1A	sim		SNC, SNP	Epilepsia
Na _v 1.2	SCN2A	sim		SNC, SNP	Epilepsia
Na _v 1.3	SCN3A	sim		SNC, SNP (embrionário)	Nenhuma reportada
Na _v 1.4	SCN4A	sim		Músculo Esquelético	Miotonia, paralisia periódica
Na _v 1.5	SCN5A	não		Coração	Síndrome de QT longa, Síndrome de Brugada, Bloqueio cardíaco progressivo
Na _v 1.6	SCN8A	sim		SNC, SNP	Atrofia cerebelar
Na _v 1.7	SCN9A	sim		SNP (céls. Schwann)	Alterações na sensibilidade a dor
Na _v 1.8	SCN10A	não		SNP (neurônios sensórios)	Nenhuma reportada
Na _v 1.9	SCN11A	não		SNP (DRG)	Nenhuma reportada
Na _v x	SCN6/7A	Não funcional		Glia	

Os canais de Na⁺ identificados em insetos possuem uma estrutura similar aos de mamíferos. Alguns genes descritos foram o *para*, clonado de *Drosophila melanogaster* (Warmke et al., 1997); o Vssc1, de mosca doméstica; o Para^{CSMA} e o BgNa_v1-1, de barata (Soderlund and Knipple, 2003, Tan et al., 2005).

Por terem um sítio de ação preferencial (Fig. 2), as toxinas exibem diferentes afinidades por diferentes tipos de canais. Além disso, algumas são seletivas a determinados subtipos de canais. A figura 2 ilustra os sítios de interação de algumas toxinas com os canais de Na⁺ (Stevens et al., 2011). No sítio 1, agem as toxinas que

obstruem o poro fisicamente, como a TTX (tetrodotoxina, encontrada em peixes baiacus e em outros organismos), a saxitoxina (dinoflagelados e cianobactérias) e as μ -conotoxinas (moluscos *Conus*). Os Na_v podem ser classificados de acordo com a sua sensibilidade ao bloqueador TTX (Tabela 1), sendo chamados de sensíveis ou resistentes a TTX. No sítio 2, agem as batracotoxinas (anfíbios) e as grayanotoxinas (flores do gênero *Rhododendron* – azaléas). No sítio 3, agem as toxinas de anêmonas, as α -toxinas de escorpião (α -NaScTx) e as delta-atracotoxinas de aranha, que provocam um prolongamento do potencial de ação, retardando a inativação do canal. No sítio 4, agem as β -toxinas de escorpiões (β -NaScTx), as delta-Palutoxinas e as β -toxinas de aranhas. No sítio 5 agem as Brevetoxinas e Ciguatoxinas, produzidas por dinoflagelados (Stevens et al., 2011).

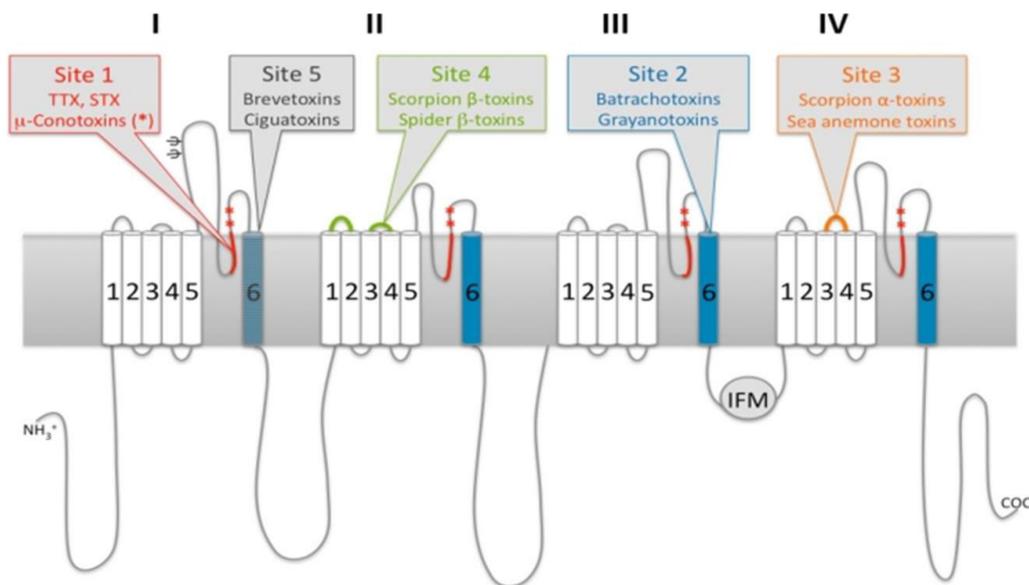


Figura 2. Representação do Canal de Sódio e Respective Alvos de Toxinas. As diferentes toxinas animais possuem sítios de ação que são comuns a cada classe. Sítio 1: atuam as TTX-tetrodotoxina, STX-saxitoxinas e as μ -conotoxinas; Sítio 2: Batracotoxinas e Grayanotoxinas; Sítio 3: α -NaScTxs e α -toxinas de anêmonas; Sítio 4: β -NaScTxs e β -toxinas de aranhas; e Sítio 5: Bravetoxinas e Ciguatoxinas (Retirado de Stevens et al., 2011).

A primeira estrutura cristalográfica em alta resolução (2,7 Å) de um canal de Na⁺ foi recentemente descrita (Fig. 3) (Payandeh et al., 2011, Payandeh et al., 2012). Esse canal foi isolado da bactéria *Archobacter butzleri*, e nomeado Na_vAb. É considerado um protótipo para a compreensão sobre a sensibilidade à voltagem, condutância e seletividade iônica, e mecanismos de ativação e inativação de uma classe inteira de canais iônicos (Catterall, 2014).

Na figura 3 é possível observar a arquitetura do canal Na_vAb, onde se observa em tons de azul, um poro central formado por quatro domínios formadores do poro, compostos pelos segmentos S5 e S6 e da alça do poro (Fig. 3A). Os quatro módulos sensíveis à voltagem são formados pelos segmentos S1-S4, que são associados com o aro externo do poro (cores quentes) (Payandeh et al., 2011). Assim como nos K_vs (canais de K⁺ sensíveis a voltagem), os domínios posicionam suas porções funcionais de forma a manter o sensor de voltagem associado com o módulo formador do poro mais adjacente (Fig. 3C) (Long et al., 2007).

A arquitetura do poro do Na_vAb mostra um amplo vestíbulo externo, um filtro de seletividade estreito, uma cavidade central ampla e uma comporta de ativação intracelular formada por parte do segmento S6, que está na posição fechada na figura 3B (Payandeh et al., 2011).

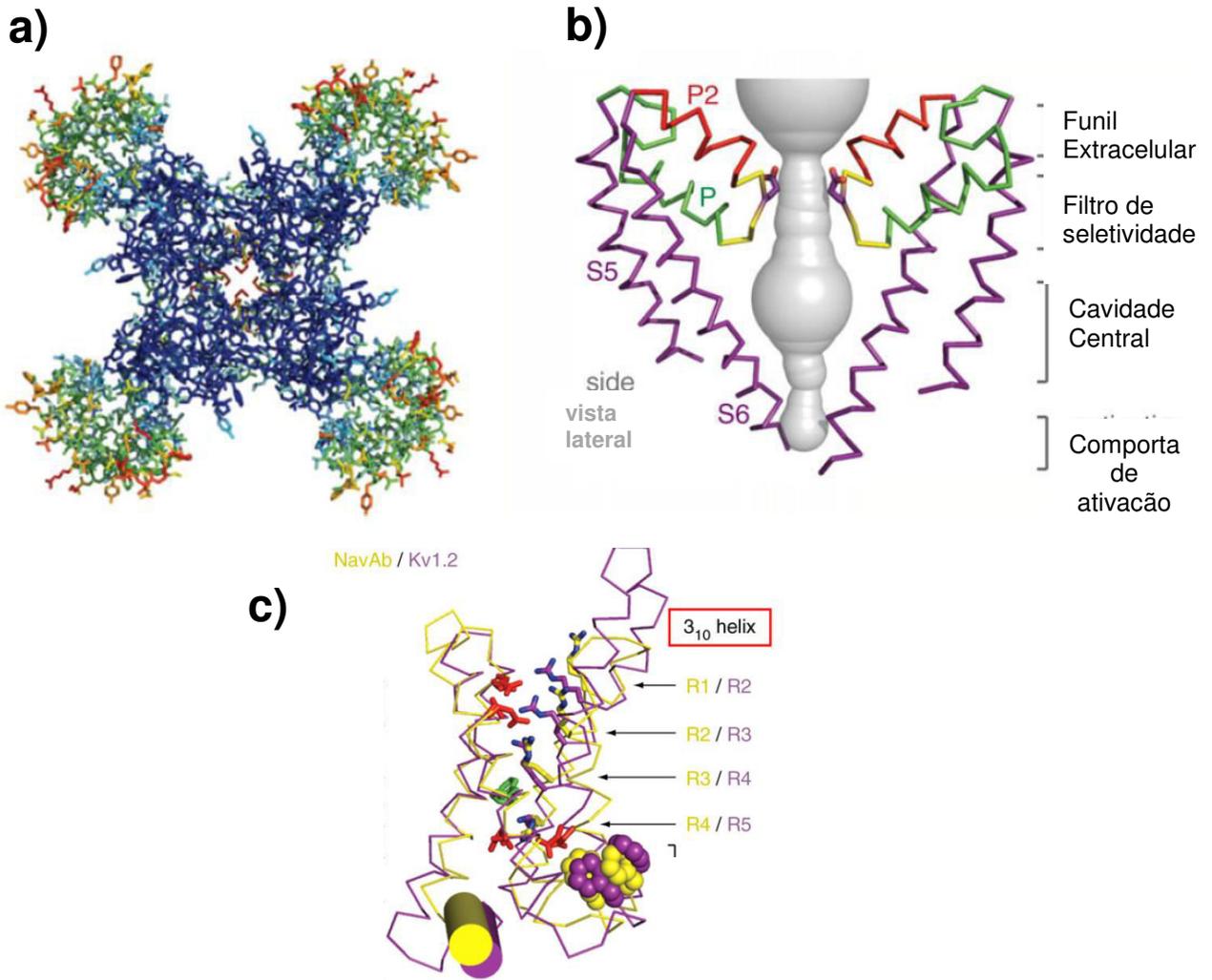


Figura 3. Estrutura de um canal Na_vAb e estrutura do sensor de voltagem. A) vista superior do canal Na_vAb. B) Arquitetura do poro, com indicação dos segmentos S5 e S6 e os loops P de duas subunidades laterais. C) Vista Lateral do domínio sensível a voltagem, onde se observa o alinhamento dos sensores de voltagem de um canal de K⁺ (roxo) e de Na⁺ (amarelo), com destaque para as cargas positivas conferidas pela sequência de argininas (R) (adaptado de Payandeh et al., 2011).

1.3.1. Classificação das NaScTx

O banco de dados de proteínas UNIPROT lista cerca de 800 peptídeos de escorpiões depositados (busca pelos termos “scorpion AND peptide”, em 24/07/14). Dentre esses, aproximadamente 200 peptídeos correspondem a prováveis toxinas de escorpião que atuam em canais de Na^+ (NaScTx). Essas toxinas possuem entre 58 e 76 resíduos de aminoácidos, estabilizados por 4 pontes dissulfeto, podendo ou não sofrer outras modificações pós-traducionais.

A toxicidade das peçonhas de escorpiões em humanos é atribuída às toxinas que atuam em canais de Na^+ , o que torna as NaScTxs de grande relevância para a saúde humana, uma vez que esses canais regulam uma grande variedade de atividades fisiológicas (Rodriguez de la Vega and Possani, 2005).

As NaScTxs podem ser divididas em α e β , dependendo do modo de ação (Gurevitz et al., 1998, Rodriguez de la Vega and Possani, 2005). As α -NaScTxs são moléculas de aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos, que se ligam a um sítio receptor na superfície extracelular do canal de Na^+ , mais especificamente no domínio DIV, entre os segmentos S3-S4, retardando a inativação do canal (Catterall, 2010). De acordo com os motivos estruturais e com a especificidade da interação com canais de Na^+ de mamíferos ou de insetos, foram divididas em outros três subgrupos:

1. **α - toxinas clássicas** são altamente tóxicas a mamíferos, como, por exemplo, a AaIII de *Androctonus australis* Hector (Legros et al., 2005), e a LqhII de *Leiurus quinquestratus hebraeus* (Sautiere et al., 1998), que se ligam-se com alta afinidade a sinaptossomos.

2. **α -toxinas inseticidas**, que são altamente tóxicas para insetos como, por exemplo, a Lqh α IT de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Eitan et al., 1990).
3. **α -like**, que agem tanto em canais de Na⁺ de mamíferos quanto de insetos como, por exemplo, a Lqh III de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Bosmans et al., 2005).

As β -NaScTxS também se ligam a um receptor nos segmentos S3-S4, porém, no domínio DII, deslocando a voltagem de ativação do canal para potenciais de membrana mais negativos (Gordon et al., 2003, Rodriguez de la Vega and Possani, 2005, Catterall, 2010). As β -toxinas são subdivididas em quatro subfamílias (Gordon et al., 2003, Gurevitz et al., 2007, Rodriguez de la Vega and Possani, 2007):

1. **β -NaScTx anti-mamíferos**, que são altamente tóxicas a mamíferos, e modulam a ativação de canais de Na⁺ em cérebro de mamíferos, como a Cn2, de *Centruroides noxius* (Vazquez et al., 1995, Pintar et al., 1999) e a C α s4, de *Centruroides suffusus suffusus* (Martin et al., 1987). As toxinas desse grupo foram, em sua maioria, isoladas de escorpiões do Novo Mundo (Américas) (Possani et al., 1999).
2. **β -Toxinas inseticidas excitatórias**, que são inofensivas a mamíferos, e induzem paralisia espástica, causada por atividade repetitiva dos nervos motores, resultantes da ativação dos canais de Na⁺ a potenciais de membrana mais negativos. Como exemplo, tem-se a AahIT, de *Androctonus australis* Hector (Loret et al., 1990).

3. **β -Toxinas inseticidas depressoras**, que induzem paralisia flácida em insetos, como, por exemplo, a LqHIT2, de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Zlotkin et al., 1991).
4. **Toxinas β -like** que são altamente ativas em mamíferos e em insetos, como a Lqhb1, de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Gordon et al., 2003) e a Ts1, de *T. serrulatus* (Martin-Eauclaire et al., 1992) .

1.4. *Tityus fasciolatus*

No Brasil, ocorrem as famílias Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Liochelidae (Lourenço, 2003), sendo a família Buthidae composta dos gêneros *Ananteris*, *Isometrus*, *Microtityus*, *Rhopalurus* e *Tityus* (Lourenço et al., 1996). O gênero *Tityus* possui distribuição por todo o território nacional, destacando-se por possuir representantes de interesse toxicológico: *Tityus serrulatus*, *T. metuendus*, *T. stigmurus*, *T. bahiensis*, *T. fasciolatus*.

Em áreas de Cerrado, predominantemente na região Centro-Oeste, encontra-se o escorpião *Tityus fasciolatus*, que ocorre também em Goiás e Minas Gerais e é responsável por acidentes nestas regiões (Yoshizawa, 2002). Possui de 4,5 a 7 cm de comprimento e padrão de coloração marrom e amarela, com três listras marrons na região dorsal e listras nas pernas e palpos (Fig. 4). São termófilos e vivem associados a cupinzeiros do gênero *Armitermes* (Lourenço, 2003).



Figura 4. *Tityus fasciolatus*. Imagem do escorpião *T. fasciolatus*, vista dorsal, onde se observa as listras características no dorso, pernas e palpos. (Foto cedida por Gustavo Guimarães).

Em 2003, Wagner e colaboradores descreveram a neurotoxina Tf4 (UniProtP 83435), considerada moduladora de canal de Na⁺, com estrutura primária semelhante às toxinas TsTx-VI (Marangoni et al., 1990) e TsNTxP (Guatimosim et al., 1999) da peçonha de *T. serrulatus*. A Tf4 foi classificada como uma α -NaScTx. Em células GH3, uma linhagem celular estabilizada derivada de tumor adenohipofisário de rato, a toxina não induziu alterações nas correntes de Na⁺ ou de K⁺. A Tf4, com doses até 140 μ g, não possuiu efeito tóxico em larvas de *Tenebrio molitor* (Wagner et al., 2003).

Wagner (2003) descreveu ainda a sequência parcial de um peptídeo (KEGYAMVDEG), contido em uma fração chamada p23. As massas moleculares encontradas nessa fração foram de 6.954 Da e 7.294 Da. A sequência parcial obtida foi similar à Ts2, de *T. serrulatus*, Tb2, de *T. bahiensis*, e Tst2, de *T. stigmurus* (Becerril et al., 1996) e foram classificadas como β -NaScTx. O mesmo trabalho identificou um peptídeo de 2.750Da na peçonha de *T. fasciolatus* (Wagner, 2003) que, mais tarde, foi descrito como hipotensor e chamado de Tf2.7 (Zanotta, 2006). Esse peptídeo apresenta

identidade de 79% com as hipotensinas TITSE 1 e 2 de *T. serrulatus* (Verano-Braga et al., 2008) que àquela época não haviam sido descritas (Fig. 5).

Acc	Nome	10	20
P84190	HYT24_TITSE1	AEIDFSGIPEDI	IKEIKETNAKPPA
P84189	HYT13_TITSE1	AEIDFSGIPEDI	IKQIKETNAKPPA
<i>T. fasciolatus</i>	Tf2.7	ADIDFRGVPENIVK	-IKETNAKPPA
		*:***	*:***:*:* *****

Figura 5. Alinhamento da Tf 2.7 com as hipotensinas TITSE 1 e 2 de *Tityus serrulatus*.

Alinhamento da Tf2.7 com as hipotensinas de *T. serrulatus* descritas em 2008 (Verano-Braga et al., 2008).

Zanotta (2006) identificou as sequências parciais de outros dois peptídeos, chamados de Tf14 (7555,4 Da) - KIYEXCELAXELINXFNF (X- não identificado) - e Tf3.5 (3585,34 Da) - TQKNCRSKRDCQTVCMVVDRCQYGTCYCKGN. A Tf3.5 apresenta três ligações dissulfeto e 58% de identidade com a α -KTx17.1 de *Mesobuthus martensii* (Li et al., 2003).

(Guimarães, 2009) fez uma caracterização molecular e imunológica indicando que a peçonha de *T. fasciolatus* possui toxicidade e letalidade moderadas em camundongos machos *Swiss CF1*, de 20g, via sub-cutânea. A peçonha foi neutralizada com eficiência pelo soro anti-*T. serrulatus*, no estudo *in vivo*, sendo a DL₅₀ de 59,65 μ g/camundongo. A peçonha bruta causou congestão e hemorragias em coração, pulmão e cérebro de camundongos.

Guimarães (2009) realizou uma extração e purificação de RNA, e por RT-PCR, com oligonucleotídeos desenhados tendo como molde toxinas da peçonha de *T. serrulatus*, amplificou sequências de interesse. Com essa metodologia, foi possível a identificação de precursores para três NaScTxs: Tf1, Tf3 e Tf4a:

- Tf4a - Tendo como molde a TsNTxP (*T. serrulatus*) (Guatimosim et al., 1999), encontrou-se uma sequência que corresponde à Tf4 de *T. fasciolatus*. Como houve uma diferença em um resíduo de aminoácido, na posição 25 (T por K), foi usada a letra “a” para diferenciar da toxina Tf4 previamente descrita por Wagner *et al.* (2003) (Fig.6).

```

Acc      Nome                10      20      30      40      50      60
P83435_Tf4      GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCDTECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATNKC---
Tf4a           GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCDKECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATNKCGGKK
P60275_TbIT_1  GKEGYPVDSRGCKVTCFFTGAGYCDKECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSVPVYDNASNKCB--
Q5G8A8_TcoNTxP1 GKEGYPADSKGCKVTCFLTAAGYCNTECKLQKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATNKCGGKK
P45669_Ts6     GREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPESVKIWTSETNKC---
O77463_TsNTxP  GREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSETNKCGGKK
*:***.**:***:***:*..***:.**:*.*****:*. :. :. :***

```

Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Tf4 com outras toxinas do gênero *Tityus* (Adaptado de Guimarães, 2009). A sequência Tf4 utilizada para o alinhamento foi obtida pelo cDNA amplificado a partir de iniciadores sintetizados com base em sequências obtidas de *T. serrulatus*. Em sublinhado, a substituição de uma T por uma K (Adaptado de Guimarães, 2009). P83435 Tf: *T. fasciolatus* (Wagner et al., 2003); P60275 TbIT_1: *T. bahiensis* (Pimenta et al., 2001a); Q5G8A8 TcoNTxP1: *T. costatus* (Diego-Garcia et al., 2005), P45669 Ts 6 (Marangoni et al., 1990) e O77463 TsNTxP: *T. serrulatus* (Guatimosim et al., 1999).

Pinto (2009) demonstrou que a peçonha de *T. fasciolatus* causou danos no sistema cardiorrespiratório de ratos jovens, 5 minutos após sua injeção via subcutânea, induzindo arritmia respiratória e aumento da frequência cardíaca. Esse resultado é compatível com as alterações causadas por outras espécies de *Tityus*, como *T. serrulatus*. O dano cardíaco é provocado tanto pela ação direta da peçonha quanto indiretamente devido as alterações do sistema autônomo (Amaral et al., 1991, Teixeira et al., 2001, Rezende et al., 1996). A liberação de catecolaminas e neurotransmissores alteram a hemodinâmica, causando hipertensão e arritmias.

2. Justificativa

O estudo de canais iônicos implicou no surgimento de uma nova linha de pesquisa em busca de moléculas capazes de modular as atividades desses canais, especialmente nos casos onde as mutações levam a doenças hereditárias, como é o caso da paralisia periódica hipocalêmica. Os fármacos atualmente utilizados não possuem grande especificidade e seletividade, e o estudo de moléculas como as toxinas de aracnídeos fornecem dados para o desenvolvimento de compostos mais específicos, que poderão gerar, no futuro, novos agentes terapêuticos e inseticidas.

O interesse por moduladores de canais de Na^+ é refletido em bases de dados de patentes, como o *European Patent Office* (www.epo.org), que possui pelo menos 30 registros desses moduladores. As universidades e indústrias farmacêuticas têm dispendido esforços em *screenings* de larga escala, a fim de identificar respostas detalhadas para o desenho de fármacos mais específicos, e conseqüentemente menores efeitos colaterais (England and de Groot, 2009).

No que se refere ao estudo com peçonhas, a proteômica possibilita a identificação e caracterização química dos compostos isolados. A transcritômica surge como aliada na elucidação das sequências de aminoácidos e dos mecanismos moleculares na produção da peçonha. Juntas, essas técnicas se complementam. A identificação desses componentes é uma oportunidade de descobrimento de moléculas com potencial utilização como ferramentas em biotecnologia. Porém, apenas a sua identificação limita seus potenciais usos. Diante disto, os ensaios biológicos em busca de um alvo são essenciais para que essas informações sejam bem aproveitadas.

A análise eletrofisiológica de NaScTxS contribui para que as relações de estrutura e função dos canais iônicos seja elucidada. Poucos trabalhos foram feitos até o momento com cobertura abrangente de canais, sendo os ensaios restritos a apenas alguns clones de canais iônicos. O presente trabalho conta com a análise de 4 compostos testados em 8 diferentes subtipos de canais iônicos.

Os estudos com a peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília foram iniciados no final da década de 90. A escassez de trabalhos com a peçonha deste escorpião motivou o início das pesquisas em buscas de novas moléculas com possíveis aplicabilidades.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Conhecer a composição da peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* através dos transcritos e compostos expressos.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Construir uma biblioteca transcritômica da glândula de peçonha de *T. fasciolatus* e identificar os precursores das toxinas putativas de Na⁺.
- ✓ Fracionar a peçonha de *T. fasciolatus* e identificar as massas moleculares de seus principais componentes peptídicos.
- ✓ Determinar as estruturas primárias dos peptídeos mais abundantes da peçonha.
- ✓ Determinar a atividade biológica dos peptídeos mais abundantes da peçonha, com ênfase em toxinas que atuam em canais de Na⁺.

4. Material

4.1. Soluções utilizadas em HPLC

4.1.1. Solução de Acetonitrila (Solvente B) 0,1% TFA

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (JT Baker ®), à temperatura ambiente.
- ✓ TFA grau HPLC (JT Baker ®), à temperatura ambiente.

4.1.2. Solução TFA 0,12% - HPLC

- ✓ Água deionizada (Mili-Q®), à temperatura ambiente.
- ✓ TFA grau HPLC (JT Baker ®), à temperatura ambiente.

4.2. Soluções utilizadas em Eletrofisiologia

4.2.1. *Ca⁺⁺-free solution*

	[] mM
NaCl	82,5
KCl	2,5
MgCl ₂	1
HEPES	5

pH ajustado para 7,6 com NaOH.

Filtrado em filtro estéril.

4.2.2. Meio Barth de cultura para oócitos

	[] mM
NaCl	88
KCl	1
Ca(NO ₃) ₂	0,33
CaCl ₂	0,41
MgSO ₄	0,82
NaHCO ₃	2,4
HEPES	5

pH ajustado para 7,4 com NaOH.

Filtrado em filtro estéril.

Adicionar 0,1 mg/ml gentamicina.

4.2.3. Solução ND100

[] mM

NaCl 100

CaCl₂ 0,3

MgCl₂ 1

HEPES 5

pH ajustado para 7,6 com NaOH.

5. Métodos

5.1. Obtenção De Animais

Cerca de 30 indivíduos adultos de *Tityus fasciolatus* foram coletados no Setor de Mansões Lago Norte, Brasília, DF, sob a licença do IBAMA nº 19138-1. Os escorpiões foram mantidos em terrários apropriados no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, onde receberam água *ad libitum* e foram alimentados periodicamente com baratas.

5.2. Análise Transcritômica

5.2.1. Obtenção de RNA

Oito espécimes (4 machos e 4 fêmeas), adultos e recém coletados, do escorpião *Tityus fasciolatus*, foram submetidos a extração de peçonha por estimulação elétrica 3 dias antes da extração do RNA. O esvaziamento da glândula promove a síntese de peptídeos e proteínas que compõem a peçonha, induzindo assim, a produção de RNA mensageiro (mRNA). Utilizou-se o kit de extração de RNA ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, U.S.A). Os télsons dos indivíduos foram cortados diretamente no tampão de extração, macerados e o RNA extraído segundo o protocolo do fabricante. O RNA foi então armazenado a -70 °C.

