

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS To4 E To5,
DUAS β -TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus*
obscurus.**

HARRY MORALES DUQUE

BRASÍLIA DF, 2017

HARRY MORALES DUQUE

**CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS To4 E To5,
DUAS β -TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus*
obscurus.**

Tese apresentada ao programa de
pós-graduação em Biologia Animal
como requisito para obtenção do
título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth
Ferroni Schwartz

BRASÍLIA DF, 2017

Tese de Doutorado

Harry Morales Duque

Título:

**“CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS To4 E To5,
DUAS β-TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus
obscurus.*”**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. **Elisabeth Ferroni Schwartz**

CFS-IB-UnB

Presidente da banca

Profa. Dra.

Prof. Dra.

Márcia Renata Mortari

Nádia Skorupa Parachin

Membro titular

Membro titular

Prof. Dra.

Prof. Dra.

Caroline Barbosa Farias Mourão

Djane Braz Duarte

Membro titular

Suplente

Brasília, 24 de maio de 2017.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos primeiramente são encaminhados ao governo brasileiro por permitir meu desenvolvimento acadêmico. Agradecimento à Universidade de Brasília pelas oportunidades oferecidas para meu crescimento na pós-graduação. Igualmente, agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e FAP-DF pelo apoio.

Agradecimento especial para minha orientadora Doutora Elisabeth Ferroni Schwartz porque acreditou em mim, deu seu apoio e muita compreensão. Agradeço igualmente à banca avaliadora desta tese pelo seu tempo dedicado à este trabalho. Agradeço ao Dr. Lourival Possani por facilitar o laboratório da UNAM e seu grupo de pesquisa, ao Dr. Ernesto Ortíz, à Dra. Rita Restano-Cassulini, à Dra. Juana María Jimenez, à Dra. Lúdia González, entre outros colegas por me assessorar na prática molecular, além de oferecer sua qualidade humana. Agradeço à Dra. Maura Vianna Prates da CENARGEN pela assessoria no sequenciamento de proteínas como parte desta pesquisa.

Agradecimento à doutora Márcia R. Mortari e a seu grupo de pesquisa em neurofarmacologia, ao doutor Osmino Pires Jr, à doutora Marisa Rangel e ao doutor Leandro Ambrósio pelas dicas científicas, aos professores Carlos Schwartz (*in memoriam...*) e Antônio Sebben pela companhia no laboratório, aos técnicos, Washington de Oliveira, Adolfo Souza, Elias Sabiá e ao Danilo de Oliveira pelas ajudas e convivência. Agradeço muito ao colega Diogo Tibery pelas enormes ajudas na pesquisa e ao Daniel da Mata pela companhia durante meus experimentos.

Agradecimento aos colegas e amig@s que se tornaram minha família aqui no Brasil: à Thalita Soares pelo seu apoio constante durante tudo este tempo, à Andrea Carvalho pelos momentos compartilhados, à Solange pela sua amizade legal, à Caroline Barbosa, à Sra. Jaqueline Barbosa e à Élide Cleyse pela sua simpatia e auxílio quando eu precisei, à Beatriz Sarmiento e a Cláudia Arenas, velhas colegas desde a graduação, por compartilhar tanto comigo. Agradecimento ao camarada Cesar Prías pelas ajudas prestadas e a nossa amizade. Aos demais colegas do laboratório pela sua amizade. Aos amigos

Fabiolo Hurtado e Osmelio Fleitas pela camaradaria e à Paolin Cáceres pela amizade.

Agradeço à minha família pela esperança investida à mim: Ao meu filhinho Daniel Alberto por aguentar contra sua vontade estes passos da vida. Agradeço muito às minhas irmãs Evelin, Khateryne, ao meu irmão Steven, minhas sobrinhas e sobrinhos por suportar minha ausência nesta faixa de tempo. Agradeço muito à minha família Duque Betancourth, pois eles foram os que deram este último ânimo para eu finalizar:

Fitzgerald	Arles	Carolina
Paula	Blanca	James
Sara	Luis	Karen
Sebastian	Nidia	Liliana
Nicolai	Nora	Luis
	Nubia	Luisa
		Mario
		Maritza
		...

Dedicatória

A mi hijo Daniel Alberto Morales que desde que nació há sido la inspiración de mi vida.

RESUMO

Toxinas de escorpiões têm sido alvo de pesquisa dada suas propriedades farmacológicas. Estas toxinas agem sobre quatro tipos de canais iônicos (Na^+ , K^+ , Ca^{++} e Cl^-). As que agem sobre os canais iônicos para sódio (NaScTx) são divididas em dois grupos α - ou β -toxinas segundo seu alvo molecular dentro desses canais iônicos. As primeiras interferem na cinética de inativação e as do segundo grupo afetam a cinética de ativação do canal iônico alvo. Muitas destas toxinas já foram identificadas e testadas sobre diferentes alvos farmacológicos. A maioria é proveniente de escorpiões da família Buthidae, conhecidos como os escorpiões de relevância médica devido à capacidade tóxica de sua peçonha. No entanto, ainda falta elucidar sobre toxinas das peçonhas de espécies potencialmente perigosas à saúde humana.

A pesquisa de toxinas está sendo promissora para diversos estudos e desenvolvimento biotecnológico. Dado que a maioria age sobre canais iônicos, elas se tornam ferramentas para estudar interações ou mecanismos moleculares de ação desses alvos. Portanto, as toxinas podem favorecer direta ou indiretamente no desenvolvimento de estratégias para tratar, por exemplo, doenças como as canalopatias.