5.2.2. Quantificação de RNA e qualidade do RNA

A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotômetro NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, U.S.A.), nos comprimentos de onda 230, 260, 280 e 320 nm. A razão ótima para RNA é de $A_{260}/A_{280} = 1,9-2,0$. O RNA foi submetido a uma eletroforese em um 2100

Electrophoresis Bioanalyser (Agilent) para verificação da integridade e qualidade do RNA extraído.

5.2.3. Biblioteca Transcritômica - RNAseq

Após verificação da qualidade do RNA, o material foi enviado para sequenciamento HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) na Scripps University, USA, de acordo com o protocolo do fabricante.

5.2.4. Bioinformática

O *pipeline* computacional de análise do transcrito foi dividido em 3 etapas: (i) filtragem, (ii) montagem e (iii) anotação. Durante a etapa de (i) filtragem, a qualidade das sequências foi verificada por meio do programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>). Adaptadores Illumina e sequências inteiras ou fragmentos de sequências de baixa qualidade (valor de Phred < 20) foram filtrados utilizando o programa PRINSEQ. Para que as sequências provenientes dos mesmos fragmentos estivessem pareadas nos arquivos de sequências R1 e R2, foi utilizado um *script* na linguagem de programação Perl. *Scripts* consistem em pequenos programas de computador criados para realizar tarefas específicas, geralmente envolvendo manipulação de arquivos.

Em seguida, foi realizada a etapa de (ii) montagem das sequências utilizando-se a abordagem *de novo* por meio do *pipeline* Oases que utiliza o programa Velvet adaptado para montagem de transcritos. Optou-se pela abordagem de montagem *de novo* devido à ausência de um genoma de referência para o organismo em estudo. Nesse processo, foram utilizados tamanhos de k-mer de 19 a 35pb, sendo os resultados para cada k-mer, posteriormente, concatenados em um arquivo único de

sequências consenso, denominadas *contigs* ou transcritos, no caso do estudo de transcrito. Os *contigs* de cada replicata foram montados separadamente, sendo depois comparados entre si por meio do programa Blast e *scripts* Perl para remoção de redundância. Dentre um grupo de sequências que apresentavam similaridade com valor de *e-value* inferior a 1E-5, era selecionada a sequência de maior extensão como representativa do grupo.

Na etapa de anotação (iii), a atribuição de função biológica aos transcritos ocorreu pela comparação com sequências de aminoácidos de eucariotos, obtidas a partir do banco curado de sequências Swiss-Prot, por meio do programa Blast. Um transcrito foi anotado com a mesma função biológica da sequência que apresentasse a maior similaridade (*best hit*) e que apresentasse o valor de *e-value* igual ou inferior a 1E-3. A partir dessa primeira etapa de anotação, os transcritos que correspondiam a potenciais toxinas foram selecionados e seus respectivos códigos do Gene Ontology, obtidos a partir do banco Swiss-Prot, foram associados por meio da utilização de *scripts* Perl.

Os alinhamentos foram obtidos por ClustalO (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

5.3. Análise Proteômica

5.3.1. Extração e Quantificação da peçonha

A peçonha dos exemplares adultos de *T. fasciolatus* foi extraída por meio de estimulação elétrica próxima ao télson. A peçonha foi solubilizada em TFA 0,12%, submetida à centrifugação a 15.000 × g por 10 min. O sobrenadante foi retirado, seco

a vácuo e armazenado a -20°C . A quantificação foi realizada por espectrofotometria a 280 nm. Um intervalo mínimo de 30 dias foi respeitado entre extrações de peçonha.

Para a quantificação dos peptídeos purificados, foi realizada a leitura 280nm e utilização dos parâmetros obtidos pelo programa PROTPARAM (Wilkins et al., 1999).

5.3.2. Purificação de Peptídeos - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Alíquotas de 1mg de peçonha de *T. fasciolatus* foram fracionadas em HPLC, utilizando coluna de fase-reversa C18 analítica (250 x 4,60 mm, 4 micron, Phenomenex, Inc.,USA). A cromatografia seguiu um gradiente linear da solução A (0,12% ácido trifluoroacético - TFA em água) até 60% da solução B (0,10% TFA em acetonitrila), a um fluxo de 1mL/min, por 60 min. A detecção foi obtida por leitura das absorbâncias a 216 e 280nm. As frações foram coletadas manualmente e secas a vácuo. As frações mais abundantes foram submetidas a recromatografias, cuja metodologia variou de acordo com o tempo de retenção de cada fração, e consiste em um gradiente linear de 0,5% de acetonitrila por minuto, com a coluna a 45°C .

5.3.3. Análise de Massas Moleculares

As amostras foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra). As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletido ou linear positivo, utilizando calibração externa. Para peptídeos de até 4.000 Da foi utilizado *Peptide Standard calibration mixture* (Bruker Daltonics), e entre 4.000 a 20.000 Da foi utilizado *Protein Standard calibration mixture* (Bruker Daltonics). As amostras analisadas foram depositadas em uma placa do tipo Anchorchip (600 mm), secas à

temperatura ambiente. Os espectros de massa molecular foram analisados com o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

Os peptídeos descritos foram analisados em micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Germany), operado em modo positivo. As amostras foram diluídas em ácido fórmico 1%, em uma mistura de água/acetonitrila (v:v, 1:1) e aplicadas por infusão direta no espectrômetro.

5.3.4. Sequenciamento de resíduos de aminoácidos

Os 15 primeiros resíduos de aminoácidos do N-terminal do peptídeo Tf2 foram identificados por sequenciamento automático de Edman, em PPSQ-23 *Protein Peptide Sequencer* (Shimadzu Co., Japan).

O sequenciamento por ISD (*In Source Decay*), foi realizado em MALDI/TOF-TOF-MS UltraFlex III, matriz DAN (1,5-diaminonaftaleno) na proporção 3:1 (matriz:amostra), utilizando calibração externa com BSA (*Bovine Serum Albumin*).

5.4. Modelagem molecular

A construção do modelo de Tf2, Tf3, Tf4 e Ts2 foi realizada pelo método de reconhecimento de dobragem para a identificação de potenciais modelos usando o servidor Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009). Este servidor é capaz de identificar homólogos utilizando sequências distantes obtidas a partir de algoritmos, como PSI-BLAST e HMM (Altschul et al., 1990, Soding, 2005). O modelo com a maior pontuação, Ts1 (PDB ID 1NPI, 1,16 Å de resolução) (Pinheiro et al., 2003), foi escolhido como molde para as toxinas Tf2, Tf4 e Ts2, com 98% de cobertura e identidades de 75%, 64% e 74%, respectivamente. Para a toxina Tf3, o modelo utilizado foi da Kurtoxina (PDB ID 1T1T), cuja identidade com a Tf3 é de 53%. A toxina AaH2 (PDB ID 1AHO,

(Housset et al., 1994)) foi adicionada como referencial por ser considerada um modelo padrão de atividade das α -NaScTxS. Os potenciais eletrostáticos de superfície foram calculados usando o programa de gráficos moleculares CCP4 pelo método de Poisson-Boltzmann embutido (McNicholas et al., 2011).

5.5. Atividades Biológicas

5.5.1. Eletrofisiologia

5.5.1.1. Expressão dos canais iônicos

Para a expressão dos canais iônicos em oócitos de *Xenopus laevis*, os plasmídeos hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3, hNav1.4, hNav1.5, hNav1.6, hNav1.7, rNav1.8 foram linearizados com as enzimas apropriadas de acordo com seus sítios de restrição, e transcritos com T7mMESSAGE-machine kit (Ambion, U.S.A.).

5.4.1.2. Registro das correntes

Os registros de eletrofisiologia foram realizados a temperatura ambiente, 22° C, utilizando amplificador AxoPatch, controlado pelo sistema de aquisição de dados Digidata1440A 16-Channel Digitizer (Molecular Devices).

As correntes foram registradas de 12h a 96h após a injeção do cRNA, de acordo com a velocidade de expressão de cada canal. A equação para condutância de sódio (g_{Na}), de acordo com a Lei de Ohm, foi: $g_{Na} = I_{Na}/(V - V_{rev})$, onde I_{Na} é a amplitude das correntes de sódio a um dado potencial teste V , e V_{rev} é o potencial de reversão do íon Na^+ .

Os valores de g_{Na} foram plotados em função da voltagem e ajustados com a equação de Boltzmann: $g_{Na}/g_{max} = [1 + (\exp(V_g - V)/k)]^{-1}$, onde $g_{Máx}$ representa a

condutância máxima de Na^+ , V_g é a voltagem correspondente à metade da condutância máxima, e k é o fator de inclinação da curva.

Os eletrodos de voltagem e de corrente foram preenchidos com 3M KCl. As resistências dos eletrodos foram mantidas abaixo de $1\text{M}\Omega$. As correntes foram filtradas a 1kHz e amostradas a 20kHz utilizando um filtro passa-baixa de quatro polos Bessel. Para evitar a interferência de ruído, as correntes registradas foram subtraídas com TTX (tetrodotoxina). O TTX bloqueia os canais de Na^+ , de forma que pode-se remover as correntes capacitivas e resistivas do registro. Exceto as correntes do canal $r\text{Na}_v1.8$, todas as outras correntes tinham pelo menos $1\mu\text{A}$. Os canais resistentes à TTX $h\text{Na}_v1.5$ e $h\text{Na}_v1.8$ utilizados neste trabalho possuem mutação para aumentar a sensibilidade à TTX, sem que haja interferência na funcionalidade do canal (Laboratório de Eletrofisiologia, Departamento de Fisiologia, Johns Hopkins University, sob supervisão do Dr Frank Bosmans).

Diferentes protocolos foram utilizados para a realização dos registros de correntes, partindo de um potencial de repouso (*holding potential*) de -90 mV , com um intervalo de $0,2\text{ Hz}$. As correntes de sódio foram evocadas com uma despolarização a 100 ms até $V_{\text{máx}}$. A relação corrente-voltagem foi determinada por passos de despolarização de 50 ms entre -90 e 70 mV , com incrementos de $5-10\text{ mV}$.

Os registros eletrofisiológicos foram analisados utilizando CClampfit, versão 10.0 (Molecular Devices). As curvas gV foram plotadas com auxílio do software Origin8 (Originlab, ElkGrove Village, IL, USA). A significância das amostras normalizadas foi avaliada com o teste t de Student, com $p < 0,05$, sendo os valores apresentados relativos

à média \pm erro padrão da média. Foram realizados de 3 a 6 testes independentes por toxina em cada canal testado.

5.5.2. Ensaio Inseticida

Larvas de lepidóptera *Spodoptera frugiperda* (com aproximadamente 100 mg, entre 3º e 4º ínstars) foram expostas a diferentes concentrações do peptídeo Tf4, de *T. fasciolatus*. A injeção foi de 2 μ L, com seringa gengival, entre o último e o penúltimo par de pernas. Um injetor automático foi acoplado à seringa. A observação foi feita com 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 12, 16h, 20h, 24h, 36h e 48 horas após a injeção. O controle foi realizado com água. As larvas foram gentilmente cedidas pela Dr^a Maria Elita Castro, Embrapa, Cenargen.

6. Resultados e Discussão

6.1. Biblioteca transcritômica

O RNA extraído de 8 indivíduos foi analisado por eletroforese para identificar a qualidade da amostra (Agilent 2100 Bioanalyzer system). Os dados obtidos foram compatíveis com RNAs extraídos de outros escorpiões e aranhas, de forma que a banda 28S ribossomal, indicativa da boa qualidade de amostras de mamíferos, não ocorre ou ocorre com pouca intensidade nos aracnídeos testados até o momento por nosso grupo de pesquisa (Fig. 9). Uma escala que varia de 1 a 10, chamada RIN (*RNA Integrity Number*), foi calculada pelo software *Bioanalyser* após a corrida. O RIN calculado para o RNA de *Tityus fasciolatus* foi de 6,3. Como não existe valor de referência para esse organismo e o valor considerado adequado para mamíferos é acima de 7, consideramos a amostra de boa qualidade.

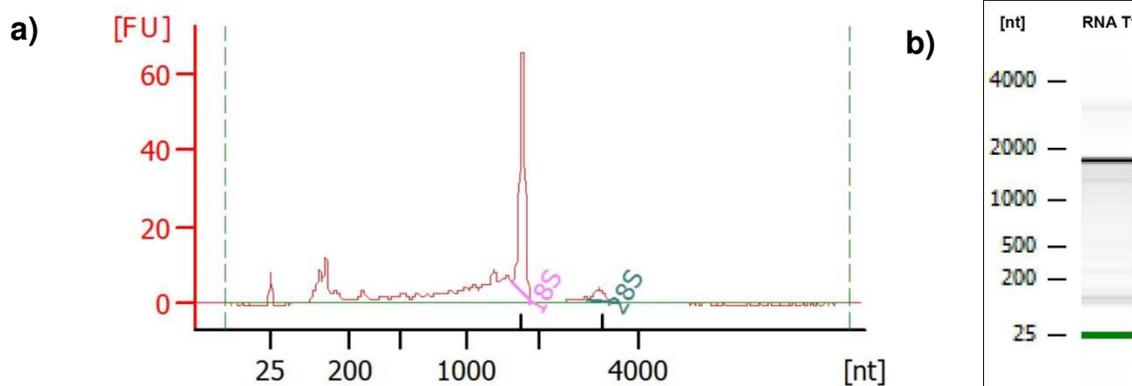


Figura 9. Representação gráfica da eletroforese da amostra de RNA de *T. fasciolatus* em Bioanalyser. a) Gráfico gerado pela migração das moléculas de RNA; b) Representação gráfica em bandas com a distribuição das moléculas de RNA (à direita) e o padrão de migração controle (à esquerda).

A amostra de RNA foi enviada para sequenciamento por RNA Seq, que consiste na identificação das bases nucleotídicas por síntese, realizada em triplicata. Nas três

rodadas de sequenciamento do Illumina, obteve-se 33.069.163, 32.754.391 e 22.358.238 de *reads*, respectivamente. Após o sequenciamento, os dados obtidos foram enviados à análise de bioinformática, gerando uma montagem de sequências nucleotídicas, e os dados foram agrupados em *contigs* (sequências não-únicas). A partir dessa montagem, foram encontrados 4.575, 4.744 e 3.505 *contigs*, que após um procedimento de remoção de redundância geraram 9.130 *contigs* únicos (Tabela 2). Dentre eles, 8.226 *contigs* não obtiveram similaridade com outras sequências depositadas em bancos de dados, sendo classificados pelo termo “no hits”. Essa quantidade provavelmente está relacionada à falta de um genoma de referência.

Posteriormente, os dados foram classificados de acordo com sua ontologia, por meio de Gene Ontology (GO), para identificar as funções prováveis dos RNAs sequenciados. A análise de GO foi realizada com os 9.130 *contigs*, e assinalou 1146 genes. A classificação das 18 funções mais frequentes pode ser observada na figura 10. O Gene Ontology permite a inferência de um domínio biológico específico que descreve um produto gênico (Ashburner et al., 2000). De uma maneira geral, as anotações de ontologia se baseiam na homologia, ou seja, a partir de um ancestral comum. A classificação por função permite uma avaliação global do transcrito, além disso, facilita as análises computacionais que lidam com essas informações. A função mais recorrente foi de “Inibidor de canal iônico” (Fig. 10).

Tabela 2. Tabela resumo da montagem da biblioteca transcritômica.

Total de sequências limpas	Round (1) 33.069.163, (2) 32.754.391, (3) 22.358.238
Total de <i>contigs</i>	9.130
Total de toxinas	278
Total de GOs assinalados	1146

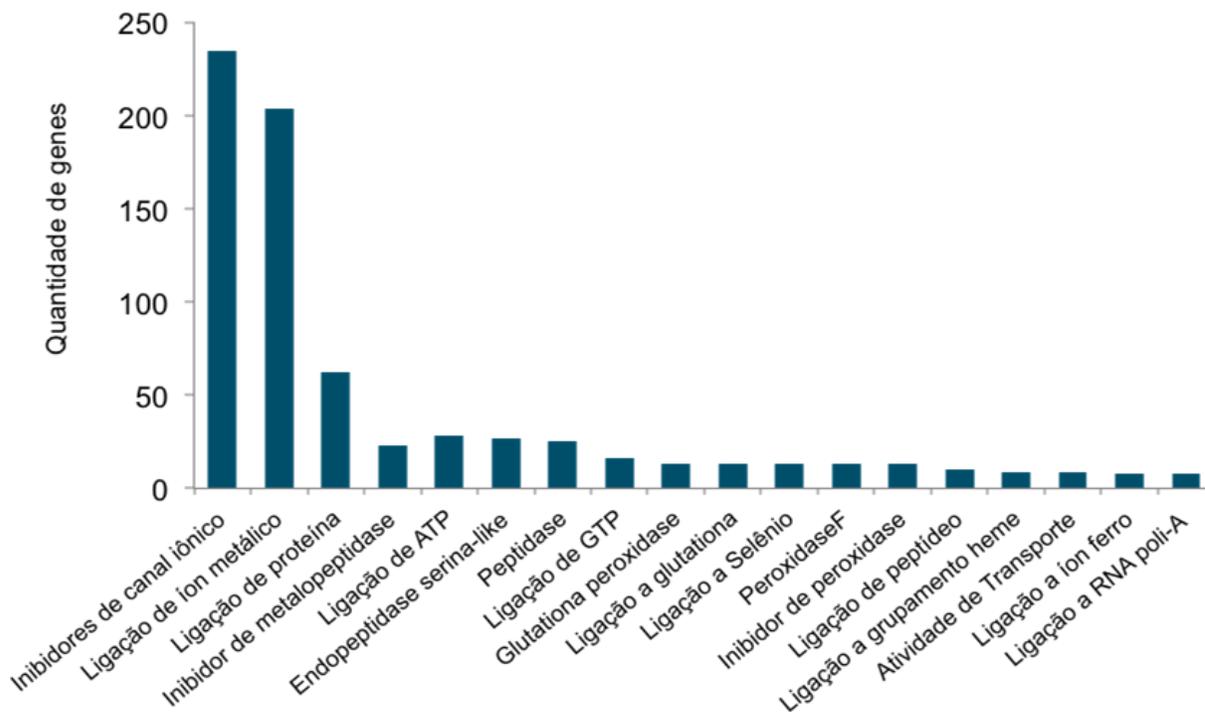


Figura 10. Gráfico representativo das 18 funções mais frequentes. Gene Ontology (GO) das 18 funções mais frequentes após submissão dos dados para análise de GO. As funções de “Inibidores de canal iônico” e “Ligação a íon metálico”, barras inferiores, correspondem às toxinas e aos ligantes de metais como magnésio e cálcio, e são relacionados a reguladores de DNA.

As sequências que codificam para toxinas foram agrupadas e analisadas separadamente. Verificou-se um total de 278 *contigs* que codificam para toxinas, sendo que 89% delas são toxinas com provável ação em canais de Na^+ e K^+ (Fig. 11), com uma menor porcentagem de toxinas putativas com ação de canais de Ca^{++} ou similares às Mu-theraphotoxinas, de aranhas, dentre outras. Na análise realizada, a toxina Tf2 foi codificada por 12 *contigs*, a Tf3 por 6 *contigs* e a Tf4 por 7 *contigs* (apresentadas no tópico seguinte). As sequências de toxinas de NaScTx, KTxS e outras toxinas é apresentada no Anexo I.

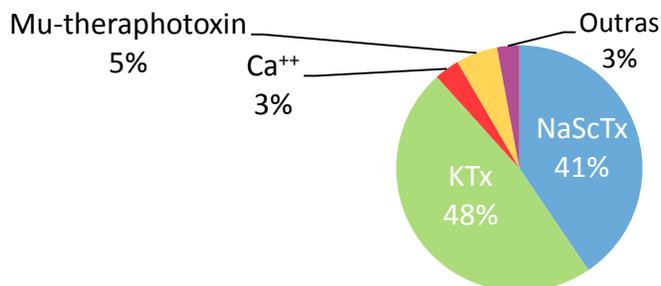


Figura 11. Gráfico de porcentagem das toxinas identificadas na biblioteca transcritômica.

Dentre os 278 transcritos com identidade com toxinas, 48% dos transcritos correspondem a toxinas que atuam em canais de potássio (KTxs), 41% correspondem a toxinas que atuam em canais de Na⁺ (NaScTxs), 5% são similares às Mu-theraphotoxinas, de aranha, e 3% correspondem a toxinas que atuam em canais de Ca⁺⁺.

Dentre os transcritos que codificam toxinas, 48% correspondem a KTxs, porém alguns *contigs* ocorreram em redundância. O *contig* 11 (Anexo I), por exemplo, possui 20 sequências que codificam para a mesma molécula, correspondente a uma KTx de alta massa molecular, provavelmente com massa molecular monoisotópica teórica de [M+H]⁺ igual a 7.323,74 Da (sendo observada uma massa molecular correspondente na peçonha de 7.323,4 Da no intervalo 48-60 min da Tabela 3), pertencente à família das β -KTxs. Essa família tem como representante a Escorpina, isolada de *Pandinus imperator* (Conde et al., 2000). As β -KTxs são moléculas com capacidade de interagir com canais iônicos e com membranas celulares, sendo consideradas como bloqueadoras de canal de K⁺ e citolíticas. O *contig* 4778 e 4765, com massas teóricas de [M+H]⁺ 3.983,93 Da e 4.426,17 Da, respectivamente, possuem cada um 12 sequências que codificam a mesma molécula, sendo ambos similares à α -KTx 4.5 (Diego-Garcia et al., 2005), bloqueadora de canal de K⁺, isolada de *T. costatus*. Entretanto, as massas moleculares teóricas não foram encontradas na análise de espectrometria de massa das frações cromatográficas da peçonha, apresentada na

Tabela 3. A ausência dessas massas moleculares ocorre possivelmente devido a processamentos sofridos pelas toxinas.

Diferentes NaScTxS foram identificadas na biblioteca, e suas sequências estão apresentadas no Anexo I. Desde os primeiros estudos de descrição das sequências nucleotídicas que codificam para as NaScTxS presentes nas peçonhas de escorpiões, observou-se que os precursores das toxinas eram maiores do que as toxinas purificadas da peçonha. As análises revelaram que esses precursores, além de possuírem uma região de peptídeo sinal de cerca de 20 resíduos de aminoácidos, geralmente possuíam alguns resíduos extras na região C-terminal. Estes seriam clivados enzimaticamente durante o processamento pós-traducional, o qual, também, poderia envolver a amidação dessa região (Becerril et al., 1993). Quando as sequências de toxinas terminam com uma glicina (G) seguida por resíduos básicos assume-se que a ação de uma carboxipeptidase remova esses aminoácidos, sinalizando para a amidação da porção C-terminal da toxina (Becerril et al., 1993). As três NaScTxS caracterizadas possuem o sinal de amidação em seus transcritos. Essa característica é importante para a atividade biológica de algumas toxinas, como Ts1 e CsslI (Coelho et al., 2014, Estrada et al., 2007).

A sequência de nucleotídeos que codifica a Tf2 contém 255 bases, incluindo o *stop* códon, e o peptídeo traduzido possui um peptídeo sinal de 20 resíduos de aminoácidos, peptídeo maduro de 62 resíduos de aminoácidos, e sinal de amidação do C-terminal GK (Fig. 12) (# EBI: LN606597). O alinhamento com precursores de outras β -NaScTxS de escorpiões do gênero *Tityus* com identidade superior a 70% é apresentado na figura 13.

1	ATG AAG AGA TTT CTT TTG TTT ATC AGC ATC TTG ATG ATG ATT GGA	45
1	M K R F L L F I S I L M M I G	15
46	ACT ATT GTG GTG GGA AAG GAA GGC TAT GCC ATG GAT CAC GAA GGA	90
16	T I V V G <u>K E G Y A M D H E G</u>	30
91	TGC AAA TTT AGT TGT TTC ATA AGA CCA TCA GGC TTT TGT GAT GGT	135
31	<u>C K F S C F I R P S G F C D G</u>	45
136	TAC TGC AAA ACA CAT TTG AAG GCA AGT TCA GGC TAT TGC GCT TGG	180
46	<u>Y C K T H L K A S S G Y C A W</u>	60
181	CCA GCC TGT TAC TGC TAC GGG GTC CCA TCT AAT ATA AAA GTT TGG	225
61	<u>P A C Y C Y G V P S N I K V W</u>	75
226	GAC TAT GCC ACA AAT AAA TGT GGC AAA TAA	255
76	<u>D Y A T N K C G K *</u>	85

Figura 12. Sequência precursora da toxina Tf2 obtida pela biblioteca transcritômica.

Estão apresentadas as sequências nucleotídica (superior) e de aminoácidos (inferior). Em negrito está o peptídeo sinal; o sublinhado marca o peptídeo maduro; em itálico está a sinalização de amidação.

Tst1	MKGMILFISCLLLIDIVVGGKEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECTLK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCGKK	% Id
Tb1	MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLMDEGCKLSCFIRPSGYCGSECKIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCGKK	70
Ts1	MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLMDEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCGKK	71
Tf2	MKRFLLFISILMMIGTIVVGGKEGYAMDHEGCKFSCFIRPSGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVWDYATNKCGK-	70
To12	MKGLILFICGFMIGVI-LAKEGYPMDEGCKFSCFIRPSGFCERYCKTHLSASTGYCAWPACYCYGVANQKVWDYNNKCGK-	100
	** ::***. :::* : **** *****:*****:* * : ..*:*****:* **** .*****	78

Figura 13. Alinhamento do precursor da Tf2 e de precursores de β -NaScTxS de

escorpiões do gênero *Tityus*. Siglas e numeração UNIPROT: Tf2, *Tityus fasciolatus*; To12: *Tityus obscurus* (H1ZZI1); Tb1: *T. bahiensis* (P56611); Tst1: *T. stigmurus* (P56612); Ts1: *Tityus serrulatus* (P15226). % Id: porcentagem de identidade; (*) : aminoácido idêntico; (:): substituição conservativa; (.): substituição semi-conservativa.

O *contig* que codifica a Tf3 contém 261 bases, incluindo o *stop* códon, e o peptídeo traduzido possui um peptídeo sinal de 19 resíduos de aminoácidos, peptídeo maduro de 64 resíduos de aminoácidos, e sinal de amidação do C-terminal GKK (Fig.

14). O alinhamento com outros precursores de α -NaScTxS mostra que a a Tf3 é idêntica à TbTx5 (Fig. 15).

1	ATG AAT GAC TTC GTT TTC TTG GTC GTC GCA TGC TTA TTG ACT GCG	45
1	M N D F V F L V V A C L L T A	15
46	GGT ACG GAG GGC AAG AAA GAC GGA TAT CCG GTG GAA GGC GAC AAC	90
16	G T E G <u>K K D G Y P V E G D N</u>	30
91	TGC GCC TTC GTT TGC TTC GGC TAC GAC AAC GCT TAC TGC GAT AAG	135
31	<u>C A F V C F G Y D N A Y C D K</u>	45
136	CTG TGC AAG GAC AAG AAA GCC GAC AGC GGG TAT TGT TAC TGG GTT	180
46	<u>L C K D K K A D S G Y C Y W V</u>	60
181	CAC ATC CTC TGC TAC TGC TAC GGG CTT CCC GAC AAG GAG CCG ACC	225
61	<u>H I L C Y C Y G L P D K E P T</u>	75
226	AAG ACC AAC GGA AGA TGC AAA CCG GGT AAG AAG TGA	261
76	<u>K T N G R C K P G K K *</u>	87

Figura 14. Sequência precursora da toxina Tf3, obtida pela biblioteca transcritômica. Estão apresentadas as sequências nucleotídica (superior) e de aminoácidos (inferior). Em negrito está o peptídeo sinal; o sublinhado marca o peptídeo maduro; em itálico está a sinalização de amidação.

		% Id
To10	MNYSTLIIVASLLTAGTESKKGYPV-EGSCAFPC-GYD [~] NA [~] YCD [~] KLCKERKADSGYCYWV [~] NILCYCYGLPD [~] NAAIKGYGRCKPGKK	75
TdNa8	MNYLTLIAAASLLTAGTESKKGYPVKEGDCAFPC-GYD [~] NA [~] YCD [~] KLCKERKADSGYCYWGNILCYCYGLPD [~] KAAIKGYGRCPGKK	72
To9	MNYSTLIIVASLLTAGTESKKGYPVKEGDCAFPC-GYD [~] NE [~] YCD [~] KLCKERKADSGYCYWGNILCYCYGLPD [~] KAAIKGYGRCPGKK	72
Tpa4	MNYFVLIIVACLLTAGTESKKGYPLEYDNCA [~] YDCLGYDN [~] KKCD [~] KLCKDKKADSGYCYWAHILCYCYGLPD [~] NEPIKTSGRCPGKK	80
Tf3	MNDFVFLVVA [~] CLL [~] TAGTEGKKGYPVEGD [~] NC [~] AFVCFGYD [~] NA [~] YCD [~] KLCKDKKADSGYCYWV [~] HILCYCYGLPD [~] KEPTKTNGRCKPGKK	100
TbTx5	MNDFVFLVVA [~] CLL [~] TAGTEGKKGYPVEGD [~] NC [~] AFVCFGYD [~] NA [~] YCD [~] KLCKDKKADSGYCYWV [~] HILCYCYGLPD [~] KEPTKTNGRCKPGKK	100
Toxin-5	-----LVVVCLLTAGTEGKKGYPVEYDNCA [~] YICWNYD [~] NA [~] YCD [~] KLCKDKKADSGYCYWV [~] HILCYCYGLPD [~] SEPTKTNGKCKSGKK	89
	:...*****.*****: .**:* * ** * *****:***** .*****. * **:* **	

Figura 15. Alinhamento do precursor da Tf3 com outros precursores do gênero *Tityus*. Siglas e numeração UNIPROT: Tf3: *T. fasciolatus*; TbTx5: *T. bahiensis* (P0C5K8); Toxin-5: *T. serrulatus* (P01496); Tpa4: *T. pachyurus* (H1ZZI5); To10: *T. Obscurus* (H1ZZH9); TdNa8: *T. discrepans* (C9X4K6); To9: *T. obscurus* (H1ZZH8). % Id: porcentagem de identidade; (*): aminoácido idêntico; (:): substituição conservativa; (.): substituição semi-conservativa.

A toxina Tf4 é codificada por 255 nucleotídeos, incluindo o stop códon, com um peptídeo sinal de 19 resíduos de aminoácidos, peptídeo maduro de 62 resíduos de

aminoácidos, e sinal de amidação do C-terminal GK (Fig. 16). O alinhamento com outros precursores do gênero *Tityus* é apresentado na figura 17.

1	ATG AAA CGA ATG ATC TTG TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GAC	45
1	M K R M I L F I S C L L L I	15
46	ATT GTC GTA GGA GGC AAA GAA GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAA GGT	90
16	I V V G G K E G Y P A D S K G	30
91	TGC AAA GTT ACT TGT TTT TTT ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA	135
31	<u>C K V T C F F T G V G Y C D T</u>	45
136	GAA TGC AAA CTG AAA AAG GCA TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG	180
46	<u>E C K L K K A S S G Y C A W P</u>	60
181	GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA GAT TCA GCG TCA GTT TGG GAC	225
61	<u>A C Y C Y G L P D S A S V W D</u>	75
226	AGT GCT ACG AAT AAA TGT GGC AAA AAA TAA	255
76	<u>S A T N K C G K K *</u>	85

Figura 16. Sequência precursora da toxina Tf4 obtida pela biblioteca transcritômica. Estão apresentadas as sequências nucleotídica (superior) e de aminoácidos (inferior). Em negrito está assinalado o peptídeo sinal; o sublinhado corresponde ao peptídeo maduro; em itálico está assinalado o sinal de amidação.

Tst1	MKGMILFISCLLLIDIVVGGKEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRA TN KCGKK	% Id	76
Tb1	MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGSECKIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRA TN KCGKK		73
Ts1	MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRA TN KCGKK		71
Ts4	MKRMILFISCLLLIDIVVGGREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNT E CLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSE TN KCGKK		85
Tf4	MKRMILFISCLLLIDIVVGGKEGYPADSKGCKVTCFFTGVCDE T CLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSAT N KCGKK		100
TcoNTxP1	MKRMILFTSCLLLIDIVVGGKEGYPADSKGCKVTCFLTAAGYCNT E CLQKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSAT N KCGKK		93
	** **** * :*** * :****:***: *** ** :*:*****: ..:* *****		

Figura 17. Alinhamento do precursor da Tf4 com outros precursores de NaScTx do gênero *Tityus*. Siglas e numeração UNIPROT: Tf4: *T. fasciolatus*; TcoNTxP1: *T. costatus* (Q5G8A8), Ts4: *T. serrulatus* (O77463); Tst1: *T. stigmurus* (P56612); Tb1: *T. bahiensis* (P56611); Ts1: *T. serrulatus* (P15226). % Id: porcentagem de identidade; (*): aminoácido idêntico; (:): substituição conservativa; (.): substituição semi-conservativa.

As toxinas de escorpiões, ainda que possuam diferentes funções, podem apresentar um ancestral comum. Os dados das descrições de estruturas primárias e

terciárias dos peptídeos de peçonhas de escorpiões, assim como das sequências gênicas demonstram essa origem. Isso se deve aos diferentes eventos genéticos que ocorreram ao longo da evolução, como por exemplo, o polimorfismo, a duplicação, *trans-splicings* ou *splicing* alternativo (Zhijian et al., 2006).

Os alinhamentos das figuras 13, 15 e 17 demonstram a similaridade entre os precursores das toxinas de *T. fasciolatus* e outros escorpiões da família Buthidae. A homologia dentre os escorpiões do gênero *Tityus* já foi descrita (Possani et al., 1999), sendo comum a identificação de componentes similares em sequência e função (Batista et al., 2007). Porém, a revisão de Zhijian et. al, 2006 chama a atenção para o caso onde os genes homólogos são apenas variações alélicas da mesma espécie, e não parálogos propriamente ditos. A variação encontrada por Guimarães 2009, com a Tf4a, pode ser um exemplo dessa variação alélica, quando faz-se a comparação com a Tf4, ou seja, uma isoforma.

6.2. Sondagem dos componentes peptídicos

A purificação de 1 mg de peçonha de *T. fasciolatus*, resultou no perfil cromatográfico observado na figura 18. Cerca de 75 frações foram coletadas manualmente e aquelas assinaladas com os nomes Tf2, Tf3, Tf4 e fração 63 foram acumuladas para posterior purificação, identificação dos seus compostos mais representativos e análise da atividade biológica em canais de Na⁺. Após a identificação de suas sequências de resíduos de aminoácidos, pode-se agrupá-las sistematicamente, de acordo com (Guerrero-Vargas et al., 2012), sendo chamadas de NaTx5.6, NaTx3.11 e NaTx4.4 (Tf2, Tf3 e Tf4, respectivamente), uma classificação e nomenclatura proposta para toxinas descritas do grupo *Tityus*. Para o presente trabalho, utilizaremos a nomenclatura comum, Tf2, Tf3 e Tf4, seguindo a mais usual de acordo com a similaridade com outras toxinas depositadas em bancos de dados, como o UNIPROT (Tf: *Tityus fasciolatus*).

Todas as frações cromatográficas foram analisadas em MALDI/TOF-MS (Tabela 3), a fim de identificar as massas moleculares eluentes ao longo da cromatografia, e dessa forma selecionar os compostos de interesse na análise de atividade biológica, as prováveis NaScTx. As frações coletadas entre 37 e 41% de acetonitrila possuem massa molecular entre 6.000 e 7.800 Da, o que possibilitou uma inferência sobre sua classificação como NaScTx, que em média, apresentam essa faixa de massa molecular. A tabela 3 apresenta o intervalo de tempo de eluição e as massas moleculares identificadas. No total, foram identificadas 212 diferentes componentes, que foram agrupados por intervalo de tempo para excluir repetições de massas moleculares de frações consecutivas. Os componentes identificados variaram entre

830 e 11.500 Da. As massas moleculares médias das toxinas Tf2 (6.954,0 Da), Tf3 (7.921,1 Da) e Tf4 (6.612,0 Da) estão assinaladas em negrito na Tabela 3.

A diversidade de compostos identificados por análises proteômicas da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* pode ser corroborada com diversos trabalhos. O de *T. cambridgei* (*T. obscurus*) identificou pelo menos 102 diferentes componentes por MALDI/TOF-MS e ESI-MS (Batista et al., 2004); *T. pachyurus*, com 104 compostos por ESI-MS (Barona et al., 2006); *T. costatus*, com 90 massas moleculares por ESI-MS (Diego-Garcia et al., 2005); e *T. stigmurus* com 100 diferentes componentes por ESI-MS (Batista et al., 2007). A identificação do perfil de massas moleculares a partir das frações cromatográficas é uma maneira rápida e confiável para identificar peptídeos em meio a uma peçonha complexa.

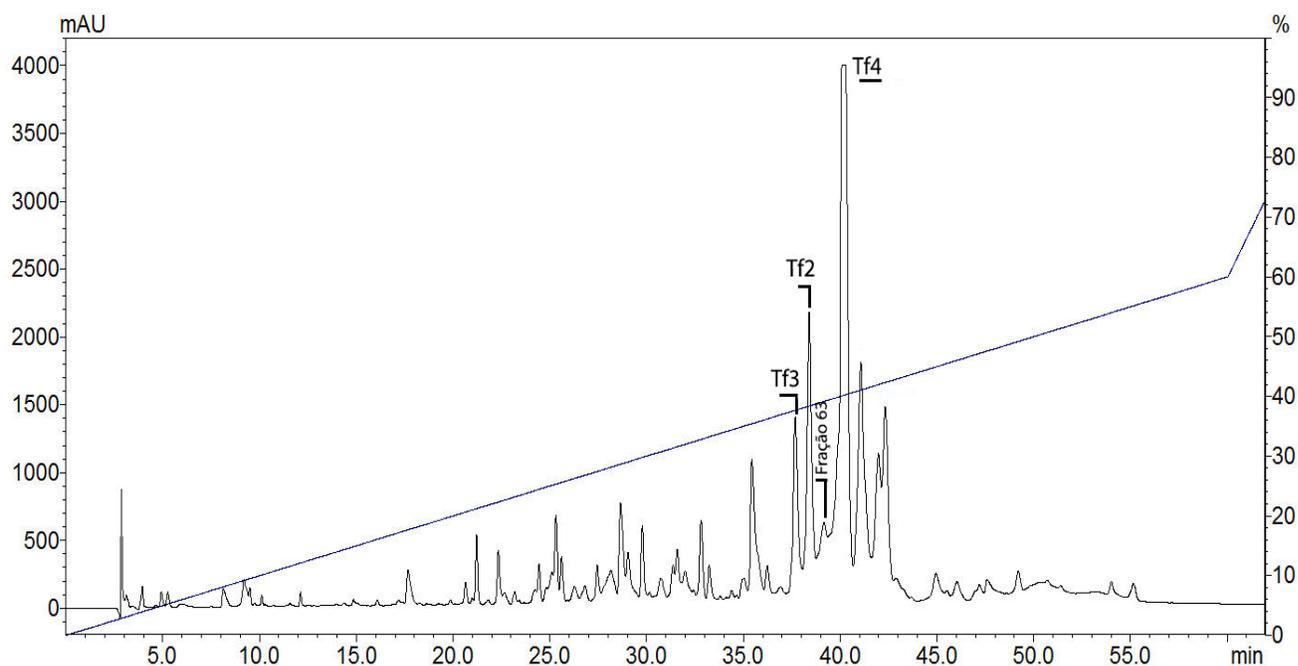


Figura 18. Perfil cromatográfico de 1mg de peçonha de *Tityus fasciolatus*. Cromatografia de 1mg de peçonha de *T. fasciolatus*, em coluna C18 analítica, em um gradiente de 0 a 60% de solvente B em 60 minutos. As toxinas caracterizadas estão assinaladas com seus respectivos nomes.

Tabela 3. Massas moleculares das frações cromatográficas da peçonha de *T. fasciolatus*. As frações cromatográficas, coletadas manualmente, foram submetidas à espectrometria de massa em MALDI/TOF-MS (modo refletido positivo <4.000 Da, e modo linear positivo >4.000 a 11.500 Da), para identificar as massas moleculares das respectivas frações. Os dados foram agrupados em intervalos de tempo para evitar repetições de massas moleculares que eluem em frações consecutivas. Em negrito estão as massas moleculares médias das toxinas caracterizadas.

RT	[M+H] ⁺	RT (min)	[M+H] ⁺	RT (min)	[M+H] ⁺	RT	[M+H] ⁺	RT	[M+H] ⁺
0-20	2.102,7		5.066,2		5.119,5		5.364,6		1.209,6
	2.298,4	26-28	5.081,5	29-31	5.128,0	32-35	5.458,6	41-47	1.379,8
	2.383,3	(contin.)	5.458,3	(cont.)	5.141,6	(cont.)	5.633,8	(cont.)	1.415,8
	3.032,5		6.593,1		5.198,8		5.680,7		1.488,9
	4.884,3		7.665,8		5.290,0		5.721,3		1.828,2
			8.585,6		5.364,6		5.757,4		2.028,3
21-25	1.149,6		8.745,9		5.371,3		5.896,1		2.440,6
	1.618,7		9.084,5		5.430,4		6.447,9		3.088,2
	2.298,4		9.671,4		5.459,2		6.787,5		3.142,7
	3.040,6		14.833,4		5.496,5		7.054,4		3.475,6
	3.470,6				5.507,0		7.083,0		3.970,0
	3.572,3	29-31	901,7		5.562,7		7.200,5		4.004,5
	4.116,0		1.040,6		5.578,2		7.330,7		4.042,0
	4.182,1		1.185,7		5.640,6		7.458,8		4.240,0
	4.215,4		1.192,7		5.650,9		11.268,1		4.756,7
	4.717,7		1.267,7		5.729,6				5.541,3
	4.920,9		1.384,6		5.868,5	36-40	927,0		6.921,0
	5.067,5		1.572,9		5.903,6		1.576,9		7.070,0
	5.229,1		1.797,0		6.031,8		1.656,1		7.136,3
	5.391,2		1.854,1		6.226,7		1.735,2		7.343,0
	5.405,0		1.962,2		6.425,7		1.863,3		7.501,0
	5.458,6		1.997,9		6.761,7		2.065,0		7.647,0
	5.553,2		2.033,1		7.635,4		2.482,3		7.779,0
	7.610,4		2.118,1		9.137,6		2.730,2		7.941,0
			2.189,0		9.638,3		3.499,1		8.011,1
26-28	833,0		2.798,6				4.130,4		8.088,0
	975,8		3.205,7	32-35	991,7		4.150,0		
	1.066,1		3.998,6		1.425,9		5.487,0	48-60	1.262,5
	1.888,5		4.054,2		1.480,0		5.499,1		1.471,8
	3.761,3		4.073,9		1.942,2		5.683,0		1.733,1
	3.965,3		4.123,4		2.091,0		6.058,2		1.749,1
	4.042,2		4.220,4		2.677,6		6.612,0		1.761,1
	4.100,0		4.356,9		2.748,1		6.630,0		2.344,9
	4.129,2		4.390,7		3.161,7		6.837,0		2.756,3
	4.292,0		4.505,0		3.345,4		6.853,4		5.506,7
	4.340,5		4.553,3		4.100,2		6.899,0		5.639,5
	4.368,5		4.562,8		4.291,2		6.954,0		5.721,1
	4.382,3		4.687,3		4.515,8		6.969,6		6.639,6
	4.519,0		4.725,2		4.529,5		7.110,0		6.732,0
	4.568,1		4.820,2		4.661,7		7.291,1		6.748,2
	4.742,1		4.872,0		4.848,9		7.457,6		6.841,0
	4.779,8		4.924,5		5.141,6				7.323,4
	4.820,0		4.957,5		5.212,2	41-47	823,6		7.675,5
	4.850,8		5.075,5		5.261,6		893,2		

6.3. Recromatografias, espectrometria de massa e sequências de resíduos de aminoácidos

Para obtenção das NaScTxS de forma isolada, foram realizados diferentes passos de cromatografia, com o gradiente de acetonitrila mais lento e com temperatura de 45°C. Por serem muito similares e apresentarem polaridades bastante próximas entre si, as NaScTx são difíceis de ser purificadas. A pureza da toxina influencia diretamente na qualidade dos ensaios fisiológicos. Em caso de co-eluição de compostos, pode-se obter efeitos ambíguos, pois algumas toxinas atuam em escala nanomolar, bastando uma pequena quantidade para atuar no seu alvo molecular. Por agirem em diferentes sítios de ação, α e β -NaScTxS que co-eluem podem dar uma primeira impressão de que uma molécula apresenta novas funções.

✓ Tf2

A Tf2 eluiu a 38,5% de acetonitrila (Fig. 19). Em seguida, foram realizados três passos de purificação adicionais, com diferentes gradientes de acetonitrila para a obtenção da toxina purificada, com pureza superior à 97%, de acordo com a área abaixo da curva do gráfico da cromatografia (Figura 19 a-c).

A amidação foi inferida pela similaridade com toxinas previamente descritas na literatura e confirmada por meio de micrOTOF-QII, que identifica a massa molecular de compostos com alta resolução. A amidação implica na perda de 0,98 Da, correspondente à inserção de um NH_2 no lugar de uma OH no grupo carboxi-terminal. Levando em consideração a formação de quatro ligações dissulfeto (por similaridade), sua massa molecular teórica monoisotópica é de $[\text{M}+\text{H}]^+$ 6.950,0302 Da e a massa molecular experimental monoisotópica é de $[\text{M}+\text{H}]^+$ 6.949,9350 Da (ou $[\text{M} + 7\text{H}]^{7+} =$

993,7050) (Fig. 19 d). O erro calculado entre a massa molecular teórica e experimental, utilizando o quinto isótopo da série, foi de 0,6 ppm.

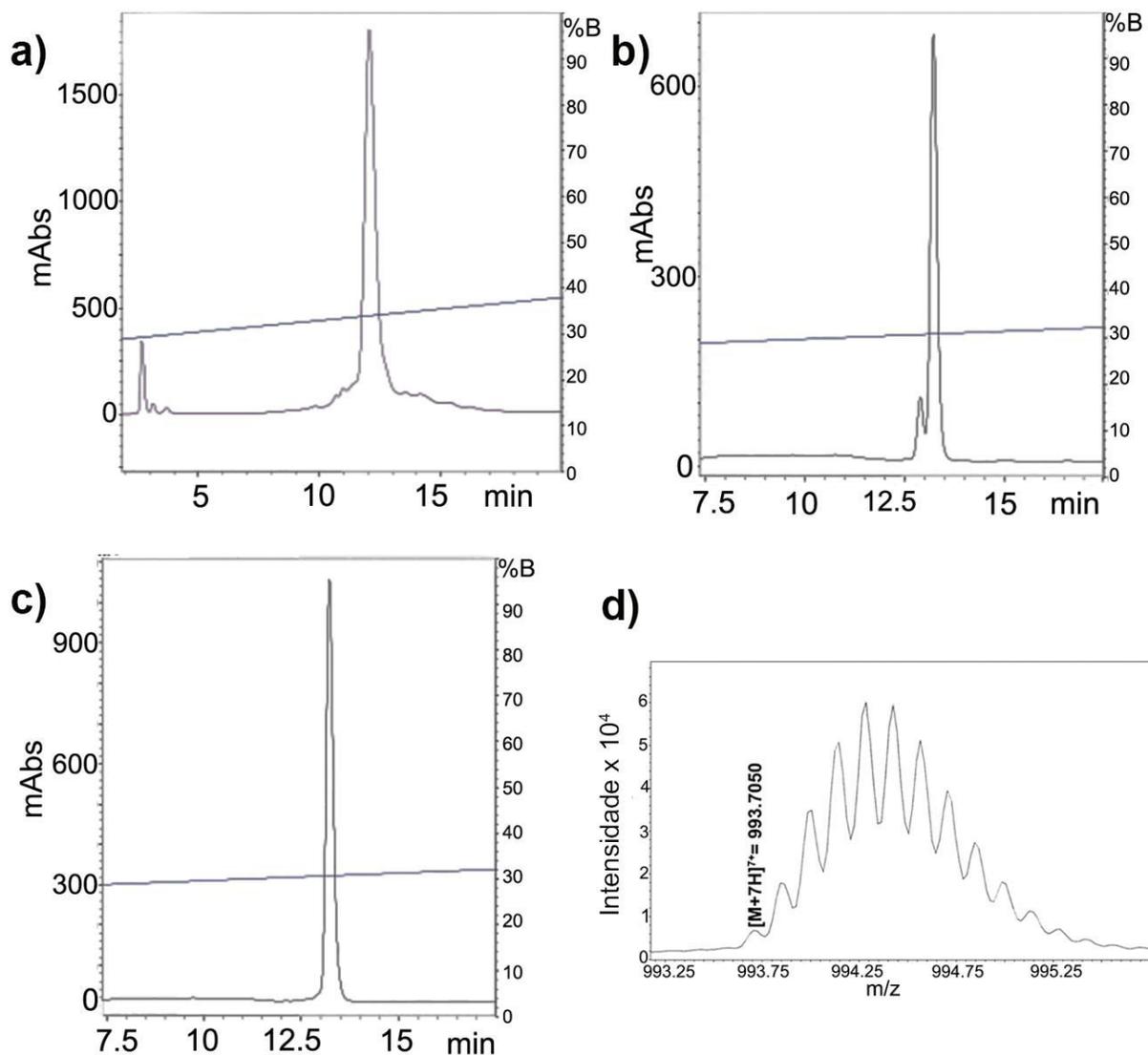


Figura 19. Recromatografias da toxina Tf2 e massa molecular. Para a purificação da toxina, foram realizados três passos distintos. Em a) foi realizada uma cromatografia com gradiente linear de 0,5% de acetonitrila por minuto, a temperatura ambiente. Em b) o gradiente foi de 0,33% de B por minuto, à 45°C. Em c) O gradiente foi de 0,25% por minuto, a 45°C. Em d) observa-se a resolução monoisotópica da molécula Tf2, com 7 cargas, obtida por micrOTOF-QII.

A sequência de resíduos de aminoácidos que compõe a Tf2 foi parcialmente identificada por degradação de Edman e por sequenciamento por ISD (*In Source Decay*) (Fig. 20). Posteriormente, a sequência foi ratificada pela obtenção do precursor pela biblioteca transcritômica, onde o peptídeo sinal e o sinal de amidação também foram identificados (Fig. 12).



Figura 20. Sequência completa da toxina Tf2. Metodologias utilizadas na identificação da sequência da toxina Tf2. Sequenciamento dos 15 primeiros resíduos de aminoácidos por Edman; do 9 ao 37 por *In Source Decay* (espectrometria de massa); a partir do 24 até o 62 foi corroborado com uma das primeiras sequências obtida pela biblioteca transcritômica.

✓ Tf3

A toxina Tf3 foi coletada a 37,6% de acetonitrila e foram necessários dois passos extras para sua purificação, ambos a 45°C (Fig. 21). A massa molecular foi obtida por micrOTOF-QII, sendo confirmada a amidação por espectrometria de massa e sequência do precursor. Sua massa molecular monoisotópica teórica, levando em consideração quatro ligações dissulfeto e uma amidação no C-terminal, é de $[M+H]^+$ 7.289,2880 Da e a massa molecular experimental monoisotópica é $[M+H]^+$ 7.289,0794 Da (ou $[M+7H]^{7+} = 1.042,1542$ Da) (Fig. 21). O erro calculado entre a massa molecular teórica e experimental, utilizando o quinto isótopo da série, foi de 0,5 ppm.

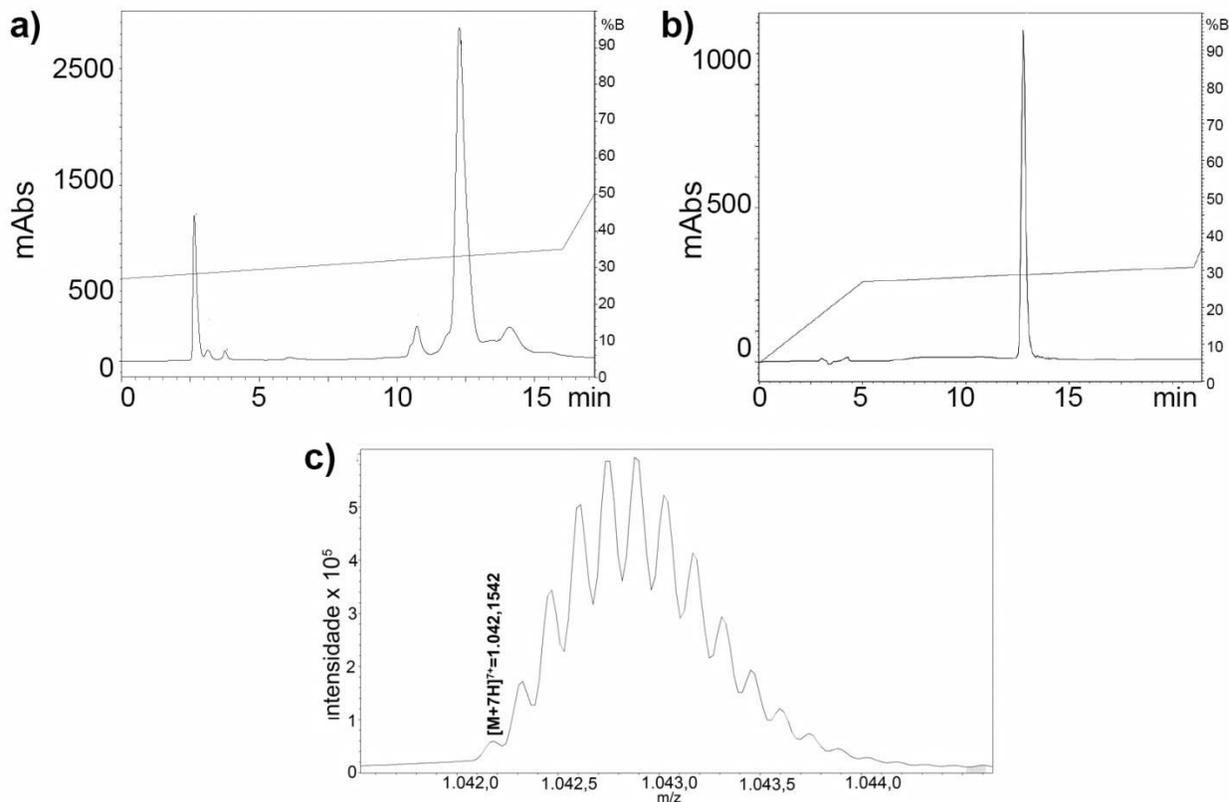


Figura 21. Recromatografias da toxina Tf3 e massa molecular. A purificação da Tf3 ocorreu em dois passos posteriores à cromatografia, ambos a 45°C. a) O gradiente foi de 0,5% de acetonitrila por minuto; em b) o gradiente foi de 0,25% por minuto. c) Resolução monoisotópica da molécula Tf3, com 7 cargas, obtida por micrOTOF-QII.

✓ Tf4

A toxina Tf4 foi coletada a 40% de acetonitrila, sendo a toxina com maior absorvância na cromatografia, e a mais abundante de acordo com a área abaixo da curva a 280nm. Foram necessários dois passos de recromatografia para purificação da toxina, onde apenas o segundo passo foi realizado a 45°C (Fig. 22a e 22b). Sua massa molecular monoisotópica teórica é de $[M+H]^+$ 6.610,8914 Da e a massa molecular experimental média é de $[M+H]^+$ 6.612 Da (Fig. 22c). A Tf4 foi a primeira toxina descrita de *T. fasciolatus* Wagner et al., 2003).

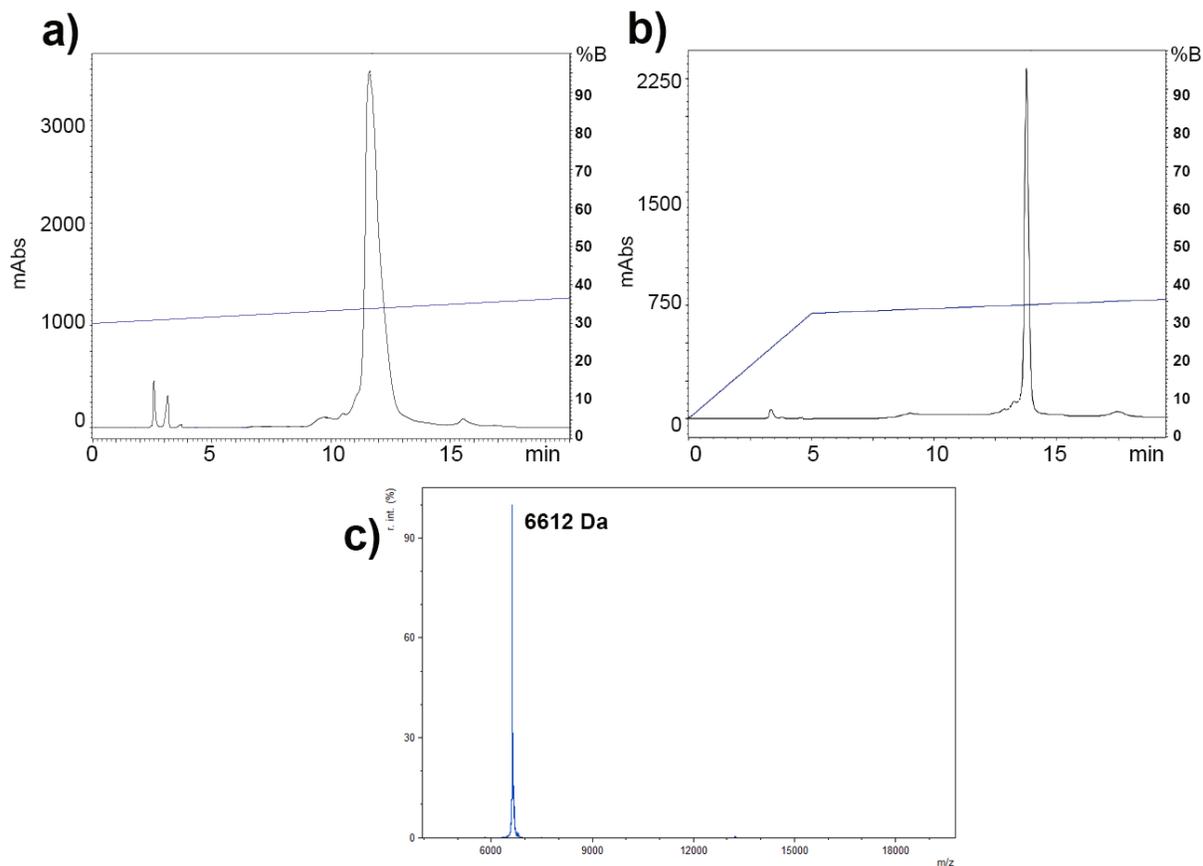


Figura 22. Recromatografias da toxina Tf4. A obtenção da toxina Tf4 foi realizada em dois passos. Em A) o gradiente de acetonitrila foi de 0,5% de B, à temperatura ambiente; em B) o gradiente foi de 0,25% de B, a 45 °C. c) Massa molecular média da molécula Tf4, obtida MALDI/TOF-MS.

✓ Fração 63

A fração 63 contém, majoritariamente, um peptídeo de massa molecular média 6.853 Da, encontrado apenas na análise proteômica. As toxinas identificadas pela biblioteca não possuem massa molecular similar. Um fragmento de 20 resíduos de aminoácidos (Fig.23), identificado por ISD, sugere que esta toxina tem sequência similar à Tf4. Por eluírem ao lado uma da outra, é esperado que possuam características hidrofóbicas semelhantes, o que justificou a utilização dessa fração para o ensaio em canais Na_v . Moléculas como as NaScTx, que possuem mais de 60

resíduos de aminoácidos e ligações dissulfeto, geralmente necessitam ser digeridas para terem suas sequências de resíduos de aminoácidos identificadas. A diminuta quantidade de material na fração 63 não permitiu a identificação completa do peptídeo majoritário.

```
Tf4      GKEGYPADSKGCKVTCFFTGVGYCDTECKLKKASSGYCAWPACYGLPDSASVWDSATNKC
Fração 63 -----GCKITCFFTGVGYCDEECEI-----
          ***:***** **:
```

Figura 23. Alinhamento de fragmento da fração 63. Alinhamento entre um fragmento de 20 resíduos de aminoácidos identificados na fração 63 e a Tf4, mostram a similaridade entre as duas sequências no trecho. (*): resíduos idênticos; (:): Substituição conservativa

6.4. Atividade Biológica

As toxinas purificadas e a fração 63 foram submetidas a um *screening* para identificar suas atividades sobre canais de Na⁺. Todas foram testadas no sistema de *Voltage clamp* de dois eletrodos (TEVC), em um sistema de expressão heteróloga em oócitos de *Xenopus laevis*. Os canais expressos foram os hNav1.1 a 1.7, e rNav1.8. O erro padrão está identificado como barras nas figuras 24, 25, 26 e 27, e um teste-t foi realizado, sendo considerado $p < 0,05$. Além disso, a toxina Tf4 foi testada em larvas de *Spodoptera frugiperda*.

A atividade da toxina Tf2 sobre as oito isoformas de canais de Na_v de mamíferos revela que a 1 μM, a toxina não influencia as correntes dos canais Na_v1.1-1.2, 1.4-1.8 (Fig. 23). No entanto, a ativação do canal hNa_v1.3 é dramaticamente influenciada. A 1 μM, a toxina muda a dependência de ativação em ~16 mV ($V_{1/2}$ de $-33,1 \pm 0,2$ mV para $-49,3 \pm 0,5$ mV; slopes $3,4 \pm 0,2$ e $8,9 \pm 0,5$), enquanto a inativação rápida não é afetada.

O efeito observado pela aplicação de 1 μM da Tf2 em hNa_v1.3, promovendo a abertura do canal em potencial mais negativo, se assemelha ao efeito evocado pela Ts2 (Cologna et al, 2012). No entanto, a Ts2 aparentemente promove uma ação de retardamento no fechamento do canal (efeito de α-NaScTx), mas não apenas em hNa_v1.3, mas também em outras isoformas do canal. Sendo assim, a atividade da Tf2 aparenta ser única dentre as β-NaScTxs e pode ser valiosa para futuras pesquisas com hNa_v1.3.

As β-NaScTxs são reconhecidas como toxinas que se ligam ao sítio 4 dos canais de sódio (Stevens et al., 2011), provocando uma ativação dos canais em

potenciais mais negativos. A Tf2 é a primeira toxina de escorpião do tipo β , descrita da peçonha de *T. fasciolatus*. Diferentemente de outras β -NaScTxS relacionadas (Pinheiro et al., 2003, Saucedo et al., 2012, Cologna et al., 2009, Sampaio et al., 1991, Cohen et al., 2005), a Tf2 preferencialmente potencializa a abertura do canal hNa_v1.3, resultando em uma mudança dramática na voltagem de ativação. Como resultado, a aplicação de 1 μ M de Tf2 em hNa_v1.3 pode promover a abertura do canal em voltagens de repouso, efeito que pode ser prejudicial para o organismo envenenado.

As β -NaScTxS interagem principalmente com o motivo S3B-S4 no interior do sensor de voltagem, do domínio II em canais Na_v (Campos et al., 2007, Cestele et al., 1998). Esta região difere em dois resíduos de aminoácidos entre hNa_v1.3 e as outras duas isoformas do sistema nervoso central hNa_v1.1 e 1.2 (F/A, em hNa_v1.1-2 e E/S em hNa_v1.3), o que pode contribuir para um aumento da suscetibilidade de hNa_v1.3 à Tf2. Apesar dos motivos estruturais do domínio I serem idênticos nessas três isoformas neuronais dos canais de Na_v, regiões similares nos sensores de voltagem dos domínios III e IV podem também contribuir para a atividade da toxina. Os resíduos de aminoácido de outras regiões do canal Na_v também podem contribuir para a sensibilidade à toxina (Song et al., 2011, Zhang et al., 2011).

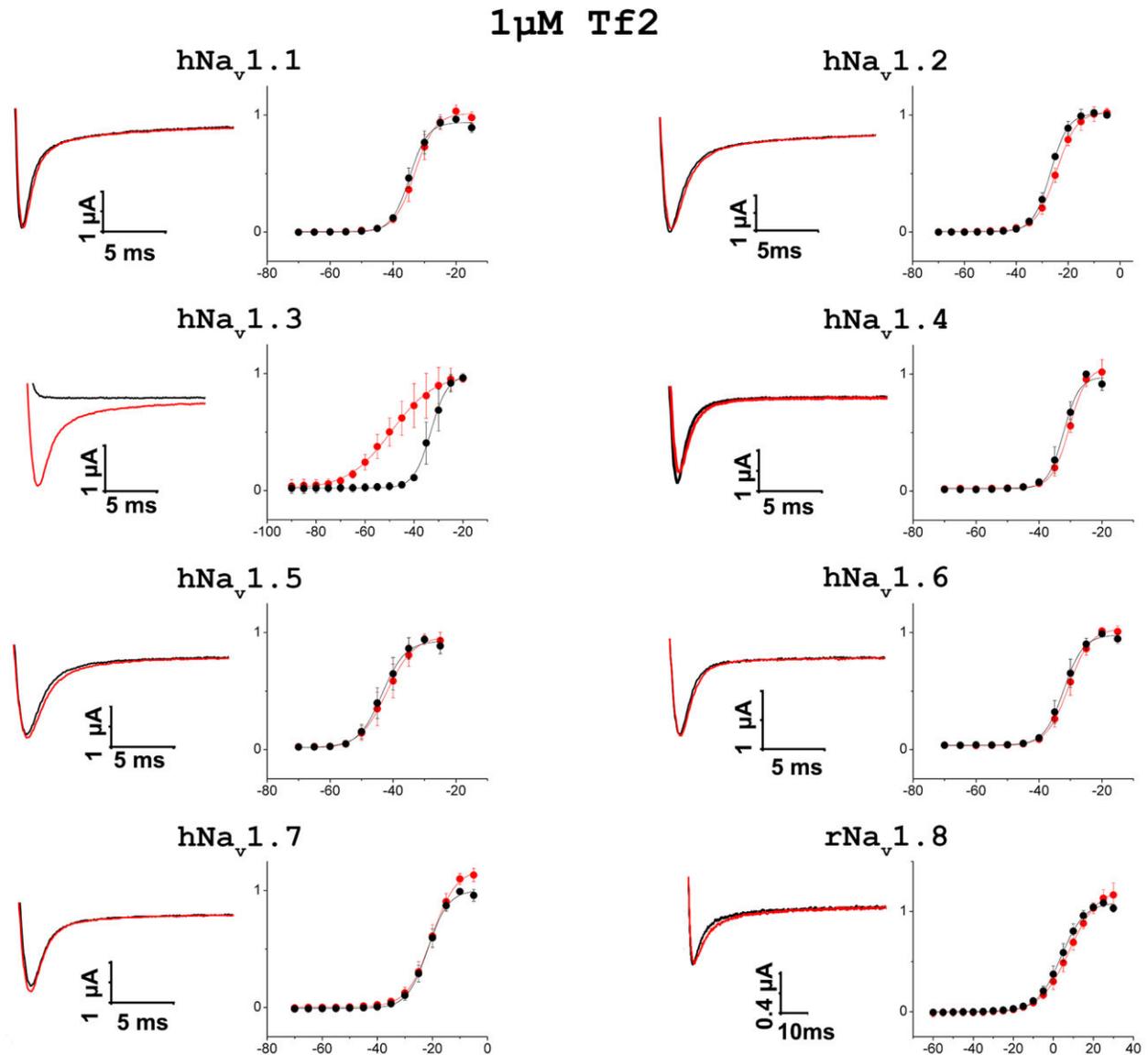


Figura 24. Avaliação da atividade da toxina Tf2 em diferentes canais de Na⁺ e suas respectivas GVs. Efeito da aplicação de 1 μ M da toxina Tf2 em Na_vs expressos em *X. laevis*. Na coluna da esquerda é apresentado um exemplo de traço experimental. Potencial de repouso de -90mV. Em preto observa-se o controle; em vermelho, observa-se o registro após a aplicação da toxina. À direita, observa-se a relação condutância (G)/ voltagem(V) antes e após a aplicação da toxina. À 1 μ M a Tf2 influencia apenas o canal Na_v1.3, $p < 0,05$, promovendo a ativação do canal em um potencial mais negativo. Os dados estão representados com o erro padrão, e $n \geq 3$.

A toxina Tf3 mostrou-se ativa nos canais hNa_v1.1 a 1.7 (Fig. 25), com efeito na inativação dos canais, de forma semelhante à toxina Tf4 (Fig. 26). Porém, a Tf3 é mais rápida que a Tf4 (Fig. 26). A toxina Tf3 possui identidade de 53% com a Kurtoxina (Chuang et al., 1998), uma α -NaScTx, que também foi utilizada como molde para a modelagem molecular desta toxina (Fig. 28). Além da atividade em canais de Na⁺, a Kurtoxina é ativa em canais de Ca⁺⁺ (Ca_v3.1 e Ca_v3.2), com alta afinidade, indicando que a Tf3 também pode ter esses canais como alvo molecular.

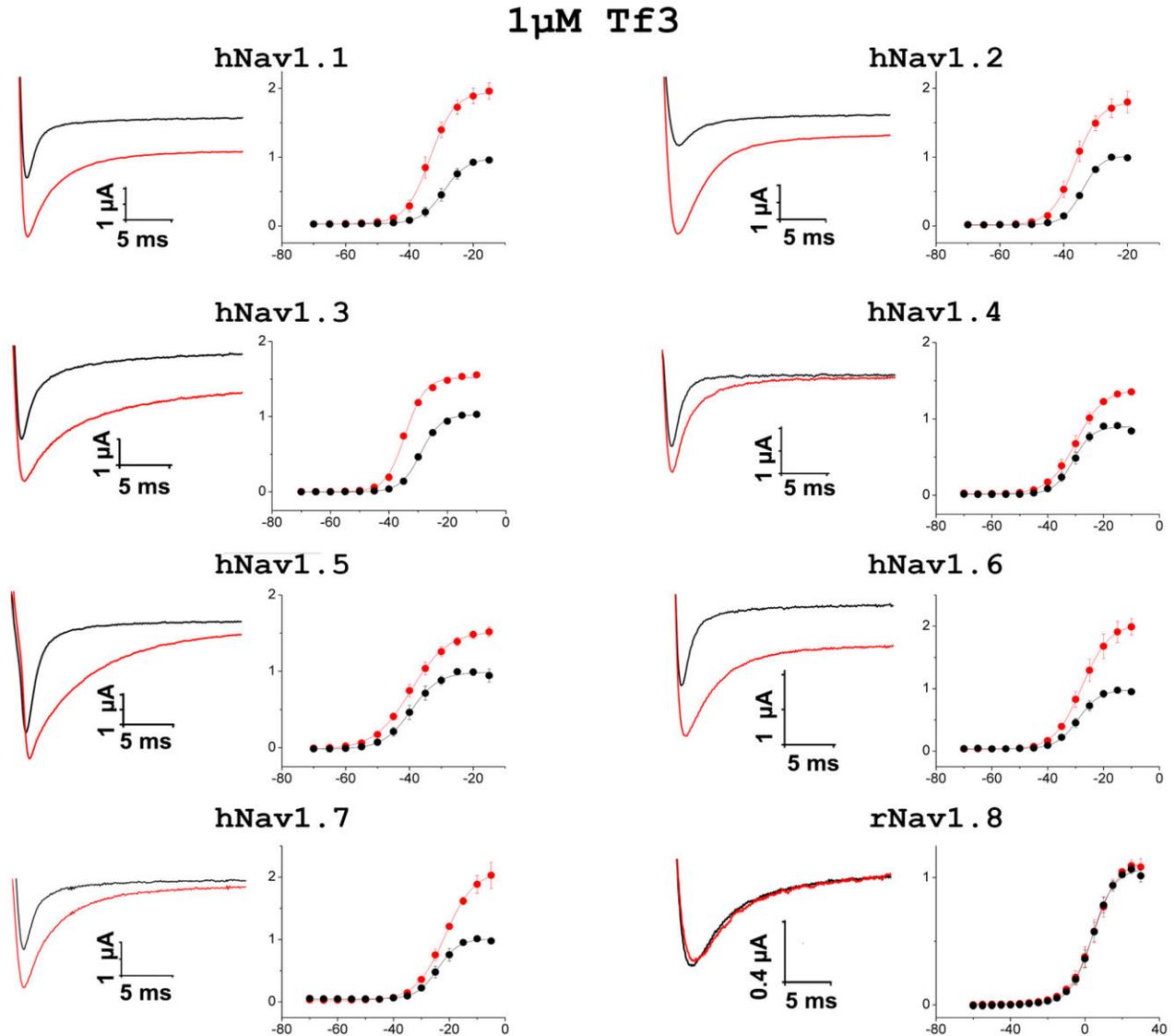


Figura 25. Avaliação da atividade da toxina Tf3 em diferentes subtipos de canais de Na⁺ e suas respectivas GVs. Efeito da aplicação de 1 μ M da toxina Tf3 em Na_vs expressos em *X. laevis*. Na coluna da esquerda é apresentado um exemplo de traço experimental. Potencial de repouso de -90mV. Em preto observa-se o controle; em vermelho, observa-se o registro após a aplicação da toxina. À direita, observa-se a relação condutância (G)/ voltagem(V), antes e após a aplicação da toxina. À 1 μ M a Tf3 influencia os canais Na_v1.1 a Na_v 1.7, $p < 0,05$, e não afeta o canal Na_v1.8. O efeito observado de aumento na amplitude das correntes e de retardo na inativação do canal é característico de α -NaScTx_s. Os dados estão representados com o erro padrão, e $n \geq 3$.

A exposição de larvas de lepidóptera *S. frugiperda* a diferentes concentrações da toxina Tf4 não provocou paralisia ou morte. A Tf4 é a toxina mais abundante da peçonha de *T. fasciolatus*, porém, os ensaios anteriores realizados por Wagner 2003, os dados obtidos pelo *screening* em canais Na_v e em larvas não identificaram um alvo biológico específico. Apesar da alta similaridade com outras toxinas que atuam em canal de Na⁺ e a interação lenta com os canais Na_v 1.2 e 1.7 (Fig. 26), propomos que o alvo biológico da Tf4 é distinto. Ou ainda, que a toxina precise de um maior tempo para interagir com o canal e atingir sua atividade máxima. Os ensaios de TEVC foram conduzidos de forma a esperar a toxina saturar o canal para o registro das correntes de Na⁺. Porém, mesmo após 2,5 – 5 minutos os canais nos quais foi aplicada a Tf4 não chegaram à saturação, ao contrário do que ocorre com a Tf3, que saturou os canais logo após sua aplicação. A Tf4 possui 79% de identidade com a Ts4, peptídeo considerado não-tóxico, isolado de *T. serrulatus* (Guatimosim et al., 1999). A Ts4 induz reação alérgica como lacrimação, espasmos e induz a liberação dose-dependente de neurotransmissores nos sinaptossomas (GABA ou Glu) (Marangoni et al., 1990, Sampaio et al., 1996). Além disso, mostrou-se que anticorpos anti-Ts4 são capazes de reconhecer e neutralizar os efeitos da peçonha de *T. serrulatus* (Chavez-Olortegui et al., 1997).

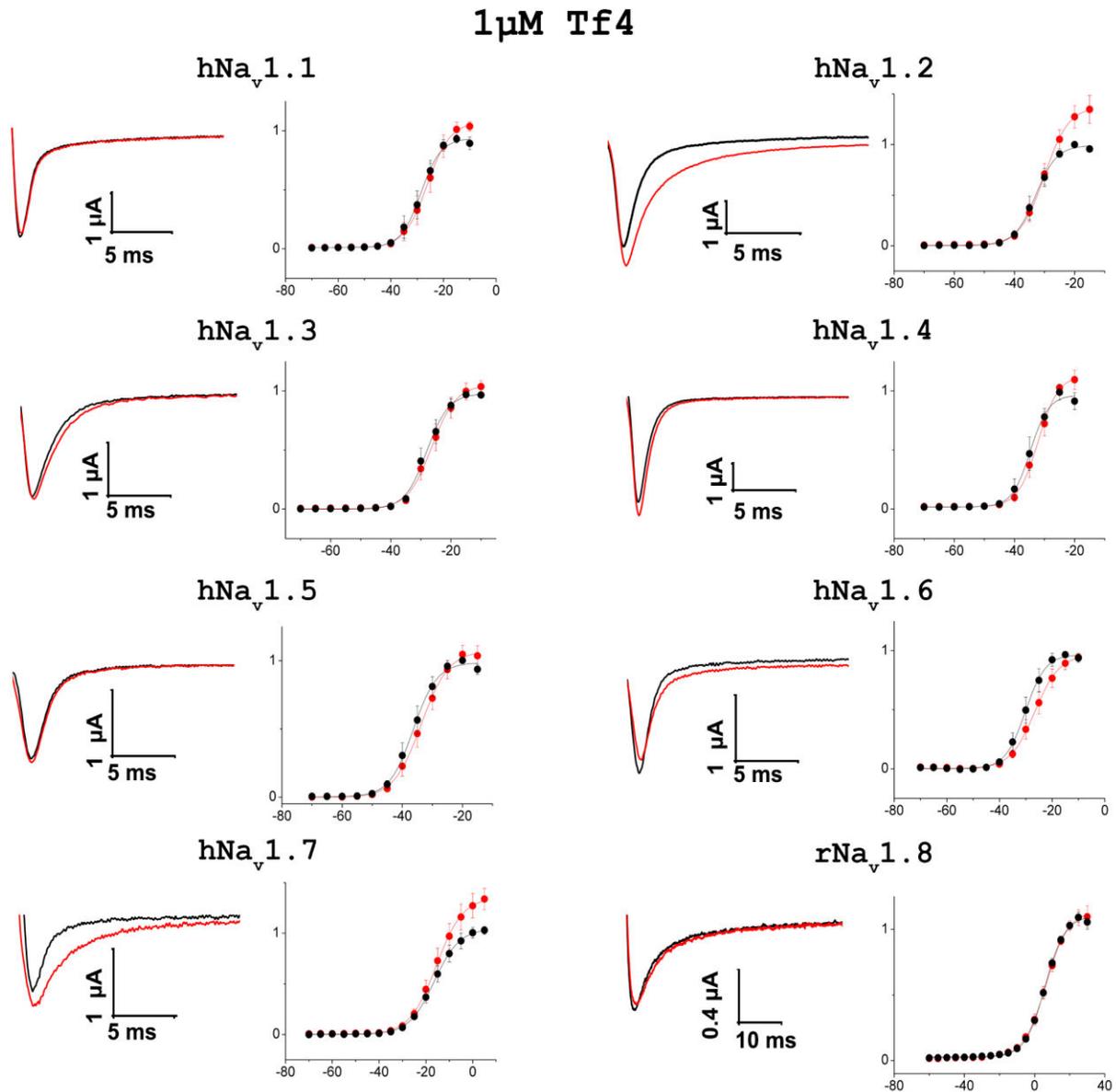


Figura 26. Avaliação da atividade da toxina Tf4 em diferentes canais de Na⁺ e suas respectivas GVs. Efeito da aplicação de 1 μ M da toxina Tf4 em Na_vs expressos em *X. laevis*. Na coluna da esquerda é apresentado um exemplo de traço experimental. Potencial de repouso de -90mV. Em preto observa-se o controle; em vermelho, observa-se o registro após a aplicação da toxina. À direita, observa-se a relação condutância (G)/ voltagem(V) antes e após a aplicação da toxina. À 1 μ M a Tf4 influencia, $p < 0,05$, apenas os canais Na_v1.2 e Na_v1.7. Os dados estão representados com o erro padrão, e $n \geq 3$.

O canal rNa_v1.8 não foi afetado por nenhuma das toxinas e fração testadas. A fração 63 possui como composto majoritário com massa molecular média de 6.853 Da, porém a mesma não foi identificada na biblioteca transcritômica. Para ajustar a concentração da fração à aproximadamente 1 μm, considerou-se a massa molecular majoritária como massa molecular única. Por eluir entre frações que contêm toxinas que atuam em canal de Na⁺, o *screening* foi realizado para identificar o possível alvo biológico. O pequeno segmento de 20 resíduos de aminoácido identificado por MS/MS, indicou que este composto é similar à Tf4, apresentando atividade significativa apenas em Na_v1.7 (Fig. 27).

FRAÇÃO 63

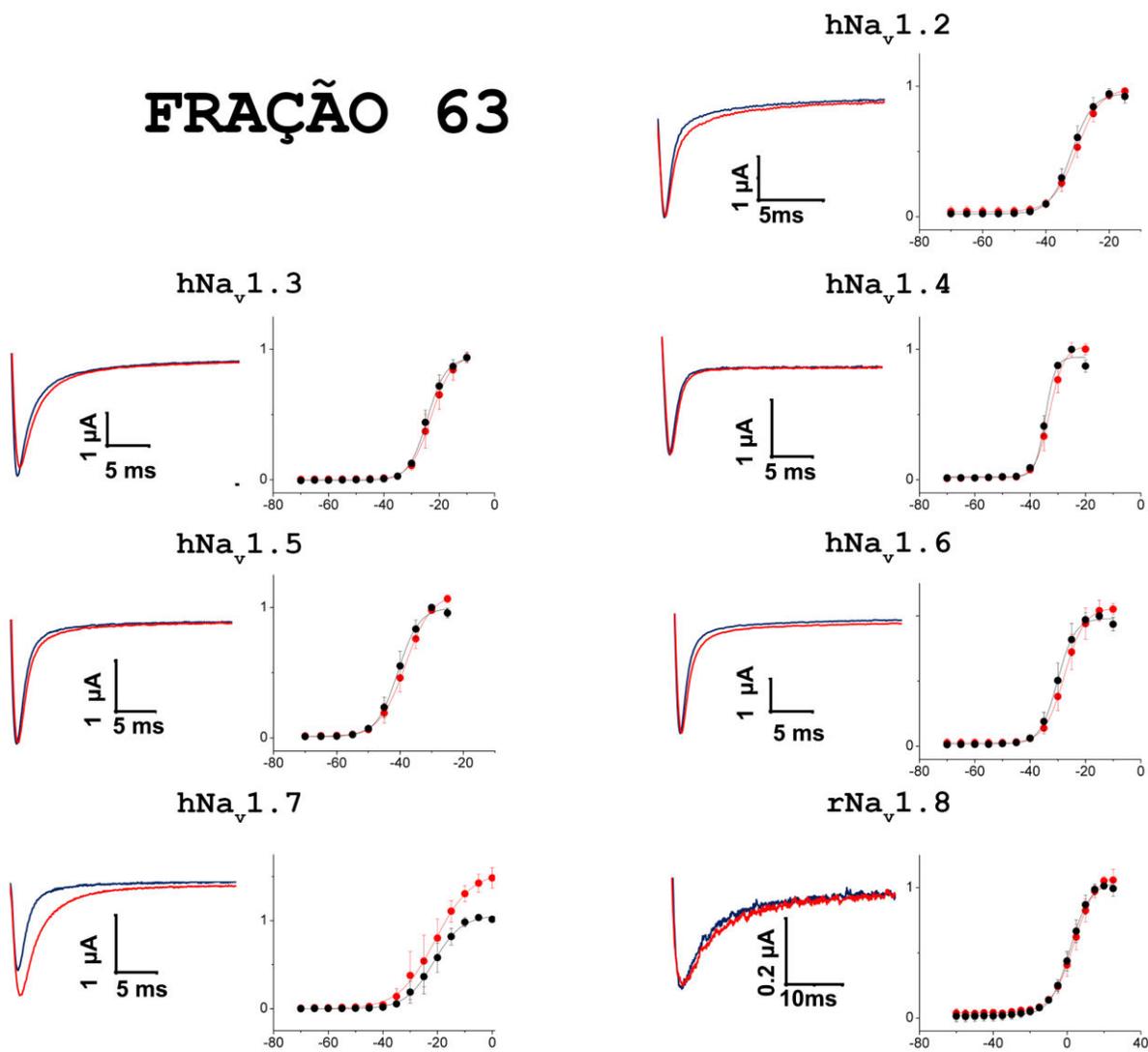


Figura 27. Avaliação da atividade da fração 63 em diferentes canais de Na⁺ e suas respectivas GVs. Efeito da aplicação de aproximadamente 1 μ M da fração 63 em Na_vs expressos em *X. laevis*. Na coluna da esquerda é apresentado um exemplo de traço experimental. Potencial de repouso de -90mV. Em preto observa-se o controle; em vermelho, observa-se o registro após a aplicação da fração. À direita, observa-se a relação condutância (G)/ voltagem(V) antes e após a aplicação da toxina. À concentração aplicada, a fração 63 influencia, $p < 0,05$, apenas o canal Na_v1.7. Os dados estão representados com o erro padrão, e $n \geq 3$.

6.5. Modelos por homologia

As toxinas purificadas e identificadas neste trabalho foram modeladas de forma a promover uma visualização das principais características eletrostáticas de cada uma das moléculas. Por meio de simples observação das estruturas apresentadas nas figuras 28 e 29, percebe-se que as toxinas do gênero *Tityus* Tf2, Tf3, Tf4, Ts1 e Ts2 possuem uma estrutura mais similar entre si do que quando comparadas às outras toxinas isoladas de escorpiões de outros gêneros (Css2, Css4 e AaH2). Apesar das similaridades, as afinidades toxina-canal são muito variáveis.

Algumas características podem ser consideradas relevantes para a ação de toxinas em canais de Na⁺, na chamada face A: um potencial eletrostático positivo na posição 1 N-terminal, um potencial negativo na posição 2 N-terminal, um grupo positivamente carregado na posição 12 para as β-NaScTxs ou na posição 58 para as α-NaScTx e um grupamento aromático conservado (Polikarpov et al., 1999).

A figura 28 ilustra a comparação entre as α-NaScTx Tf3, Tf4 e AaH2. A toxina AaH2 (PDB ID 1AHO, (Housset et al., 1994)) foi adicionada como parâmetro por ser considerada uma α-NaScTx modelo e por ter um trabalho de mutagênese (Karbat et al., 2004), permitindo uma visão dos resíduos de aminoácidos que são mais relevantes para sua atividade sobre canais de Na⁺. A AaH2 é uma α-NaScTx anti-mamífero, possui 63 resíduos de aminoácidos e foi isolada do escorpião africano *Androctonus australis* (Rochat et al., 1972). Sua atividade contra insetos foi testada após a mutação de uma glicina (G) na posição 16, por uma fenilalanina (F), tornando-a ativa contra inseto e inócua em mamífero. Na posição 17, a Tf3 possui um resíduo de fenilalanina (F), sugerindo que esta toxina possa agir em insetos. A sua inespecificidade em canais

de Na⁺, agindo em em hNa_vs 1.1-1.7, inviabiliza sua utilização como agente inseticida, mas a mutação de alguns resíduos poderia tornar esta possibilidade viável. A toxina Tf4 possui uma (F) na posição 18, porém o ensaio *in vivo* demonstrou inatividade em larvas de *Lepdoptera frugiperda*.

Quando as faces A das toxinas Tf3 e Tf4 são comparadas entre si, observa-se uma distribuição de cargas pouco similares em suas superfícies, sendo que a Tf3 se assemelha mais à AaH2 neste sentido. Uma região mais carregada positivamente é observada em Tf3 e AaH2 (R⁶¹/K⁶³ e R⁶²/K⁵⁸, respectivamente) enquanto a região correspondente da Tf4 apresenta resíduos negativos (C⁶²/D⁵⁶).

Na face B, observa-se uma região mais negativa nas Tf3 (E⁸/ N⁵⁹) e AaH2 (N⁸, N⁹, T¹³, H⁶⁴), enquanto a Tf4 possui apenas uma carga negativa na mesma região (D⁸). Os resíduos básicos da região 32 (K³², K³², K³⁰) parecem ser conservados nas três moléculas (Tf3, Tf4 e AaH2). As diferenças nos modelos das Tf3 e Tf4 justificam as diferenças nas atividades biológicas.

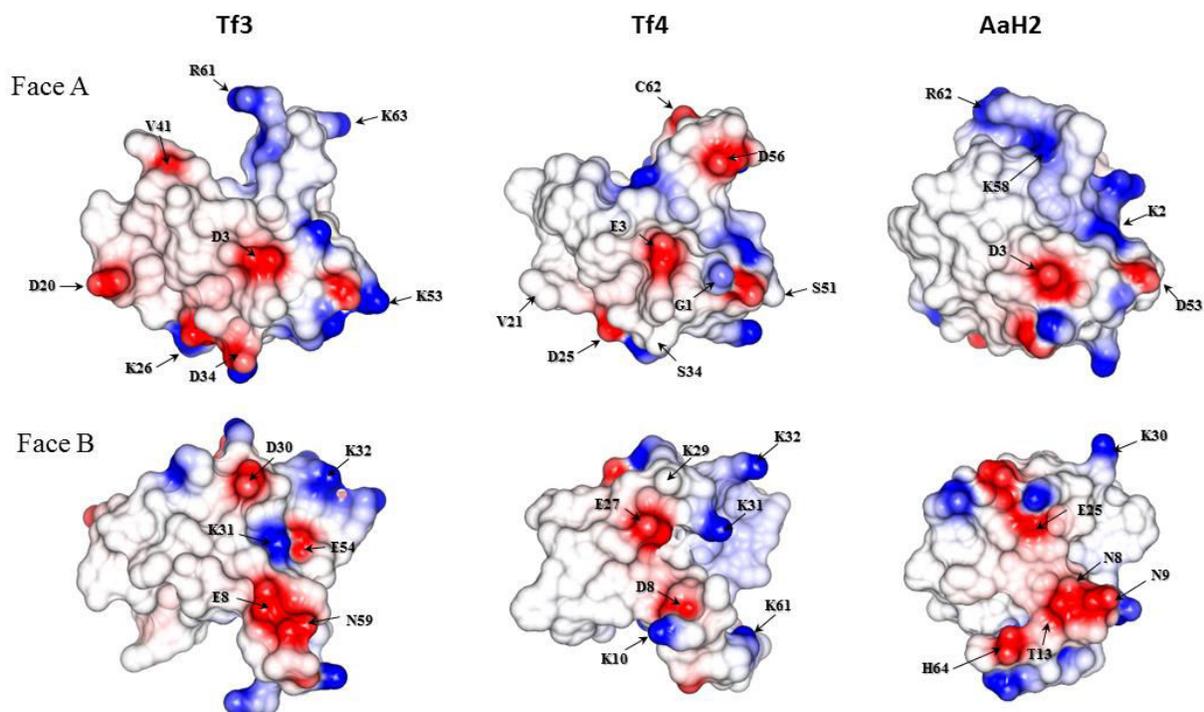


Figura 28. Comparação dos potenciais eletrostáticos das α -NaScTxs Tf3, Tf4 e da AaHII. Em vermelho estão assinalados os resíduos de aminoácidos carregados negativamente, em azul, os com carga positiva e os brancos são neutros.

Em comum, Tf3, Tf4 e AaH2 apresentam um centro carregado negativamente D³, E³ e D³, na face A, que também está presente nas β -toxinas (Fig. 29). Nas α -NaScTxs, o resíduo carregado positivamente é encontrado na posição 58, sendo que nas moléculas da Fig. 28 as posições são K⁵⁸ na AaH2, K⁵⁵ na Tf3 e K⁶¹ na Tf4. A lisina na posição 58, uma característica conservada em α -NaScTx, como proposto por Polikapov et al., 1999.

a)

Toxina	Sequência	aa	%Id
Tf2	-- KEGY AMDH-EGCK FS CFIRP-SGFODGYCK THL -KASSGYC-----AW PAC YCYGVPS NIK VWDYATNK---C-----	62	100
Tb2-III P60276	-- KEGY AMDH-EGCK FS CFIRP-SGFODGYCK THL -KASSGYC-----AW PAC YCYGVPS NIK VWDYATNK---C-----	62	100
Ts2 P68410	-- KEGY AMDH-EGCK FS CFIRP-AG FC DGYCK THL -KASSGYC-----AW PAC YCYGV PDHI KVWDYATNK---C-----	62	95
Ts1 P15226	-- KEGY LMDH-EGCK LS CFIRP-SGYCG RE CGIK--KGSSGYC-----AW PAC YCYGLPN WVK VWD R ATNK---C-----	61	75
Tz1 Q2NME3	-- KDGY LVGN-DGCKY SC FTRP-GTYCAN EC SRV--KGKDGYCY---AW MAC YCY SMPN W VKT WDRATNR---CGR----	64	45
Lqh-β-1 P0C5H3	--DN G YLLNKAT GC K VW CVIN--N AS NS EC KLRRG--NYGYCYF---W KLAC Y CEG -AP KSEL W AY ATNK---C NG KL--	66	39
Css1V P60266	-- KEGY LVNSY TG CK FE CFKLGDNDY CL RECRQ QY GK SS GGYCY---AF GC W CTH LY EQAV V W PL PN KT---C N ----	66	35
AaHIII P01484	-- VRDGY IVDD-V NC TY FC GR--N AY CNE EC TKLK-- GES GYC Q WAS PY G NA CYCY KLPD H V RT-- K GP G ---R CH ----	64	35
LqqIT1 P19856	-- KKNGY AVDS-SG KAP EC LL SN---Y CY NE CT K VH -Y AD K GY CC---L LS CY CV GL SD DK KV LE IS DARK KY CF V TIN	70	32
AmmVIII Q7YXD3	-- LKDGY IVND-IN CTY FCGR--N AY CNE EC IKLK-- GES GYC Q WAS PY G NS CYCY KLPD H V RT-- K GP G ---R C ND----	65	31
CssII P08900	-- KEGY LVSK TG CK YE CLKLGDNDY CL RECRQ QY GK SS GGYCY---AF GC W CTH LY EQAV V W PL PN KT---C N ----	66	29
LqhVII P59357	-- VRDGY IAKP-EN CA H CF PG--S SC DT EC K ENG --G TGG H CG FK VGH G TAC W CN AL PD K VGI --I VD GV--K CH ----	66	29
OD1 P84646	G VRD AY IA DD-K NC VY T CA S ---N GY CN TE CT KNG -- AES GYC Q W IG RY GNA C WC IK LP DE VPI --R IP G---K CR ----	65	27
Cell8 P0CH40	-- KKDGYP VNM-EB CR Y NC W K ---N AY CD K EC KE KK-- GQ SGY C ---Y GW N LS C WC I GL PD NT NT-- K M N P---F C Q TAD --	64	27
Bj-a-IT Q56TT9	G- RD AY IA DN-L NC AY T CG S ---N SY CN TE CT KNG -- AV SGY C Q W LG KY G NA C WC I N LP D K VPI --R IP G---A C R----	64	26
LqhVII P59356	-- VRDGY IAQP-EN CV Y H CT P ----D DT TC K D NG --G TGG H CG FK LGH G IA C WC N AL PD N V GI --I VD GV--K CH K----	64	19
Consensus/85%	..+-GYhhs...sC.h.Ch....sshC..bCp.....tpsGYC.....h.tCaC..lssph.h..b.ss....C.....		

b)

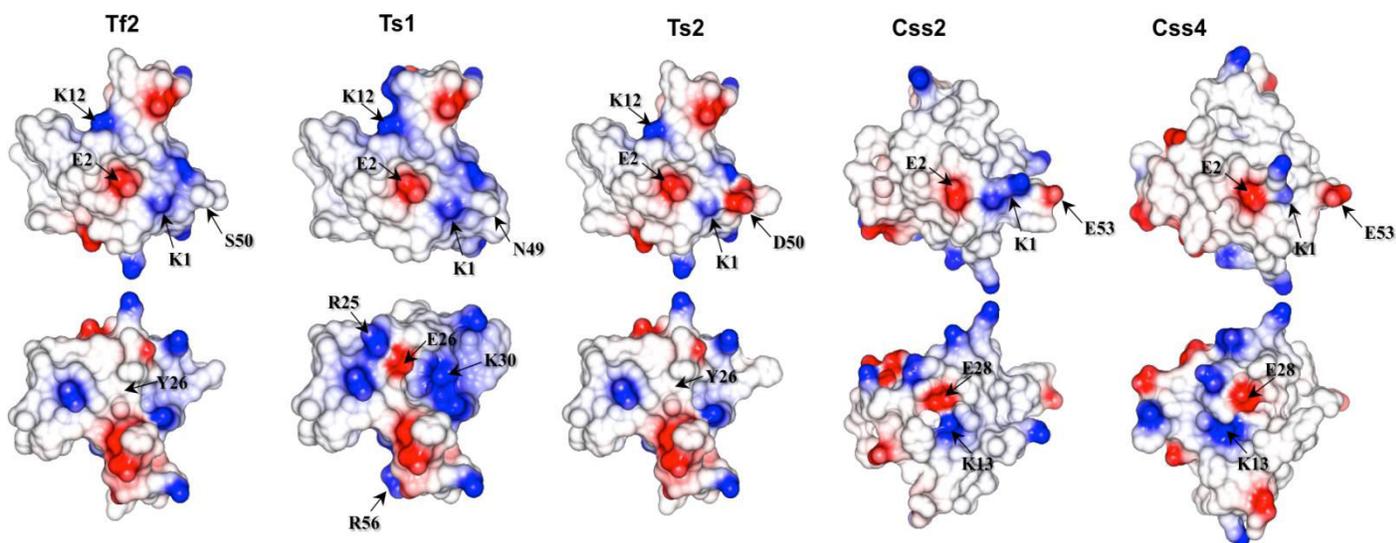


Figura 29. Comparação das sequências de aminoácidos da Tf2 com outras toxinas caracterizadas em canais de Na⁺ e potencial eletrostático da Tf2 com outras β-NaScTx descritas na literatura (Ts1, Css2, Css4) e com a Ts2. a) Múltiplo alinhamento de sequências, da Tf2 com outras toxinas de canais Na_v. Na coluna da esquerda, as toxinas são identificadas por seus nomes e códigos UniProt KB. Letras maiúsculas denotam aminoácidos. **h, hidrofóbico; **s**, pequeno; **b**, grande; **p**, polar; **t**, pequena; **a**, aromático; **l**, alifático. Positivos (+) e negativos (-). Resíduos de cisteína (C) estão marcados em preto. **aa** aminoácido e a identidade está representada por **Id**%. b) Vermelhos possuem carga negativa, Azuis carga positivas e os brancos são neutros, apresentados em Face A e Face B.**

A toxina Tf2 é idêntica à Tb2-II, uma toxina do escorpião *Tityus bahiensis*, que é letal após injeção em mamíferos e insetos (Pimenta et al., 2001a). No entanto, o alvo molecular de Tb2-II ainda não foi identificado. A Tf2 é 95% idêntica à Ts2 (diferença de 3 resíduos de aminoácidos), uma toxina de *T. serrulatus* que inibe a inativação rápida de Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.5, Na_v1.6 e Na_v1.7, mas não afeta Na_v1.4 ou Na_v1.8 (Cologna et al., 2012). Interessantemente, a Ts2 também muda a dependência de voltagem de ativação de Na_v1.3 para potenciais mais negativos (β -NaScTx).

O alinhamento de sequências da figura 29a foi realizado com toxinas testadas em canais iônicos dependentes de voltagem, expressos em sistema heterólogo, bem como exemplos representativos de toxinas das quais as estruturas 3D foram determinadas. A comparação das sequências permite visualizar as diferenças e semelhanças entre essas toxinas, permitindo inferências sobre a importância de determinados resíduos de aminoácidos. Por exemplo, em Tf2, Tb2-II, e Ts2, um cluster conservado de resíduos aromáticos formados por Y⁴, Y³⁷, Y⁴⁴, Y⁴⁶, W⁴⁰ e W⁵⁵ foi observado (Fig. 29a), que é conhecido por ser uma característica importante para a atividade das β -NaScTxs (Pedraza Escalona and Possani, 2013, Polikarpov et al., 1999).

Devido ao seu padrão de seletividade ímpar, é interessante considerar os possíveis mecanismos de ação da Tf2. A comparação das sequências de aminoácidos da Tf2 e Ts2 mostra três substituições (S²⁰A, S⁵⁰D, e N⁵¹H). Como resultado da substituição de S⁵⁰D, a Ts2 tem uma carga global mais negativa que pode afetar a capacidade da toxina de interagir com o seu sítio de ligação, que pode estar localizado no interior da membrana lipídica. Em Ts1, o resíduo W⁵⁰, equivalente aos H⁵¹ em Ts2 e

N⁵¹ em Tf2, é crucial para a atividade de toxina (Polikarpov et al., 1999). Sendo assim, os diferentes efeitos entre as Tf2 e Ts2 nos canais Na_v podem ocorrer devido a esta substituição ou devido à diferença de carga causada por S⁵⁰D. Porém, a fim de elucidar os diferentes efeitos de Tf2 e Ts2 (apesar da grande similaridade de sequências e estruturas), e para sanar eventuais problemas de purificação de umas das toxinas, é necessário que estas sejam purificadas e testadas sob as mesmas condições, para excluir a possibilidade da atividade de algum contaminante em detrimento da toxina.

Outra característica observada nas estruturas da figura 28 e 29b, é a presença de uma região positiva próximo do núcleo negativo E², isto é, um resíduo de lisina situado na posição 1 para as β-NaScTx, e na posição 2 para a α-NaScTx.

Comparando modelos da figura 29b, os grupos carregados positivamente nas posições 1 e 12 (K¹² para Tf2, Ts1 e Ts2, K¹³ para Css2 e Css4), bem como uma carga negativa na posição 2 são possíveis determinantes da atividade de β-NaScTx, corroborando a inferência de Polikarpov et al., 1999. Todas as toxinas β-NaScTx aqui analisadas possuem estas características, ainda que a Tf2 atue preferencialmente em hNa_v1.3, enquanto as outras não são específicas.

As sequências primárias de Tf2 e Ts2 diferem em três resíduos (S²⁰A, S⁵⁰D e N⁵¹H) (Fig. 29), entre os quais só a substituição na posição 50 provoca uma alteração significativa no potencial eletrostático da molécula. A presença desse ácido aspártico gera um potencial negativo em Ts2, que também está presente na Ts1 (N⁴⁹ resíduo na posição equivalente) (29b, face A). Quando se compara as estruturas da Ts1 com as de Tf2 e Ts2, observa-se um aumento e cargas positivamente carregadas proveniente de uma arginina na posição 25/56 e uma lisina na posição 30 (Fig. 29b). O alto grau de

conservação de sequências e das estruturas de grupos carregados observados em Tf2, Ts1 e Ts2 na face A, sugere que este padrão estrutural pode ter um papel importante no reconhecimento e especificidade de uma determinada isoforma de Na_v .

As toxinas CsslI e CsslIV também possuem um resíduo ácido semelhante ao D^{50} encontrado em Ts2 (E^{53} e E^{53}) (Fig. 29b). Embora apresentando um potencial eletrostático diferente em comparação com Ts2 e Tf2, essas toxinas possuem resíduos de aminoácidos em posições equivalentes, como se observa no consenso do alinhamento (Fig 29a) e na face A das estruturas (Fig. 29b). Como esperado pelo seu elevado grau de similaridade, a face B da Tf2 e Ts2 possui potenciais eletrostáticos semelhantes. A comparação com a face B da Ts1, mostra que esta é mais positivamente carregada devido à presença de resíduos R^{25} , R^{56} e K^{30} . Além disso, uma região ácida, geralmente na posição E^{28} , pode ser visualizada na face B, em quase todas as toxinas, que é tida como uma região chave em toxinas de escorpião que atuam em Na_v s (Pedraza Escalona and Possani, 2013). No entanto, tanto Tf2 e Ts2 apresentam um resíduo aromático nesta posição (Y^{26}).

De maneira geral a Tf2 possui todas as características importantes mencionados por Polikarpov et al. 1999, para a atuação em um canal Na_v . Ou seja, um potencial eletrostático positivo na posição 1 (K^1), um potencial negativo na posição 2 (E^2), um grupo carregado positivamente na posição 12 (K^{12}) e um núcleo aromático expostos ao solvente (Y^4 , Y^{37} , Y^{44} , Y^{46} , W^{40} e W^{55}). Em todas as estruturas apresentadas, o resíduo negativo central (E^2 ou D^3/E^3) é rodeado pelo núcleo aromático.

Na face B, a Tf2 e Ts2 possuem um Y²⁸ ao invés de E²⁸. Como sugerido por Cohen et al. 2005, a neutralização da carga deste resíduo ácido resultou numa diminuição da afinidade da Css4 em três vezes. Talvez essa neutralização poderia representar um indício para a alta especificidade de Tf2 para hNav1.3. A Css2 e Css4 também possuem todas estas características, mas o resíduo básico na posição 12 está na posição 13, que está localizado na face B, e não na face A como sugerido por Polikarpov et. al 1999. Apesar dessa diferença, os peptídeos mantêm sua atividade de β -NaScTx.

7. Conclusão

Este trabalho possibilitou uma análise da composição da peçonha por meio da análise proteômica e transcritômica da glândula do escorpião *Tityus fasciolatus*. Os escorpiões representam um modelo evolucionário, uma vez que foram os primeiros animais a povoar o ambiente terrestre. Ao longo de milhões de anos, o processo evolutivo selecionou características que lhes conferiram sucesso adaptativo a diferentes ambientes e condições. Dentre suas ferramentas de sobrevivência, merece destaque a peçonha, um complexo arsenal de moléculas com diferentes alvos biológicos, cujas aplicabilidades vão além da defesa.

As moléculas identificadas pela biblioteca transcritômica fornecem elementos sobre a evolução da composição da peçonha, assim como, melhor compreensão sobre a sintomatologia das picadas. As sequências identificadas corroboram a hipótese de um ancestral comum às toxinas moduladoras de canais de Na⁺. O total de 9.130 transcritos compõem o acervo de sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos, que juntamente com a listagem de 212 massas moleculares com seus respectivos tempos de retenção, fornecem informações para estudos posteriores. Um total de 18 sequências de prováveis NaScTxS e 15 prováveis KTxS foram identificadas.

A abordagem por *screening* eletrofisiológico em diferentes canais é uma aliada na compreensão de quais são os sítios com maior relevância tanto para seletividade como para a potência de uma toxina. Resta, então, a possibilidade de estudos de mutagênese e *in silico* para que a importância de alguns resíduos de aminoácidos seja corroborada ou refutada. Este trabalho permitiu a descrição da toxina Tf2, que possui alta especificidade ao subtipo de canal hNa_v1.3. Ademais, um estudo de mutagênese

comparativo poderia elucidar a característica única da atividade biológica dessa molécula. A toxina Tf3 atua em vários canais de Na⁺, de maneira inespecífica, porém com ação rápida quando comparada à Tf4. Esta, por sua vez, tem ação mais específica e lenta nos hNa_v1.2 e hNa_v1.7. A fração 63 atua lentamente em hNa_v1.7.

8. Perspectivas

- ✓ Refinamento dos dados obtidos através da biblioteca transcritômica.
- ✓ Sequências nucleotídicas poderão ser subclonadas em vetores de expressão, para produção de toxinas e posterior caracterização biológica.
- ✓ Purificação das toxinas que provavelmente atuam em canais de Na^+ e K^+ , e testá-las em sistema de *Patch clamp* para identificar seus alvos biológicos.
- ✓ Ensaios *in vivo* com a toxina Tf2.
- ✓ Busca de outros alvos biológicos para a Tf4.
- ✓ Refinamento da atividade da Tf3 sob os diferentes canais de Na^+ , com menores concentrações e análise do seu efeito em canais de Ca^{++} .
- ✓ Purificação e caracterização dos peptídeos que compõem a fração 63.
- ✓ Ensaios das toxinas com canais de insetos, para avaliar suas atividades sobre esses organismos.

9. Referência Bibliográfica

- ABDEL-RAHMAN, M. A., QUINTERO-HERNANDEZ, V. & POSSANI, L. D. 2013. Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). *Toxicon*, 74, 193-207.
- ALMEIDA, D. D., SCORTECCI, K. C., KOBASHI, L. S., AGNEZ-LIMA, L. F., MEDEIROS, S. R., SILVA-JUNIOR, A. A., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L. & FERNANDES-PEDROSA MDE, F. 2012. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC Genomics*, 13, 362.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
- ALVARENGA, E. R., MENDES, T. M., MAGALHAES, B. F., SIQUEIRA, F. F., DANTAS, A. E., BARROCA, T. M., HORTA, C. C. & KALAPOTHAKIS, E. 2012. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *OJGen*, 2.
- AMARAL, C. F., LOPES, J. A., MAGALHAES, R. A. & DE REZENDE, N. A. 1991. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. *Am J Cardiol*, 67, 655-7.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M. & SHERLOCK, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- BARONA, J., BATISTA, C. V., ZAMUDIO, F. Z., GOMEZ-LAGUNAS, F., WANKE, E., OTERO, R. & POSSANI, L. D. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ - and K⁺ -channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim Biophys Acta*, 1764, 76-84.
- BATISTA, C. V., DEL POZO, L., ZAMUDIO, F. Z., CONTRERAS, S., BECERRIL, B., WANKE, E. & POSSANI, L. D. 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 803, 55-66.
- BATISTA, C. V., ROMAN-GONZALEZ, S. A., SALAS-CASTILLO, S. P., ZAMUDIO, F. Z., GOMEZ-LAGUNAS, F. & POSSANI, L. D. 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146, 147-57.
- BECERRIL, B., CORONA, M., CORONAS, F. I., ZAMUDIO, F., CALDERON-ARANDA, E. S., FLETCHER, P. L., JR., MARTIN, B. M. & POSSANI, L. D. 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem J*, 313 (Pt 3), 753-60.
- BECERRIL, B., CORONA, M., MEJIA, M. C., MARTIN, B. M., LUCAS, S., BOLIVAR, F. & POSSANI, L. D. 1993. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. *FEBS Lett*, 335, 6-8.
- BEZANILLA, F. 2006. The action potential: from voltage-gated conductances to molecular structures. *Biol Res*, 39, 425-35.
- BOLDRINI-FRANCA, J., RODRIGUES, R. S., FONSECA, F. P., MENALDO, D. L., FERREIRA, F. B., HENRIQUE-SILVA, F., SOARES, A. M., HAMAGUCHI, A., RODRIGUES, V. M., OTAVIANO, A. R. & HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. 2009. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. *Biochimie*, 91, 586-95.

- BORGES, A., ALFONZO, M. J., GARCIA, C. C., WINAND, N. J., LEIPOLD, E. & HEINEMANN, S. H. 2004. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel beta-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*, 43, 671-84.
- BOSMANS, F., BRONE, B., SUN, Y. M., ZHU, R. H., XIONG, Y. M., WANG, D. C., VAN KERKHOVE, E. & TYTGAT, J. 2005. Pharmacological comparison of two different insect models using the scorpion alpha-like toxin BmK M1 from *Buthus martensii* Karsch. *Protein Pept Lett*, 12, 363-7.
- BOSMANS, F. & TYTGAT, J. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon*, 49, 142-58.
- CALISKAN, F., GARCIA, B. I., CORONAS, F. I., BATISTA, C. V., ZAMUDIO, F. Z. & POSSANI, L. D. 2006. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon*, 48, 12-22.
- CALISKAN, F., GARCIA, B. I., CORONAS, F. I., RESTANO-CASSULINI, R., KORKMAZ, F., SAHIN, Y., CORZO, G. & POSSANI, L. D. 2012a. Purification and cDNA cloning of a novel neurotoxic peptide (Acra3) from the scorpion *Androctonus crassicauda*. *Peptides*, 37, 106-12.
- CALISKAN, F., QUINTERO-HERNANDEZ, V., RESTANO-CASSULINI, R., BATISTA, C. V., ZAMUDIO, F. Z., CORONAS, F. I. & POSSANI, L. D. 2012b. Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: general characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian Na(+)-channel alpha-toxin. *Toxicon*, 59, 408-15.
- CAMPOS, F. V., CHANDA, B., BEIRAO, P. S. & BEZANILLA, F. 2007. beta-Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel. *J Gen Physiol*, 130, 257-68.
- CATTERALL, W. A. 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67, 915-28.
- CATTERALL, W. A. 2014. Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp Physiol*, 99, 35-51.
- CATTERALL, W. A., GOLDIN, A. L. & WAXMAN, S. G. 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 397-409.
- CESTELE, S., QU, Y., ROGERS, J. C., ROCHAT, H., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 1998. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, 21, 919-31.
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E., FERREIRA, A. M., FERREIRA, A. P. & DINIZ, C. R. 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 35, 213-21.
- CHUANG, R. S., JAFFE, H., CRIBBS, L., PEREZ-REYES, E. & SWARTZ, K. J. 1998. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci*, 1, 668-74.
- CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. 1990. *Scorpions in Mythology, Folklore, and History In Gary A. Polis. The Biology of scorpions.*, Stanford University Press.
- COELHO, V. A., CREMONEZ, C. M., ANJOLETTE, F. A., AGUIAR, J. F., VARANDA, W. A. & ARANTES, E. C. 2014. Functional and structural study comparing the C-terminal amidated beta-neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, 83, 15-21.
- 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. *J Biol Chem*, 280, 5045-53.
- COLOGNA, C. T., MARCUSSI, S., GIGLIO, J. R., SOARES, A. M. & ARANTES, E. C. 2009. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein Pept Lett*, 16, 920-32.

- COLOGNA, C. T., PEIGNEUR, S., RUSTIGUEL, J. K., NONATO, M. C., TYTGAT, J. & ARANTES, E. C. 2012. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. *FEBS J*, 279, 1495-504.
- CONDE, R., ZAMUDIO, F. Z., RODRIGUEZ, M. H. & POSSANI, L. D. 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett*, 471, 165-8.
- CORONA, M., ZURITA, M., POSSANI, L. D. & BECERRIL, B. 1996. Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Toxicon*, 34, 251-6.
- D'SUZE, G., SCHWARTZ, E. F., GARCIA-GOMEZ, B. I., SEVCIK, C. & POSSANI, L. D. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie*, 91, 1010-9.
- DE LIMA, M. E., FIGUEIREDO, S. G., PIMENTA, A. M., SANTOS, D. M., BORGES, M. H., CORDEIRO, M. N., RICHARDSON, M., OLIVEIRA, L. C., STANKIEWICZ, M. & PELHATE, M. 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146, 264-79.
- DIEGO-GARCIA, E., BATISTA, C. V., GARCIA-GOMEZ, B. I., LUCAS, S., CANDIDO, D. M., GOMEZ-LAGUNAS, F. & POSSANI, L. D. 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*, 45, 273-83.
- DIEGO-GARCIA, E., PEIGNEUR, S., CLYNEN, E., MARIEN, T., CZECH, L., SCHOOF, L. & TYTGAT, J. 2012. Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (Scorpionidae Latreille 1802): transcriptome, venomomics and function. *Proteomics*, 12, 313-28.
- DUNLOP, J. A. 2010. Geological history and phylogeny of Chelicerata. *Arthropod Struct Dev*, 39, 124-42.
- 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 of action. *Biochemistry*, 29, 5941-7.
- ENGLAND, S. & DE GROOT, M. J. 2009. Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *Br J Pharmacol*, 158, 1413-25.
- ESTACION, M., GASSER, A., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G. 2010. A sodium channel mutation linked to epilepsy increases ramp and persistent current of Nav1.3 and induces hyperexcitability in hippocampal neurons. *Exp Neurol*, 224, 362-8.
- ESTRADA, G., GARCIA, B. I., SCHIAVON, E., ORTIZ, E., CESTELE, S., WANKE, E., POSSANI, L. D. & CORZO, G. 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CssII: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1770, 1161-8.
- FERNANDES-PEDROSA MDE, F., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., KOBASHI, L. S., ALMEIDA, D. D., HO, P. L. & TAMBOURGI, D. V. 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, 9, 279.
- FET, V., W.D., S., LOWE, G. & BRAUNWALDER, M. E. 2000. Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998). In: SOCIETY, N. Y. E. (ed.).
- GORDON, D., ILAN, N., ZILBERBERG, N., GILLES, N., URBACH, D., COHEN, L., KARBAT, I., FROY, O., GAATHON, A., KALLEN, R. G., BENVENISTE, M. & GUREVITZ, M. 2003. An 'Old World' scorpion beta-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels. *Eur J Biochem*, 270, 2663-70.
- GUATIMOSIM, S. C., PRADO, V. F., DINIZ, C. R., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. & KALAPOTHAKIS, E. 1999. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 37, 507-17.

- GUERRERO-VARGAS, J. A., MOURAO, C. B., QUINTERO-HERNANDEZ, V., POSSANI, L. D. & SCHWARTZ, E. F. 2012. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na⁺-channel scorpion toxins. *PLoS One*, 7, e30478.
- GUIMARÃES, P. T. C. 2009. *Caracterização molecular e imunológica do veneno de Tityus fasciolatus e sua ação sobre camundongos*. Doutorado, UFMG.
- GUREVITZ, M., FROY, O., ZILBERBERG, N., TURKOV, M., STRUGATSKY, D., GERSHBURG, E., LEE, D., ADAMS, M. E., TUGARINOV, V., ANGLISTER, J., SHAANAN, B., LORET, E., STANKIEWICZ, M., PELHATE, M., GORDON, D. & CHEJANOVSKY, N. 1998. Sodium channel modifiers from scorpion venom: structure-activity relationship, mode of action and application. *Toxicon*, 36, 1671-82.
- GUREVITZ, M., KARBAT, I., COHEN, L., ILAN, N., KAHN, R., TURKOV, M., STANKIEWICZ, M., STUHMER, W., DONG, K. & GORDON, D. 2007. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon*, 49, 473-89.
- HAINS, B. C. & WAXMAN, S. G. 2007. Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI. *Prog Brain Res*, 161, 195-203.
- HE, Q., DUAN, Z., YU, Y., LIU, Z. & LIANG, S. 2013. The venom gland transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. *PLoS One*, 8, e81357.
- HOUSSET, D., HABERSETZER-ROCHAT, C., ASTIER, J. P. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. 1994. Crystal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector refined at 1.3 Å resolution. *J Mol Biol*, 238, 88-103.
- HU, H., BANDYOPADHYAY, P. K., OLIVERA, B. M. & YANDELL, M. 2011. Characterization of the *Conus bullatus* genome and its venom-duct transcriptome. *BMC Genomics*, 12, 60.
- JABLONSKY, M. J., WATT, D. D. & KRISHNA, N. R. 1995. Solution structure of an Old World-like neurotoxin from the venom of the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *J Mol Biol*, 248, 449-58.
- JIANG, L., LIU, C., DUAN, Z., DENG, M., TANG, X. & LIANG, S. 2013. Transcriptome analysis of venom glands from a single fishing spider *Dolomedes mizhoanus*. *Toxicon*, 73, 23-32.
- KALAPOTHAKIS, E., JARDIM, S., MAGALHAES, A. C., MENDES, T. M., DE MARCO, L., AFONSO, L. C. & CHAVEZ-OLORTEGUI, C. 2001. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, 39, 679-85.
- KARBAT, I., FROLOW, F., FROY, O., GILLES, N., COHEN, L., TURKOV, M., GORDON, D. & GUREVITZ, M. 2004. Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins. *J Biol Chem*, 279, 31679-86.
- KELLEY, L. A. & STERNBERG, M. J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4, 363-71.
- KOZMINSKY-ATIAS, A., BAR-SHALOM, A., MISHMAR, D. & ZILBERBERG, N. 2008. Assembling an arsenal, the scorpion way. *BMC Evol Biol*, 8, 333.
- LAVERGNE, V., DUTERTRE, S., JIN, A. H., LEWIS, R. J., TAFT, R. J. & ALEWOOD, P. F. 2013. Systematic interrogation of the *Conus marmoreus* venom duct transcriptome with ConoSorter reveals 158 novel conotoxins and 13 new gene superfamilies. *BMC Genomics*, 14, 708.
- LEGROS, C., CEARD, B., VACHER, H., MARCHOT, P., BOUGIS, P. E. & MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. 2005. Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. *Biochim Biophys Acta*, 1723, 91-9.
- LI, M. H., ZHANG, N. X., CHEN, X. Q., WU, G., WU, H. M. & HU, G. Y. 2003. BmKK4, a novel toxin from the venom of Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch, inhibits potassium currents in rat hippocampal neurons in vitro. *Toxicon*, 42, 199-205.

- LLUISMA, A. O., MILASH, B. A., MOORE, B., OLIVERA, B. M. & BANDYOPADHYAY, P. K. 2012. Novel venom peptides from the cone snail *Conus pulicarius* discovered through next-generation sequencing of its venom duct transcriptome. *Mar Genomics*, 5, 43-51.
- LONG, S. B., TAO, X., CAMPBELL, E. B. & MACKINNON, R. 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, 450, 376-82.
- LORET, E. P., MANSUELLE, P., ROCHAT, H. & GRANIER, C. 1990. Neurotoxins active on insects: amino acid sequences, chemical modifications, and secondary structure estimation by circular dichroism of toxins from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Biochemistry*, 29, 1492-501.
- LOURENÇO, W. R. 2003. *Scorpions of Brazil*, Paris, France.
- LOURENÇO, W. R., CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L., CUELAR, O., VON EICKSTEDT, V. R. D., BARRAVIEIRA, B. & KNOX, M. B. 1996. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2, 121-134.
- LUNA-RAMIREZ, K., QUINTERO-HERNANDEZ, V., VARGAS-JAIMES, L., BATISTA, C. V., WINKEL, K. D. & POSSANI, L. D. 2013. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon*, 63, 44-54.
- MA, Y., HE, Y., ZHAO, R., WU, Y., LI, W. & CAO, Z. 2012. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *J Proteomics*, 75, 1563-76.
- MA, Y., ZHAO, R., HE, Y., LI, S., LIU, J., WU, Y., CAO, Z. & LI, W. 2009. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. *BMC Genomics*, 10, 290.
- MA, Y., ZHAO, Y., ZHAO, R., ZHANG, W., HE, Y., WU, Y., CAO, Z., GUO, L. & LI, W. 2010. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. *Proteomics*, 10, 2471-85.
- MAGALHAES, G. S., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L., LOPES-FERREIRA, M., LORENZINI, D. M., HO, P. L. & MOURA-DA-SILVA, A. M. 2006. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie*, 88, 693-9.
- MARANGONI, S., GHISO, J., SAMPAIO, S. V., ARANTES, E. C., GIGLIO, J. R., OLIVEIRA, B. & FRANGIONE, B. 1990. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *J Protein Chem*, 9, 595-601.
- MARANGONI, S., TOYAMA, M. H., ARANTES, E. C., GIGLIO, J. R., DA SILVA, C. A., CARNEIRO, E. M., GONCALVES, A. A. & OLIVEIRA, B. 1995. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta*, 1243, 309-14.
- MARGRES, M. J., ARONOW, K., LOYACANO, J. & ROKYTA, D. R. 2013. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics*, 14, 531.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., CEARD, B., RIBEIRO, A. M., DINIZ, C. R., ROCHAT, H. & BOUGIS, P. E. 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*. *FEBS Lett*, 302, 220-2.
- MARTIN, M. F., GARCIA Y PEREZ, L. G., EL AYEB, M., KOPEYAN, C., BECHIS, G., JOVER, E. & ROCHAT, H. 1987. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *J Biol Chem*, 262, 4452-9.
- MCNICHOLAS, S., POTTERTON, E., WILSON, K. S. & NOBLE, M. E. 2011. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 67, 386-94.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009. *Manual de controle de escorpiões* Brasília, Ministério da Saúde.

- MORGENSTERN, D., ROHDE, B. H., KING, G. F., TAL, T., SHER, D. & ZLOTKIN, E. 2011. The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon*, 57, 695-703.
- NEIVA, M., ARRAES, F. B., DE SOUZA, J. V., RADIS-BAPTISTA, G., PRIETO DA SILVA, A. R., WALTER, M. E., BRIGIDO MDE, M., YAMANE, T., LOPEZ-LOZANO, J. L. & ASTOLFI-FILHO, S. 2009. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon*, 53, 427-36.
- OLIVEIRA, F. N., MORTARI, M. R., CARNEIRO, F. P., GUERRERO-VARGAS, J. A., SANTOS, D. M., PIMENTA, A. M. & SCHWARTZ, E. F. 2013. Another record of significant regional variation in toxicity of *Tityus serrulatus* venom in Brazil: a step towards understanding the possible role of sodium channel modulators. *Toxicon*, 73, 33-46.
- PAYANDEH, J., GAMAL EL-DIN, T. M., SCHEUER, T., ZHENG, N. & CATTERALL, W. A. 2012. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, 486, 135-9.
- PAYANDEH, J., SCHEUER, T., ZHENG, N. & CATTERALL, W. A. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475, 353-8.
- PEDRAZA ESCALONA, M. & POSSANI, L. D. 2013. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 18, 572-87.
- PI, C., LIU, Y., PENG, C., JIANG, X., LIU, J., XU, B., YU, X., YU, Y., WANG, L., DONG, M., CHEN, S. & XU, A. L. 2006. Analysis of expressed sequence tags from the venom ducts of *Conus striatus*: focusing on the expression profile of conotoxins. *Biochimie*, 88, 131-40.
- PIMENTA, A. M., MARTIN-EAUCLAIRE, M., ROCHAT, H., FIGUEIREDO, S. G., KALAPOTHAKIS, E., AFONSO, L. C. & DE LIMA, M. E. 2001a. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon*, 39, 1009-19.
- PIMENTA, A. M., STOCKLIN, R., FAVREAU, P., BOUGIS, P. E. & MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. 2001b. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15, 1562-72.
- PINHEIRO, C. B., MARANGONI, S., TOYAMA, M. H. & POLIKARPOV, I. 2003. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59, 405-15.
- PINTAR, A., POSSANI, L. D. & DELEPIERRE, M. 1999. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol*, 287, 359-67.
- POLIKARPOV, I., JUNIOR, M. S., MARANGONI, S., TOYAMA, M. H. & TEPLYAKOV, A. 1999. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. *J Mol Biol*, 290, 175-84.
- POSSANI, L. D., BECERRIL, B., DELEPIERRE, M. & TYTGAT, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem*, 264, 287-300.
- QUINTERO-HERNANDEZ, V., ORTIZ, E., RENDON-ANAYA, M., SCHWARTZ, E. F., BECERRIL, B., CORZO, G. & POSSANI, L. D. 2011. Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression. *Toxicon*, 58, 644-63.
- RATES, B., FERRAZ, K. K., BORGES, M. H., RICHARDSON, M., DE LIMA, M. E. & PIMENTA, A. M. 2008. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. *Toxicon*, 52, 611-8.
- RENDÓN-ANAYA, M., CAMARGOS, T. & ORTIZ, E. 2014. Scorpion Venom Gland Transcriptomics. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. (ed.) *Toxinology*. Springer Netherlands.
- RENDON-ANAYA, M., DELAYE, L., POSSANI, L. D. & HERRERA-ESTRELLA, A. 2012. Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. *PLoS One*, 7, e43331.

- REZENDE, N. A., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. & AMARAL, C. F. S. 1996. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? *Toxicon*, 34, 820-823.
- ROCHAT, H., ROCHAT, C., SAMPIERI, F., MIRANDA, F. & LISSITZKY, S. 1972. The amino-acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis* Hector. *Eur J Biochem*, 28, 381-8.
- RODRIGUEZ-RAVELO, R., CORONAS, F. I., ZAMUDIO, F. Z., GONZALEZ-MORALES, L., LOPEZ, G. E., URQUIOLA, A. R. & POSSANI, L. D. 2013. The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 19, 13.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 46, 831-44.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon*, 49, 171-80.
- ROEDING, F., BORNER, J., KUBE, M., KLAGES, S., REINHARDT, R. & BURMESTER, T. 2009. A 454 sequencing approach for large scale phylogenomic analysis of the common emperor scorpion (*Pandinus imperator*). *Mol Phylogenet Evol*, 53, 826-34.
- RUIMING, Z., YIBAO, M., YAWEN, H., ZHIYONG, D., YINGLIANG, W., ZHIJIAN, C. & WENXIN, L. 2010. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. *BMC Genomics*, 11, 452.
- RUPPERT, E. E., FOX, R. S. & BARNES, R. D. 2005. *Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*, São Paulo, Rocca.
- SAMPAIO, S. V., ARANTES, E. C., PRADO, W. A., RICCIOPPO NETO, F. & GIGLIO, J. R. 1991. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 29, 663-72.
- SAMPAIO, S. V., COUTINHO-NETTO, J., ARANTES, E. C., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B. & GIGLIO, J. R. 1996. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. *Biochem Mol Biol Int*, 39, 729-40.
- SAUCEDO, A. L., DEL RIO-PORTILLA, F., PICCO, C., ESTRADA, G., PRESTIPINO, G., POSSANI, L. D., DELEPIERRE, M. & CORZO, G. 2012. Solution structure of native and recombinant expressed toxin CsxII from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 sodium channels. *Biochim Biophys Acta*, 1824, 478-87.
- SAUTIERE, P., CESTELE, S., KOPEYAN, C., MARTINAGE, A., DROBECQ, H., DOLJANSKY, Y. & GORDON, D. 1998. New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity. *Toxicon*, 36, 1141-54.
- SCHWARTZ, E. F., CAMARGOS, T. S., ZAMUDIO, F. Z., SILVA, L. P., BLOCH, C., JR., CAIXETA, F., SCHWARTZ, C. A. & POSSANI, L. D. 2008. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, 51, 1499-508.
- SCHWARTZ, E. F., DIEGO-GARCIA, E., RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. 2007. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics*, 8, 119.
- SELISKO, B., GARCIA, C., BECERRIL, B., DELEPIERRE, M. & POSSANI, L. D. 1996. An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur J Biochem*, 242, 235-42.
- SILVA, E. C., CAMARGOS, T. S., MARANHAO, A. Q., SILVA-PEREIRA, I., SILVA, L. P., POSSANI, L. D. & SCHWARTZ, E. F. 2009. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, 54, 252-61.

- SODERLUND, D. M. & KNIPPLE, D. C. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 33, 563-77.
- SODING, J. 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21, 951-60.
- SONG, W., DU, Y., LIU, Z., LUO, N., TURKOV, M., GORDON, D., GUREVITZ, M., GOLDIN, A. L. & DONG, K. 2011. Substitutions in the domain III voltage-sensing module enhance the sensitivity of an insect sodium channel to a scorpion beta-toxin. *J Biol Chem*, 286, 15781-8.
- STEVENS, M., PEIGNEUR, S. & TYTGAT, J. 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol*, 2, 71.
- TAN, J., LIU, Z., WANG, R., HUANG, Z. Y., CHEN, A. C., GUREVITZ, M. & DONG, K. 2005. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol Pharmacol*, 67, 513-22.
- TEIXEIRA, A. L., FONTOURA, B. F., FREIRE-MAIA, L., MACHADO, C. R., CAMARGOS, E. R. & TEIXEIRA, M. M. 2001. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, 39, 703-9.
- TSENG, T. T., MCMAHON, A. M., JOHNSON, V. T., MANGUBAT, E. Z., ZAHM, R. J., PACOLD, M. E. & JAKOBSSON, E. 2007. Sodium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 12, 249-62.
- VALDEZ-VELAZQUEZ, L. L., QUINTERO-HERNANDEZ, V., ROMERO-GUTIERREZ, M. T., CORONAS, F. I. & POSSANI, L. D. 2013. Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLoS One*, 8, e66486.
- VANOYE, C. G., GURNETT, C. A., HOLLAND, K. D., GEORGE, A. L., JR. & KEARNEY, J. A. 2014. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiol Dis*, 62, 313-22.
- VASCONCELOS, F., LANCHOTE, V. L., BENDHACK, L. M., GIGLIO, J. R., SAMPAIO, S. V. & ARANTES, E. C. 2005. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 141, 85-92.
- VAZQUEZ, A., TAPIA, J. V., ELIASON, W. K., MARTIN, B. M., LEBRETON, F., DELEPIERRE, M., POSSANI, L. D. & BECERRIL, B. 1995. Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na⁺ channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 33, 1161-70.
- VERANO-BRAGA, T., ROCHA-RESENDE, C., SILVA, D. M., IANZER, D., MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., BOUGIS, P. E., DE LIMA, M. E., SANTOS, R. A. & PIMENTA, A. M. 2008. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 371, 515-20.
- WAGNER, S. 2003. *Estudo das propriedades bioquímicas e farmacológicas das peçonhas de escorpiões da região centro-oeste do Brasil*. Doutorado, Universidade de Brasília, UnB.
- WAGNER, S., CASTRO, M. S., BARBOSA, J. A., FONTES, W., SCHWARTZ, E. N., SEBEN, A., RODRIGUES PIRES, O., JR., SOUSA, M. V. & SCHWARTZ, C. A. 2003. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon*, 41, 737-45.
- WARMKE, J. W., REENAN, R. A., WANG, P., QIAN, S., ARENA, J. P., WANG, J., WUNDERLER, D., LIU, K., KACZOROWSKI, G. J., VAN DER PLOEG, L. H., GANETZKY, B. & COHEN, C. J. 1997. Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J Gen Physiol*, 110, 119-33.
- WILKINS, M. R., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, J. C., WILLIAMS, K. L., APPEL, R. D. & HOCHSTRASSER, D. F. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.
- YOSHIZAWA, M. A. C. 2002. *Estudo dos acidentes escorpiônicos no Distrito Federal de 1991-2000*. Mestrado Dissertação, Universidade de Brasília, UnB.

- YU, F. H., YAROV-YAROVY, V., GUTMAN, G. A. & CATTERALL, W. A. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57, 387-95.
- ZANOTTA, L. C. 2006. *Isolamento e caracterização de peptídeos biologicamente ativos na peçonha do escorpião Tityus fasciolatus*. Mestrado, Universidade de Brasília, Unb.
- ZHANG, J. Z., YAROV-YAROVY, V., SCHEUER, T., KARBAT, I., COHEN, L., GORDON, D., GUREVITZ, M. & CATTERALL, W. A. 2011. Structure-function map of the receptor site for beta-scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem*, 286, 33641-51.
- ZHIJIAN, C., FENG, L., YINGLIANG, W., XIN, M. & WENXIN, L. 2006. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon*, 47, 348-55.
- ZLOTKIN, E., EITAN, M., BINDOKAS, V. P., ADAMS, M. E., MOYER, M., BURKHART, W. & FOWLER, E. 1991. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry*, 30, 4814-21.

Anexo I

Contigs que codificam toxinas, com o nome do *contig*, tradução códon-aminoácido (nn/aa), provável massa molecular (levando em consideração as pontes dissulfeto, e quando existir sinal GKK no C-terminal , e a presença de amidação) e número de *contigs* que codificam a mesma molécula (#contigs). As toxinas apresentadas a seguir foram inferidas a partir de sequência nucleotídica obtida pela biblioteca transcritômica, e somente as que tinham peptídeo sinal, toxina madura e *stop* códon estão na tabela. O peptídeo sinal está em negrito, os pró-peptídeos estão em duplo sublinhado, as toxinas maduras estão em sublinhado simples e o processamento pós-traducional está em itálico. Os parâmetros foram obtidos por similaridade e programas auxiliares.

Nome	nn/aa	Provável massa molecular [M+H] ⁺	# <i>contigs</i>
Putativas NaScTx			

<p>>contig_7878 Frame - 1</p>	<pre> 1 GTT TTT ACC GTT CCA AAT TAA TTA AAT TGT ATC TTT TCT GAA AAA 45 46 ACT AAC GAA GAA CAT TCG ATC CGA ACG ATG AAA GGA ATG ATC TTG 90 M K G M I L 30 91 TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GAC ATT GTC GTA GGA GGC AAA 135 31 F I S C L L L I D I V V G G K 45 136 GAA GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAA GGT TGC AAA GTT ACT TGT TTT 180 46 E G Y P A D S K G C K V T C F 60 181 TTT ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA GAA TGC AAA CTG AAA AAG 225 61 F T G V G Y C D T E C K L K K 75 226 GCA TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG GCG TGT TAC TGC TAC GGG 270 76 A S S G Y C A W P A C Y C Y G 90 271 CTT CCA GAT TCA GTG CCA GTT TAT GAT AAT GCT TCG AAT AAA TGT 315 91 L P D S V P V Y D N A S N K C 105 316 AAC AAA AAA TAA ATT TGT CAT CAC TGA AAT CCC TTC ACA AAT GAA 360 106 N K K * 361 CTG TAA TAA GTT TGG CAA AAA ATA AAA TAA GGT TGC GTT 399 </pre>	<p>6.694,94</p>	<p>1</p>
<p>>contig_7879 Frame - 1</p>	<pre> 1 CAA TGA GGA AGG AGA CCA ACC GAT TAA ACA GTA TAT AAT CCG AGA 45 46 TTT TAC AGT TCG AAA TTA ATT AAA TCG TCT CTT TTC TGA AAA TCT 90 91 AAC GAA GAA GAA TCG ATC TGA ACG ATG AAA CGA ATG ATC TTG TTT 135 M K R M I L F 45 136 ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GAC ATT GTC GTA GGA GGC AAA GAA 180 46 I S C L L L I D I V V G G K E 60 181 GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAA GGT TGC AAA GTT ACT TGT TTT TTT 225 61 G Y P A D S K G C K V T C F F 75 226 ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA GAA TGC AAA CTG AAA AAG GCA 270 76 T G V G Y C D T E C K L K K A 90 271 TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT 315 91 S S G Y C A W P A C Y C Y G L 105 316 CCA GAT TCA GTG CCA GTT TAT GAT AAT GCT TCG AAT AAA TGT AAC 360 106 P D S V P V Y D N A S N K C N 120 </pre>	<p>6.637,92</p>	<p>3</p>

	361 AAA AAA TAA ATT TGT CAT CAC TGA AAT CCC TTC ACA AAT GAA CTG 405 121 K K * 406 TAA TAA GTT TGG CA- 420		
>contig_7882 Frame -2	2 AAT GAG GAA GGA GAC CAA CCG ATT AAA CAG TAT ATA ATC GGA GAT 46 47 TTT ACA GTT CGA AAT TAA TTA AAT CGT CTC TTT TCT GAA AAT CTA 91 92 ACG AAG AAG AAT CGA TCT GAA CGA TGA AAC GAA TGA TCT TGT TTA 136 137 TTA GCT GCT TAT TGC TGA TCG GCA TTG TCG TAG AAT GTA AAG AAG 181 182 GTT ACC TCA TGG ATC ACG AAG GTT GCA AAC TTA GTT GCT TTA TCA 226 227 GAC CAT CGG GAT ACT GCG GCA GTG AAT GCA AAA TTA AAA AGG GCT 271 272 CAT CGG GCT ATT GCG CCT GGC CAT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GAC 316 91 H R A I A P G H S C L L L I D 105 317 ATT GTC GTA GGA GGC AAA GAA GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAA GGT 361 106 I V V G G K E G Y P A D S K G 120 362 TGC AAA GTT ACT TGT TTT TTT ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA 406 121 C K V T C F F T G V G Y C D T 135 407 GAA TGC AAA CTG AAA AAG GCA TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG 451 136 E C K L K K A S S G Y C A W P 150 452 GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAG 496 151 A C Y C Y G L P N W V K V W E 165 497 AGA GCA ACG AAC AGA TGT GGC AAA AAA TAA ATT TGT TTC ACT GAA 541 166 R A T N R C G K K * 542 AAC CCT TTA CAA ATG AAC TGT AAT AAG TTT GGC A-- 577	6.888,13	1
>contig_7883 Frame -1	1 GTT TTT ACC GTT CCA AAT TAA TTA AAT TGT ATC TTT TCT GAA AAA 45 46 ACT AAC GAA GAA CAT TCG ATC CGA ACG ATG AAA GGA ATG ATC TTG 90 M K G M I L 30 91 TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GGC ATT GTC GTA GAA TGT AAA 135 31 F I S C L L L I G I V V E C K 45 136 GAA GGT TAC CTC ATG GAT CAC GAA GGT TGC AAA CTT AGT TGC TTT 180 46 E G Y L M D H E G C K L S C F 60 181 ATC AGA CCA TCG GGA TAC TGC GGC AGT GAA TGC AAA ATT AAA AAG 225 61 I R P S G Y C G S E C K I K K 75 226 GGC TCA TCG GGC TAT TGC GCC TGG CCA GCG TGT TAC TGC TAC GGG 270 76 G S S G Y C A W P A C Y C Y G 90 271 CTT CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAG AGA GCA ACG AAC AGA TGT 315	6.921,15	12

	<p>91 L P N W V K V W E R A T N R C 105</p> <p>316 GGC AAA AAA TAA ATT TGT TTC ACT GAA AAC CCT TTA CAA ATG AAC 360</p> <p>106 G K K *</p> <p>361 TGT AAT AAG TTT GGC AAA AAT AAA AAA ATG TTC C-- 396</p>		
<p>>contig_1885 Frame -3</p>	<p>3 TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT ATG ATT TAC TCG ATT ATG ATT 47</p> <p style="padding-left: 100px;">M I Y S I M I 15</p> <p>48 GCT ATT ACC TGT TTA TTG ATT GAA GGC ATC GAG AGT AAG AAA GAC 92</p> <p>16 A I T C L L I E G I E S K K D 30</p> <p>93 GGA TAT CCT GTG GAA TAT AAA AAC TGC GCC TTC GCC TGC AGC TAT 137</p> <p>31 <u>G Y P V E Y K N C A F A C S Y</u> 45</p> <p>138 GAT GAT GAG TAC TGC GAT AAA CTG TGC AAA GAC AAA AAG GCA GAC 182</p> <p>46 <u>D D E Y C D K L C K D K K A D</u> 60</p> <p>183 AGT GGA TAT TGT TAT TGG GTT CAC ATC ATC TGC TAC TGC TAT GGT 227</p> <p>61 <u>S G Y C Y W V H I I C Y C Y G</u> 75</p> <p>228 CTA CCT GAC AGC GAA CCA GTT AAG TAC AAT GGA AAA TGC AGA CCT 272</p> <p>76 <u>L P D S E P V K Y N G K C R P</u> 90</p> <p>273 GGT GGT GGT AAG AAG TAA ATA AGC CAC GTC GGA TAA TCG AGA ATA 317</p> <p>91 <u>G G G K K *</u></p> <p>318 CTT CGA GCG AGT ATT GCT GAT AAA TAA TGT CTG AGA AAA ACC TCT 362</p> <p>363 TAA TGA AAT AAA ATG ATT GTA TAA ATG ACG AAA --- 398</p>	7.454,3	4
<p>>contig_1923 Frame -2</p>	<p>2 GAT GGT TCG TTC CGC GAC CTT TCC ACA GAT ATT AAA CCT CAG TTG 46</p> <p>47 CAA TAA AAA ACG ATA ATT AGC AGA AGA TAA ATA ATG AGC CGG GCG 91</p> <p>92 GAG GAG ACC CCA ATA ACT CGA ACA TTC GCC ATG AAT AAC TTC ATT 136</p> <p style="padding-left: 100px;">M N N F I 45</p> <p>137 CTC TTG GTC GTC GTT TGC TTA GTG ACC GCG GGC ACG GAG GGC AAG 181</p> <p>46 L L V V V C L V T A G T E G K 60</p> <p>182 AAA GAC GGA TAC CCG GTG AAA CAC GAT AAC TGC GGC TAC ATT TGC 226</p> <p>61 <u>K D G Y P V K H D N C G Y I C</u> 75</p> <p>227 TGG AAC TAC GAC AAC GAA TTC TGC GAT AAG CTA TGC AAA GAC AAG 271</p> <p>76 <u>W N Y D N E F C D K L C K D K</u> 90</p> <p>272 AAA GCT GAC AGC GGA TAC TGC TAC TGG CTT CAC ATC CTC TGC TAC 316</p> <p>91 <u>K A D S G Y C Y W L H I L C Y</u> 105</p>	7.472,34	7

	317 TGC TAC GGG CTT CCC GAT GGC GAA CCC ATC AAA ACC TTC GGA ACA 361 106 C Y G L P D G E P I K T F G T 120 362 TGC AGA TCC GGA AAG AAG TAA ACC AGC CGC CTG TTG GTC CCA GAT 406 121 C R S G K K * 407 CCG CCT GGT CGA TGA ATG TTT CTG AAA ACC ATT CCC G-- 445		
>contig_ 4569 Frame -3	3 CTT CCG ATC TGA AAA TCT AAC GAA GTA GAA TCG ATC TGA ACG ATG 47 48 AAA CGA ATG ATC TTG TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC GGC ATT 92 M I L F I S C L L L I G I 30 93 GTC GTA GAA TGT AAA GAA GGT TAC CTT AGC TGC TTA TTG CTG ATC 137 31 V V E C K E G Y L S C L L L I 45 138 GAC ATT GTC GTA GGA GGC AAA GAA GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAA 182 46 D I V V G G K E G Y P A D S K 60 183 GGT TGC AAA CTT ACT TGT TTT TTT ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT 227 61 G C K L T C F F T G V G Y C D 75 228 ACA GAA TGC AAA CTG AAA AAG GCA TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG 272 76 T E C K L K K A S S G Y C A W 90 273 CCG GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA GAT TCA GCG TCA GTT TGG 317 91 P A C Y C Y G L P D S A S V W 105 318 GAC AGT GCT ACG AAT AAA TGT GGC AAA AAA TAA ATT TAT CAT TAC 362 106 D S A T N K C G K K * 363 TGA AAT CCC TTT ACA ATG AAC TGT AAT AAG TTT GGG AAA AAT AAA 407 408 TAA AGT TCG CAT TAA ATT ACT AAA AAA AAA AAA AAA AAA CAA AAA 452	6.623,90	7
>contig_ 4578 Frame -2	2 GTG CTC TTC CGA TCT TAA CGA CGT AGA ATC GAT CTG AAC GAT GAA 46 1 V L F R S * R R R I D L N D E 15 47 ACG AAT GAT CTT GTT TAT TAG CTG CTT ATT GCT GAT CGG CAT TGT 91 16 T N D L V Y * L L I A D R H C 30 92 CGT AGA ATG TAA AGA AGG TTA CCT CAT GGA TCA CGA AGG TTG CAA 136 31 R R M * R R L P H G S R R L Q 45 137 ACT TAG TTG CTT TAT CAG ACC ATC GGG ATA CTG CGG CAG TGA ATG 181 46 T * L L Y Q T I G I L R Q * M 60 182 CAA AAT TAA AAA GGG CTC ATC GGG CTA TTG CGC CTG GCC ATT ATT 226 61 Q N * K G L I G L L R L A I I 75	6651,93	1

	227 AGC TGC TTA TTG CTG ATA GAC ATT GTC GTA GGA GGC AAA GAA GGT 271 76 S C L L L I D I V V G G K E G 90 272 TAT CCA GCG GAT TCC AAA GGT TGC AAA CTT ACT TGT TTT TTT ACA 316 91 Y P A D S K G C K L T C F F T 105 317 GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA GAA TGC AAA CTG AAA AAG GCA TCA 361 106 G V G Y C D T E C K L K K A S 120 362 TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA 406 121 S G Y C A W P A C Y C Y G L P 135 407 GAT TCA GTG CCA GTT TAT GAT AAT GCT TCG AAT AAA TGT AAC AAA 451 136 D S V P V Y D N A S N K C N K 150 452 AAA TAA ATT TGT CAT CAC TGA AAT CCC TTC ACA AAT GAA CTG TAA 496 151 K * 497 TAA GTT TGG CAA AAA ATA AAA TAA GGT TGC GTT --- 532		
>contig_4580	3 CTA ACG AAG TAG AAT CGA TCT GAA CGA TGA AAC GAA TGA TCT TGT 47 1 L T K * N R S E R * N E * S C 15 48 TTA TTA GCT GCT TAT TGC TGA TCG GCA TTG TCG TAG AAT GTA AAG 92 16 L L A A Y C * S A L S * N V K 30 93 AAG GTT ACC TGC TGC TTA TTG CTG ATC GAC ATT GTC GTA GGA GGC 137 31 K V T C C L L L I D I V V G G 45 138 AAA GAA GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAA GGT TGC AAA CTT ACT TGT 182 46 K E G Y P A D S K G C K L T C 60 183 TTT TTT ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA GAA TGC AAA CTG AAA 227 61 F F T G V G Y C D T E C K L K 75 228 AAG GCA TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG GCG TGT TAC TGC TAC 272 76 K A S S G Y C A W P A C Y C Y 90 273 GGG CTT CCA GAT TCA GCG TCA GTT TGG GAC AGT GCT ACG AAT AAA 317 91 G L P D S A S V W D S A T N K 105 318 TGT GGC AAA AAA TAA ATT TAT CAT CAC TGA AAT CCC TTT ACA AAT 362 106 C G K K * 363 GAA TGT AAT AAA TTT GGC AAA AAA AAA AAA AAT AGT TCG TCT TGC 407 408 GAC G-- 413	6.520,89	1
>contig_5135	3 GAC GAT GGC ATT AGA GAT CCA ACT AAC TAA AGC GCC TTG TCG AAT 47	7.397,29	3

<p>Frame -3</p>	<p>48 ATC GAA GAT CCA CAA ATA ACG AAG ATG ATT TAC TCG ATT ATG ATT 92 M I Y S I M I 30</p> <p>93 GCT ATT ACC TGT TTA TTG ATT GAA GGC ATC GAG AGT AAG AAA GAC 137 31 A I T C L L I E G I E S K K D 45</p> <p>138 GGA TAT CCT GTG GAA TAT AAA AAC TGC GCC TTC GCC TGC AGC TAT 182 46 G Y P V E Y K N C A F A C S Y 60</p> <p>183 GAT GAT GAG TAC TGC GAT AAA CTG TGC AAA GAC AAA AAG GCA GAC 227 61 D D E Y C D K L C K D K K A D 75</p> <p>228 AGT GGA TAT TGT TAT TGG GTT CAC ATC ATC TGC TAC TGC TAT GGT 272 76 S G Y C Y W V H I I C Y C Y G 90</p> <p>273 CTA CCT GAC AGC GAA CCA GTT AAG TAC AAT GGA AAA TGC AGA CCT 317 91 L P D S E P V K Y N G K C R P 105</p> <p>318 GGT GGT GGT AAG AAG TAA ATA AGC CAC GTC GGA TAA TCG AGA ATA 362 106 G G G K K * 362</p> <p>363 CTT CGA GCG AGT ATT GCT GAT AAA TAA TGT CTG AGA AAA ACC TCT 407 408 TAA TGA AAT AAA ATG ATT GTA TAA ATG ACA A-- 440</p>		
<p>>contig_1408 Frame -2</p>	<p>2 CTC TTC CGA TCT CGA CGT AGA ATC GAT CTG AAC GAT GAA ACG AAT 46 1 L F R S R R R I D L N D E T N 15</p> <p>47 GAT CTT GTT ATT AGC TGC TTA TTG TTG ATC GAC ATT GTC GTA GGA 91 16 D L V I S C L L L I D I V V G 30</p> <p>92 GGC AAA GAA GGT TAT CCA GTG GAT TCC AGA GGT TGC AAA CTT ACT 136 31 G K E G Y P V D S R G C K L T 45</p> <p>137 TGT TTT TTT ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA GAA TGC AAA CTG 181 46 C F F T G V G Y C D T E C K L 60</p> <p>182 AAA AAG GCA TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG GCG TGT TAC TGC 226 61 K K A S S G Y C A W P A C Y C 75</p> <p>227 TAC GGG CTT CCA GAT TCA GCG TCA GTT TGG GAC AGT GCT ACG AAT 271 76 Y G L P D S A S V W D S A T N 90</p> <p>272 AAA TGT GGC AAA AAA TAA ATT TAT CAT CAC TGA AAT CCC TTT ACA 316 91 K C G K K * 316</p> <p>317 AAT GAA TGT AAT AAA TTT GAA AAA AAA AAA AAA AAT --- 355</p>	<p>6.679,94</p>	<p>2</p>
<p>>contig_1409 Frame -1</p>	<p>>contig_M12_1409 Toxin-like TcoNTxP1 Frame = -1</p> <p>1 ATT AGC TGC TTA TTG TTG ATC GAC ATT GTC GTA GGA GGC AAA GAA 45</p>	<p>6.958,19</p>	<p>1</p>

	<p>1 I S C L L L I D I V V G G K E 15</p> <p>46 GGT TAT CCA GTG GAT TCC AGA GGT TGC AAA CTT ACT TGT TTT TTT 90</p> <p>16 G Y P V D S R G C K L T C F F 30</p> <p>91 ACA GGT GTG GGA TAC TGC GAT ACA GAA TGC AAA CTG AAA AAG GCA 135</p> <p>31 T G V G Y C D T E C K L K K A 45</p> <p>136 TCA TCG GGC TAT TGC GCG TGG CCG GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT 180</p> <p>46 S S G Y C A W P A C Y C Y G L 60</p> <p>181 CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAG AGA GCA ACG AAC AGA TGT GGC 225</p> <p>61 P N W V K V W E R A T N R C G 75</p> <p>226 AAA AGT TAA ATT TGT TTC ACT GAA AAC CCT 255</p> <p>76 K S *</p>		
<p>>contig_4856 Frame +2</p>	<p>2 AGG ATG AAG TCG GCC CTG GCA GTT GTT CTG TTA TTT TTG TTG TTG 46</p> <p>M K S A L A V V L L F L L L 15</p> <p>47 GAA ATG GAA AAA GGA GAG GCG AAA GAC GGT TAC GCC GTA GGT GGC 91</p> <p>16 E M E K G E A K D G Y A V G G 30</p> <p>92 GAT CGC TGT CGA GTT CGA TGC AGT CCA CTA GGA AAA AAT AAG GAT 136</p> <p>31 D R C R V R C S P L G K N K D 45</p> <p>137 TGC GAG ACG GCT TGT AGA AAG AAA GCC GGA AGC TAC TAC GGA TAT 181</p> <p>46 C E T A C R K K A G S Y Y G Y 60</p> <p>182 TGC TAC CTC TGG TTC TGC TAT TGC GAG AAT GTT AGC AAA TCC GCG 226</p> <p>61 C Y L W F C Y C E N V S K S A 75</p> <p>227 GTT GTT TGG GGA AAT CCC ACT CTC GGA CCA TGT CTT TCC GAC GGA 271</p> <p>76 V V W G N P T L G P C L S D G 90</p> <p>272 TAA GTC ACG CTA CCC AGA GTA GTA GTT TCT ATA AAA GAG TGA TCT 316</p> <p>91 *</p> <p>317 GGA ATT ATA AGC GCG TCA CCT AAT TAA TGT GTA ATG TTT CCT GGA 361</p> <p>362 ATT TAT TAA AAA TTA ACC AGA AAT CTC CAA --- 394</p>	<p>C-terminal: PC=7.085,26 PCL=7.198,34 PCLS=7.285,37 PCLSD=7.400,40 PCLSDG=7.457,4 2</p>	<p>4</p>
<p>>contig_8669 Frame -1</p>	<p>1 AAT ATG TTT AAG CTG GAA ATA ATT CTG GCA CTC CTA TTC TTT GGA 45</p> <p>M F K L E I I L A L L F F G 15</p> <p>46 GCG AGA GCG GGG GAT GTA AGA GAT GGT TAC CCA ATA CTT TCA GAT 90</p> <p>16 A R A G D V R D G Y P I L S D 30</p> <p>91 GGC TGC AAG TAT ACT TGC AAA CCC CTT GGA GAG AAT GAA TTC TGC 135</p> <p>31 G C K Y T C K P L G E N E F C 45</p>	<p>C-terminal PEC= 7.149,17 PECH=7.285,23 PECHV=7.384,3 PECHVW= 7.570,38</p>	<p>3</p>

	<p>136 AGT AGA ATT TGC AAA GAG AAA GCG GGT AGT TGG TAC GGA TAC TGT 180 46 <u>S R I C K E K A G S W Y G Y C</u> 60</p> <p>181 TAT TTT TTT GGT TGC TAT TGC ACC GAT GTT TCG AAG AAA GCC GTG 225 61 <u>Y F F G C Y C T D V S K K A V</u> 75</p> <p>226 CTT TTT GGA GAC TCG GGC ACC CCT GAA TGT CAC GTT TGG ATA AAA 270 76 <u>L F G D S G T P E C H V W I K</u> 90</p> <p>271 TAA GAT GAT TTA CTG CAG GCT TAC TTT TCT ACC GTT TAT CCG TCT 315 91 *</p>	<p>PECHVWI= 7.683,47 PECHVWIK=7.811 ,56</p>	
<p>>contig_1383 Frame -3</p>	<p>3 TTA TTA ATT TTC AGT CGA CCC GAC GCA AAG CAG CGC AAC ATG ACT 47 15 M T</p> <p>48 GCG GGA TGG GCC TGT CTG CTG GTG TCG CTC GTC CTT CTC TGG GGT 92 16 A G W A C L L V S L V L L W G 30</p> <p>93 GCG GGA GGA AGC AGA GAC GGT TTT CTC CTG GAT CGA AAT TTC TGC 137 31 A G G S R D G F L L D R N F C 45</p> <p>138 CGA ATC AAG TGT TCC TTT CTG GGG TCC AAC TCG ATG TGC GCG GAT 182 46 <u>R I K C S F L G S N S M C A D</u> 60</p> <p>183 CGG TGC ACC GTC CTG GGA GCT TCC GCC GGT TAC TGC AAC AAT TAC 227 61 <u>R C T V L G A S A G Y C N N Y</u> 75</p> <p>228 GCT TGT TTC TGC ACG GAT TTG AGG GAC CGG GTG AAG ATC TGG GGG 272 76 <u>A C F C T D L R D R V K I W G</u> 90</p> <p>273 GAC GCG GTC CGC TGT CGC AAG CCT TAA GCA TTA TGG TAA TTG CCA 317 91 <u>D A V R C R K P</u> *</p> <p>318 TAT GAT TAT CAC GTT TTC CTG TAC CGA AAA TAA ACC AAT TGT GCC 362 363 CGC T-- 368</p>	<p>7.308,43</p>	<p>6</p>
<p>>contig_4817 Frame -3</p>	<p>3 AAC ATT CGT AAT GTA ATA AAT ATT ATT TTT AGT ATT CAG TCG AAG 47 48 CCT AAG CTT TTC ATA ATA AAG ATC TAA ACA AGA AAC TCT AAG AAA 92</p> <p>93 ATA ACA ATG AAT AAT GCT AAA TTA TTG ATC TAT TAT ATA ACA GTA 137 45 M N N A K L L I Y Y I T V</p> <p>138 ATG AGC TCG ATT AAT TTG GCG ACG ACG GAT GCG AAC CAG TGG TAT 182 46 M S S I N L A T T D A N Q W Y 60</p> <p>183 CCG ATA AAC AAT GAG ACC GTC AGC TAT TAC CTG TGT CAT CAC AGA 227 61 <u>P I N N E T V S Y Y L C H H R</u> 75</p>	<p>6.628,94</p>	<p>3</p>

	<p>228 GAA GAC ACA AAC CGA TGC ATG GAA ATT TGC AAA CTT TTC GAC AGC 272 76 E D T N R C M E I C K L F D S 90</p> <p>273 GAG AAT GCC ACA GGG TTT TGT CTG ACC ACC TTG TGT TAC TGC ATC 317 91 E N A T G F C L T T L C Y C I 105</p> <p>318 AAA CAT GAA AGC ATT TAA AAT CAA GTC TTC TTT AGC TGA ATG ATT 362 106 K H E S I *</p> <p>363 TAA ATG AGC T-- 374</p>		
<p>>contig_4818 Frame -3</p>	<p>3 TGC ATA CTG TAA AAT CTT GCG AAT GAG TAC ATA AAG TTG CAA TTA 47 48 TTT GAA TTA ATT TTA ATT AAA ATA AAG ATG ACT GCT CTG TTC TAT 92 M T A L F Y 30</p> <p>93 TTG CTG CTT CTA ACT TCG GTT ATA ATT GAA ACT CAT CAA GAA TGT 137 31 L L L L T S V I I E T H Q E C 45</p> <p>138 GAT ATG GCG GTG CTA CAC GGA GAT TTT CCA AGA CAA AAT AAT GGA 182 46 D M A V L H G D F P R Q N N G 60</p> <p>183 CAT TTA TAT GTA TGT AAA GAT GTC GAG AAG TGT TCC CTT ATT TGT 227 61 H L Y V C K D V E K C S L I C 75</p> <p>228 AAA GAA CAC GGT ATA AAG AAG ACA GAT TAT GCA AAG TGT TGC TAT 272 76 K E H G I K K T D Y A K C C Y 90</p> <p>273 GAA AAT TGT TTT TGT GAA CAT TTG CAT GGG AAA AAA ATA AGA AAA 317 91 E N C F C E H L H G K K I R K 105</p> <p>318 CAA AAT GTG TCT TAA AAA ATT TGA AAT ATG AAA AAA GTT TCG TGT 362 106 Q N V S *</p> <p>363 AAT ATG AGT TTT TTT TTT ATT TAT TAA ATA AAT --- 398</p>	<p>7.647,60</p>	<p>3</p>
<p>>contig_1615 Frame -3</p>	<p>3 CAG AAA ACA GCC TGC ATA AAA GTA TCA ACA TTA AGT CGA CTT ATC 47 48 ATC ATC GAA TAA ATC GAT CGA TTT TTC ACA AGC GTT ACA AGA TTT 92</p> <p>93 TCA TCG CTT ATT TCA TCG TAA GAG ATG GTA AAA TCT GCA ATG AAG 137 M V K S A M K 45</p> <p>138 ATT GTA ATT CTC ATA CTC TTT GTT TTG CTG ATC AGA GTG GAG AGT 182 46 I V I L I L F V L L I R V E S 60</p> <p>183 AAG AGA AAT GGT TAT CCA GAT ATT AAT GAT GGT AAA TCC TTT ACC 227 61 K R N G Y P D I N D G K S F T 75</p> <p>228 TGC CGT ACC ACC GTT GAA GAT TCT GAC GAA GAC TTT TGC GTA AAT 272 76 C R T T V E D S D E D F C V N 90</p>	<p>8.142,57</p>	

	<pre> 93 AGT GAA GCG ACA CAG AAG AAC TGT CGT TCC AAA AGG GAT TGC CAA 137 31 S E A T Q K N C R S K R D C Q 45 138 ACC GTG TGT ATG GTT GTT GAT AGA TGT CAA TAT GGA ACT TGT TAC 182 46 T V C M V V D R C Q Y G T C Y 60 183 TGC AAA GGA AAT GGA AAA TAA TAT TAA TGA AAT TAA TTC ATT CCT 227 61 C K G N G K * 228 ATA TCG ATT ACA TTA TTT TCG TGA ATA AAC TAA AGA AAT AAA AAT 272 273 AAT TCT TTG AAT TTT TGT TTG GCC C-- 299 </pre>		
<p>>contig_1133 Frame -3</p>	<pre> 3 GCT CTT CCG ATC TGT TAG AAA AAT CAA AAT CGA AAG CAT AGA CTC 47 48 ATC GAA AGC AGC ATG CAC TCC TCC GCT TTC ATT TTA ATT CTC TTT 92 M H S S A F I L I L F 30 93 TCC TTG GCA GTA ATC AAC CCT ATA TTC TTC GAT ATG AAA GCA GAA 137 31 S L A V I N P I F F D M K A E 45 138 GCT GGG TGT ATG CTA GAA TAT TGT GCA GGG CAG TGC AGA GGG AAA 182 46 A G C M L E Y C A G Q C R G K 60 183 GTT AGT CAA GAC TAC TGT CTT AAG AAT TGC AGA TGC ATT CGA AGA 227 61 V S Q D Y C L K N C R C I R R 75 228 GAT TTG ACT ATA AAT GAA TTA CTT CTA AGT GGA ATG AAA GTT TAA 272 76 D L T I N E L L L S G M K V * 90 273 TGG CTT AAA ATA TTC GGT TGA TTT CCT GAT TGT TCC TGA TGA TAT 317 318 TTT GTT TCT GAA GAA AAT CTG TAA AAA AAT AAA CAA TAA AAT TTA 362 363 TTT TGT CG- 371 </pre>	<p>3.194,42</p>	<p>6</p>
<p>>contig_1184 Frame +1</p>	<pre> 1 TTT TGT TCA AAA GCA ATT TCA GAG AAA GGT GAA ACA GTG CTG AAA 45 46 AAC ATG AAA GCT TTC TAC GGT ATA CTG ATA ATA TTT ATT TTT ATT 90 M K A F Y G I L I I F I F I 30 91 TCG ATG CTC GAT TTG AGC CAG CAA GTT TTT ATA AAT GCA AGA TGT 135 31 S M L D L S Q Q V F I N A R C 45 136 AGA GGA TCG CCT GAG TGT TTG CCG AAG TGT AAA GAA GCA ATA GGG 180 46 R G S P E C L P K C K E A I G 60 181 AAG TCG GCC GGC AAA TGT ATG AAC GGT AAA TGC AAA TGC TAT CCA 225 61 K S A G K C M N G K C K C Y P 75 226 TGA GAT TGC CGC GAA ATA TTA TCA AAT CAT TCT GAA CTG TTT ATG 270 </pre>	<p>3.983,93</p>	<p>8</p>

	76 * 271 AAA AAC GTG TTG ATA CTT TAC TGC TAA TAA TAT TAT AAT GAA CAT 315 316 TTA AGA ACA GAG A-- 330		
>contig_4778 Frame -2	2 ATA CTG ATC ATA TTT ATT TTA ATT TCG ATG CGT AAG TAT ATT TTT 46 M R K Y I F 15 47 CGC TTC ATT GCT AAT GTA TAC GGA TTT AAT AAA ATC ATT CAT TTT 91 16 R F I A N V Y G F N K I I H F 30 92 AAA TAT ATT TCA GTC GAT TTG AGC CAG CAA GTT TTT ATA AAT GCA 136 31 K Y I S V D L S Q Q V F I N A 45 137 AGA TGT AGA GGA TCG CCT GAG TGT TTG CCG AAG TGT AAA GAA GCA 181 46 R C R G S P E C L P K C K E A 60 182 ATA GGG AAG TCG GCC GGC AAA TGT ATG AAC GGT AAA TGC AAA TGC 226 61 I G K S A G K C M N G K C K C 75 227 TAT CCA TGA GAT TGC CGC GAA ATA TTA TCA AAT CAT TCT GAA CTG 271 76 Y P * 272 TTT ATG AAA AAC GTG TTG ATA CTT TAC TGC TAA TAA TAT TAT AAT 316 317 GAA CAT TTA AGA ACA GAG --- 337	3.983,93	12
>contig_1230 Frame -2	2 AGT CTT CAA AAG GAT ATC AGC CAT AAA AGT TTT ATA TTC AAT TCT 46 47 GAT AAT ACG AAA AAC ATG AAA GTT TTA TGT GGT ATT CTG ATA ATA 91 M K V L C G I L I I 30 92 TTT ATC TTA TGT TCA ATG TTT TAT TTA AGC CAA GAA GTT GTT ATA 136 31 F I L C S M F Y L S Q E V V I 45 137 GGT CAA AGA TGT TAC AGA TCG CCT GAC TGT AAT TCA GCG TGT AAG 181 46 G Q R C Y R S P D C N S A C K 60 182 AAA TTT ATA GGA AAG GCT ACA GGC AAA TGT ACA AAT GGC AGA TGC 226 61 K F I G K A T G K C T N G R C 75 227 GAC TGT TAA ACA TAA CTG TAC TGT TCC CGT AAA AGA GTA ATA CAT 271 76 D C * 272 GTA CTT GAT TAT TGT ATA CTA AGC ACT ATC ATG TAA TTT TCG CAT 316 317 GCT AAC GTA GTA ATT GTA AAA TAT TTT ACA CAG TTT CAC ATT CAA 361 362 AGG ATT CTA CAG TGT AAG TCT GTT CAG TTA AAA ATA GTT GTC AAA 406 407 ATT AAA ATG ATT TGA TGT TAT GAA TTC GAC ACA AAT GAC TCT GGC 451 452 TTT TGA TAA AAA TTA ACT TCT AAT GAC AAG ATT CTG TAT TTC TTT 496 497 TGT TTT TTT GAA TTA AAA TTA CAT AAT CAG TGA A-- 532	3.775,76	3

<p>>contig_1286 Frame -1</p>	<p>1 TTA ACA GAC CTT GCA GGT GTG ACG TGT GGA TGA AAC TTC AGT TTA 45 M H F S G V V</p> <p>46 TTC GAT CTA TTA AGT GGT AAC AGC ATG CAT TTC TCC GGT GTT GTT 90 30</p> <p>91 TTA ATT CTT CTC TCC ATG ACT CTG GTC AAT TTT GTT TTC GTC GAA 135 31 L I L L S M T L V N F V F V E 45</p> <p>136 ACC CAA GTT AAA ACT GGC CAA TAT GTT AAA TGC AAA TAT AAT CTT 180 46 T Q V K T G Q Y V K C K Y N L 60</p> <p>181 TGT GAA AAG TCA TGC CAA GAA GAA AAA GGA AAA AGA ACG GGA TAT 225 61 C E K S C Q E E K G K R T G Y 75</p> <p>226 TGT AGC AAT CCA GAG TGT GTA TGC TCC AAG GAC TAA AAT AAA ACA 270 76 C S N P E C V C S K D * 76</p> <p>271 CAT GCT TTA AAA ACT GAA AAG TCA TGC CAA GAA GAA AAA G-- 312</p>	<p>4.558,09</p>	<p>3</p>
<p>>contig_1571 Frame -1</p>	<p>1 AAT ATT TTG AAC AGA CTA TTA TCC TTC TCT GAA AAT ATG CAA CTT 45 M Q L 15</p> <p>46 TTC TAC GGT TTA CTG TTA ATG TTT GTC TTA TGT TCC TCG ATC CAT 90 16 F Y G L L L M F V L C S S I H 30</p> <p>91 TTG AGT GAG CAA TGG TGC TCC ACC TGC CTC GAT CTT GCT TGC GGA 135 31 L S E Q W C S T C L D L A C G 45</p> <p>136 GCC TCG AGA GAA TGT TAC GAT CCC TGT TTT AAA GCA TTC GGA AGA 180 46 A S R E C Y D P C F K A F G R 60</p> <p>181 GCT CAC GGC AAA TGT ATG AAT AAC AAA TGC AGA TGT TAT ACA TAA 225 61 A H G K C M N N K C R C Y T * 75</p> <p>226 CAT CTT ACT GTT TAC GTA AGA AAT ACA AGA TTA CTG TGG AAT AGT 270 271 TTG TTA ATA ATA ATA AAA ATG TAA AAT TAA AAA TAA GTT TGA ATA 315 316 TGT G-- 321</p>	<p>4.503,89</p>	<p>3</p>
<p>>contig_4765 Frame -3</p>	<p>3 CTC TTC CGA TCT GGT GAA ACA GTG ATT TGC CGA AAA ATG AAA GCT 47 M K A 15</p> <p>48 TTC TAC GGT ATA CTG ATA ATA TTT ATT TTT ATT TCG ATG GTC GAT 92 16 F Y G I L I I F I F I S M V D 30</p> <p>93 TTG AGC CAG CAA GTT TTT ATA AAT GCA ACA TGT AAA ATA TCA GAT 137 31 L S Q Q V F I N A T C K I S D 45</p> <p>138 CAG TGT AGG CCG AAG TGT AGA GAA GCA GTA GGA AGG CCT AAC AGC 182</p>	<p>4.426,17</p>	<p>12</p>

	46	<u>Q C R P K C R E A V G R P N S</u>	60		
	183	AAA TGT ATA AAC AAA AAA TGC AAA TGT TAT CCA TCA AGT GGA TAA	227		
	61	<u>K C I N K K C K C Y P S S G *</u>	75		
	228	CAT TTG CAT TTT TTG TTA ATG ATG TTT ATG TTA AAA ATG CAA ATG	272		
	273	TTA TCT ATG AGA TTG CCG TGG AAG ATT ATC AAA TCA TTG TGG ACT	317		
	318	GTT TAC GAA GAA ATG TAT TGA TAA TTT ACT AAT AAT AAT AAT AAT	362		
	363	AAT AAT GTA AAT TTA AGA ATA TAT TAG TAG TAC TGC ATA ACT ATG	407		
	408	ATT TAG TGT AGG CCT ATT TTA ATA TCA AAG TTT TGA CAA TAA CTT	452		
	453	AAT GAT TTA AAA TTA TAA TGT AAA TTT TCT GTA TTG TTT TTG TTT	497		
	498	TCT TCA AAT AAA ATT CAT AAG CAT GAA --- 527			
	2	TTA CGT CTT TGA AGT CAT TAA ATT CAT TAC TGA TGT TAT TAC TAT	46		
	47	AGT TTA TTG CAT TTT ATC GTA TAA ATA GTA ACA TTT TGT TCA AAA	9		
	92	GCA ATT TCA GAG AAA GGT GAA ACA GTG CTG AAA AAC ATG AAA GCT	136		
		M K A	45		
	137	TTC TAC GGT ATA CTG ATA ATA TTT ATT TTA CTT TCG ATG CTC GAT	181		
	46	F Y G I L I I F I L L S M L D	60		
	182	TTG AGC CAG CAA GTT TTT ATA AAT GCA ACA TGT AAA ATA TCA GAT	226		
	61	L S Q Q <u>V F I N A T C K I S D</u>	75		
>contig_7980 Frame -2	227	CAG TGT AGG CCG AAG TGT AGA GAA GCA GTA GGA AGG CCT AAC AGC	271		
	76	<u>Q C R P K C R E A V G R P N S</u>	90	5.131,56	6
	272	AAA TGT ATA AAC AAA AAA TGC AAA TGT TAT CAA AAT GCA AAT GTT	316		
	91	<u>K C I N K K C K C Y Q N A N V</u>	105		
	317	ATC CAC TTG AGT GGA TAA CAT TTG CAT TTT TTG TTA ATG ATG TTT	361		
	106	<u>I H L S G</u> *			
	362	ATG TTA AAA ATG CAA ATG TTA TCT ATG AGA TTG CCG TGG AAG ATT	406		
	407	ATC AAA TCA TTG TGG ACT GTT TAC GAA GAA ATG TAT TGA TAA TTT	451		
	452	ACT AAT AAT AAT AAT AAT GTA AAT TTA AGA ATA TAT TAG TAG TAC	496		
	497	TGC ATA ACT ATG ATT TAG TGT AGG CCT ATT TTA ACA TCA AAG TTT	541		
	542	TGA CAA TAA CTT AAT GAT TTA AAA TTA TAA TGT AAA TTT TCT GTA	586		
	587	TTG TTT TTG TTT TCT TCA AAT AAA ATT CAT AAG CAT GA-	625		
>contig_8010 Frame -1	1	TCA GAC GTG TGC TCT TCC GAT CTC ATG AAT CTC AAG CAT CGC ATC	45		
		M N L K H R I	15		
	46	TTT ATA GGA TTG CTT CTA GCG ATT GGC ATA TTC AGC TTT GCT AAA	90		
	16	F I G L L L A I G I F S F A K	30	3.961,66	3
	91	GCT GGT GTC AAC GAT GAC AAA GAT TGC AAT CAT TTA GGT CGG CCA	135		
	31	A <u>G V N D D K D C N H L G R P</u>	45		

	271	ATG GAT AAG AAT TGT TCT AAA GAA TAA AAC TGT ATA AAG CCG	312		
>contig_5984 Frame +1	1	GAA AAA CAG ACG TCA TTG TCG AAT AGT TAA CAT TTG AGA GAA AGG	45	4.020,86	2
	46	AGT TAT TGT AAT GAA TTG TTT CTA ATT CAT AAG CAG TAG TTT ATG	90		
	91	AAT TGC AGA AAT ATA ATT TGA AAT ATT ACA AGA AAA AAG TGT ATT	135		
	136	TCT CGA AGC AGT TTT CAA GTA AAG ATG AAT AAA GCG CTT TTA ATG	180		
		M N K A L L M	60		
	181	GTT ATC TTG GTT CTT TCC GTG CTT CTA GTG GCA AAT GTG TCA CCA	225		
61	V I L V L S V L L V A N V S P	75			
226	ATA AGA GTG CCT ACA GGA GGA TGT CCT TTT TCG GAT GCA CTT TGT	270			
76	I R V P T G G C P F S D A L C	90			
271	TCC ACT TAT TGC AAG AGG AAT AAG TAT GGC AGA TTT GGA AAA TGT	315			
91	S T Y C K R N K Y G R F G K C	105			
316	TAT GGA ACA AGT TGT AAA TGC TTG ATT TAA TAC AGA TTG GAG A--	360			
106	Y G T S C K C L I *				
>contig_7803 Frame +3	3	TCT TCT CTG ATA CCG AAG AGA AAT CGA GCT CTG ATT ACG TAG AAC	47	6.078,85	1
	48	AGA AAA GTT TTT GCT GAA TAT TTC GAA TAA TTC GTA TAG TTA ATT	92		
	93	CGA GAA GTT TGC CAA AAG ATA GAA GCT ATG AAG TCC GCC ATC GTG	137		
		M K S A I V	45		
	138	TTA TTG ATA TTT ATT TTC GTT TAC ACA TCT CTG GCT CAG CAC TAC	182		
	46	L L I F I F V Y T S L A Q H Y	60		
	183	CAA AAA GAA GAA TGG TAT CCT TTC AGA GTT GGT AAT GGC CAC CTC	227		
	61	Q <u>K E E W Y P F R V G</u> N G H L	75		
	228	AGT TGC TCC AAC AGA CTC GGG ATG TCC GAA AAC GAC TTT TGT CGC	272		
	76	S C S N R L G M S E N D F C R	90		
273	AAG TTA TGC AAT CGA GAC GGT AAA TGG AGG AAT TCG AAA TGT AAA	317			
91	K L C N R D G K W R N S K C K	105			
318	GAG CAT TAC TGC TAT TGC GGT CCT CAA CGT TTC TAC CGT GCT ATC	362			
106	E H Y C Y C G P Q R F Y R A I	120			
363	AAA CTT TAG ATT CGC TTC CCA CGA AAA ACA TAC TGT TTG CAA ATT	407			
121	K L *				
408	ATG TAA TCT TAC TAT CGA TTT TCT TTA TCC AGT TTC CAT GTA TTT	452			
453	GCG AAT TCG TTG TCA AAC AAA TCA TAA TTA CAA GTG TTT GCT GTA	497			
498	GTT AAC ATT ATA AAA TTG TTG ATT AAT GAA TTA TCA TTG TAA TCT	542			
543	GTA AAA TGC TAT TTC TTT GAA TAA AAT CGA AC-	575			

Outras					
>contig_1378 Frame -3	3	TAT TTC TGG CAT AGC AAC ATG AAT CTC AAG CAT CGC ATC TTT ATA M N L K H R I F I	47 15	4.901,08	2
	48 16	GGA TTG CTT CTA GCG ATT GGC ATA TTC AGC TTT GCT AAA GCT GGT G L L L A I G I F S F A K A G	92 30		
	93 137 31	GTC AAC GAT GAC AAA GAT TGC AAT CAT TTA GGT CGG CCA TGC AAT V N D D K D C N H L G R P C N	45		
	138 182 46	TAC CAC AGA GAT TGT TGT AGC TAT GGA GAA CGA TGC ATC AGC ACT Y H R D C C S Y G E R C I S T	60		
	183 227 61	GGA TAT AAA TAT TAT TGT AAA GTA GAT CCA GGT CCA TGA AAT GAC G Y K Y Y C K V D P G P *			
	228 272	ATC CTC ACT CTT TTA ATA ACT GTA CCA ATG AAA TTT CTA TTT TAA			
	273	ATT AAA AGG TTT TAA AGC AGA TCG GAA GAG CG- 305			
>contig_1424 Frame +3	3	CTC TTC CGA TCT ATC AAT ATG AAG ATT GCT TTC ATC GTG TTG CTC M K I A F I V L L	47 15	5.467,20	5
	48 16	CTC GTT CTC AAT TGC ATT GAT AAC ACT CAC GCA ATG GAA ATA AAT L V L N C I D N T H A M E I N	92 30		
	93 137 31	TAC ACT GAT CGC GAT TTG GAC AAT GTA TTC ATA GAC AAG AGG CAA Y T D R D L D N V F I D K R Q	45		
	138 182 46	ATA TGC CAT GAT TTA GGA AGT ACA TGT TCA TCA GGC TCT CAA AAC I C H D L G S T C S S G S Q N	60		
	183 227 61	TGT TGC GAA CCA TAT TGC TGC AGC TTC GGA CAA TGT TCA TCT TGT C C E P Y C C S F G Q C S S C	75		
	228 272 76	TAA CCA TCT GTA TTT ACG ATT TTA TTC CAG AGA AAA TCT GGA ATT *			
	273 317	AAA CTA ATA AAA ATC TGT AAT AGT AAA TAA GCC AAT GAT TGT TTT			

	318 AGA AAA ATA TAT TTT AAT GTA TTT CAA AAA GTA ACT TTG CCA TAT 362		
	363 TAA ATT TAA AAA ATT AAT GGA AAA TTC TCT TAA ATT TTT CAA AC- 40		
>contig_8631 Frame -2	2 ATA AAA CGA TAC GAG AAT TTA AAA AAA TTA CTT TTG CAA GCA ACA 46 47 GAT AGA ATT CCA AGT GAT TTC ATA AAT TCG AAT AAA AGT CAA AAA 91		
	92 AAG ATG AAA GCA ATC ATT ATC TTC TTT GTG TTG GCT CTC ATC TTA 136 M K A I I I F F V L A L I L 45		
	137 TGT CTT TAT GCC GTA ACA ACT GTA GAA GGT GCT TGC CAA TTT TGG 181 46 C L Y A V T T V E G <u>A C Q F W</u> 60		
	182 AGT TGC AAT AGC AGT TGT TTA TCG AGA GGA TAC AGA GGA GGA TCG 226 61 <u>S C N S S C L S R G Y R G G S</u> 75	3.581,44	1
	227 TGC TGG GGA GCA CTT AAT CAA TTT TGC CAA TGC TAT TGA AGG ATC 271 76 <u>C W G A L N Q F C Q C Y</u> *		
	272 GAT AAT ATT CAT AAT GTT AAA TAT CAC CGA AAT CAA CTT AAA ACC 316		
	317 ATT TTA AAT GTT TGA TCT TAA TCG TAG ATT TGT ATA GAA TTA AAG 361		
	362 TGT GCA AG- 370		

Anexo II

ARTIGO SUBMETIDO

The scorpion toxin Tf2 from *Tityus fasciolatus* promotes Na_v1.3 opening

Camargos, T.S.¹, Bosmans, F.^{2,3}, Rego, S.C.¹, Mourão, C.B.F.¹, Schwartz, E.F.^{1*}

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxinologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

² Department of Physiology, Johns Hopkins University – School of Medicine, Baltimore, MD, USA

³ Solomon H. Snyder Department of Neuroscience, Johns Hopkins University – School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

*Corresponding author: efschwa@unb.br (EFS)

Abstract

We identified Tf2, the first β -scorpion toxin from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. Tf2 selectively activates human (h)Na_v1.3, a neuronal voltage-gated sodium (Na_v) subtype involved in epilepsy and nociception. Tf2 shifts hNav1.3 activation voltage to more negative values, thereby opening the channel at resting membrane potentials. Seven other tested mammalian Na_v channels (Na_v1.1-1.2; Na_v1.4-1.8) are insensitive to Tf2 upon application of 1 μ M toxin. Therefore, the identification of Tf2 represents a unique addition to the repertoire of animal toxins that can be used to investigate Na_v channel function.

CAPÍTULO DO LIVRO

Scorpion Venom Gland Transcriptomics

Martha Rendón-Anaya, Thalita S. Camargos, Ernesto Ortiz

Abstract

For decades, the study of venomous animals has focused on the isolation and biochemical characterization of specific venom components that have medical or biotechnological importance. Indeed, scorpions have been extensively studied under this optics, which has led to the identification of hundreds of different transcripts encoding toxic peptides. However, scorpions are interesting organisms not only because of their toxin diversity but also because they represent the most ancient terrestrial animals that fossil records have identified. About 2,000 species have been described around the world, which also implies that scorpions are extremely well-adapted arthropods that have managed to survive in different environmental conditions. Even though the divergence timing of scorpions places them as interesting model organisms for evolutionary inferences, little is known about the genomic organization, speciation events, and population dynamics of these arthropods.

Different “omic” approaches have become a very powerful strategy for understanding the complexity of venomous animals. Transcriptomics, in particular, has been widely used to explore the transcriptional diversity of venom glands of several scorpion species. Recently, high-throughput sequencing platforms have substantially improved our capacity to describe biological features of scorpions but, most importantly, have outlined new directions toward a more complete understanding of the evolution of these arthropods.

In this chapter, those transcriptomic strategies followed in the last two decades that went from cDNA cloning to next-generation sequencing methods will be described. Some biological and evolutionary questions about scorpion speciation and venom diversification will also be addressed. Finally, an attempt to raise some future directions in the field will be made.