Tityus obscurus é um escorpião que ocorre no norte do Brasil, onde acontecem acidentes por sua picada. Os componentes de sua peçonha estão sendo pesquisados e os alvos farmacológicos das NaScTxs descritas ainda não foram identificados. Neste trabalho, pela primeira vez, duas NaScTxs (To4 e To5) foram purificadas da peçonha de *T. obscurus* por cromatografia RP-HPLC, sequenciadas por *in-source decay* ISD e por meio da biblioteca de cDNA previamente descrita. A validação do alvo molecular específico destas toxinas foi realizada testando sete subtipos de canais iônicos humanos $\text{hNa}_v1.1$ – $\text{hNa}_v1.7$ usando a técnica eletrofisiológica de *patch clamp*. Adicionalmente, tentou-se expressar a toxina To5 heterologicamente em *Escherichia coli*, visando comparar a atividade eletrofisiológica desta com a nativa.

Nossos resultados mostraram que tanto a To4, quanto a To5 são β -toxinas que afetam a ativação e correntes de todos os canais iônicos testados. Estas toxinas não mostraram algum efeito tipo α , assim, descarta-se a possibilidade de estas agirem sobre outro sítio destes canais testados. Futuros testes eletrofisiológicos poderão ser feitos sobre canais iônicos próprios de inseto, já que estas duas toxinas potencialmente agem nos dois grupos taxonômicos. Dada sua capacidade promiscua sobre os hNa_vs testados, as toxinas To4 e To5 mostram ser componentes virtualmente tóxicos da peçonha deste escorpião. Estes e outros componentes dessa peçonha tornam do *T. obscurus*, um escorpião potencialmente perigoso à saúde humana.

Palavras chave: β -toxinas, canal iônico, *E. coli*, NaScTx, To4, To5, *T. obscurus*

ABSTRACT

Scorpion toxins have been research targets due its pharmacological properties. They can target four ion-channels types (Na^+ , K^+ , Ca^{++} e Cl^-). Such toxins active on sodium channels (NaScTx) have two interaction points on them, thus being classified as α - or β -toxins. The first group interferes with the kinetic inactivation, and the second group affects the kinetic activation from sodium channels (Na_vs). Several toxins were identified and tested on pharmacological targets. Most of these are from Buthidae scorpion family, a taxonomic group considered as of medical relevance. It is necessary to elucidate toxins from potentially dangerous scorpion venom species yet not described. The toxins study is being promissory to diverse research and biotechnological development. Due that the most of them target on ion channels, they would become tools to ion channels interaction studies or action molecular mechanisms analysis of them. Thus, toxins could promote direct or indirectly the strategies development to treat, for example, diseases as channelopathies.

Tityus obscurus scorpion from north of Brazil is cause of accidents for sting. Its venom components are being investigated, among them, the described NaScTxs do not have the target Na_v defined. By first time, in this work, two *T. obscurus* NaScTxs (To4 e To5) were purified from venom by RP-HPLC chromatography, sequenced by in-source decay ISD and by cDNA library previously described. The specific molecular target validation was testing the human Na_vs ($\text{hNa}_v1.1$ – $\text{hNa}_v1.7$) by electrophysiological technique patch clamp. Additionally, To5 toxin was expressed in *Escherichia coli* to perform futures electrophysiological tests. Our results showed than To4 and To5 are β -toxins affecting the both activation and ionic currents from all hNa_vs isoforms tested. These toxins did not show α - activity discarding other possible target site on these hNa_vs . Electrophysiological tests on insect Na_vs are recommended because these toxins are potentially active on them. The promiscuous capacity of the To4 and To5 toxins on hNa_vs make of them compounds potentially toxic to humans. The *T. obscurus* venom would be potentially dangerous to human health.

Keywords: β -toxins, *E. coli*, ionic channel, NaScTx, To4, To5, *T. obscurus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural da clorotoxina.....	4
Figura 2. Representação estrutural das toxinas que agem sobre canais iônicos para o cálcio.....	5
Figura 3. Estruturas tridimensionais de KTxS.....	7
Figura 4. Representação esquemática do modelo estrutural do Na _v	11
Figura 5. Domínio sensor de voltagem apresentado pelo algoritmo Rosetta. ..	12
Figura 6. Desenho representativo da estrutura da subunidade α de um Na _v . ..	13
Figura 7. Representação estrutural de uma α -toxina.....	15
Figura 8. Alinhamento de α -toxinas.....	17
Figura 9. Alinhamento das α -toxinas próprias de escorpiões do gênero <i>Tityus</i>	18
Figura 10. Representação estrutural de duas β -toxinas.....	19
Figura 11. Representação estrutural de uma β -toxina inseto-excitatória.	20
Figura 12. Alinhamento de β -toxinas.....	22
Figura 13. Alinhamento das β -toxinas próprias de escorpiões do gênero <i>Tityus</i>	23
Figura 14. Alinhamento das NaScTxS próprias do escorpião <i>T. obscurus</i>	24
Figura 15. Alinhamento da To5 e suas toxinas homólogas.....	25
Figura 16. Transcrito original da To5.....	32
Figura 17. Sequência nucleotídica otimizada a partir do precursor original da To5.....	33
Figura 18. Processo de construção do material gênico que expressa a To5 com histidinas.	35
Figura 19. Vetor de clonagem pBluescript II KS (+/-).	37
Figura 20. Vetor de expressão pET-22b(+).	40
Figura 21. Processo geral de expressão heteróloga da To5.....	44
Figura 22. Purificação das toxinas To4 e To5 nativas.....	50
Figura 23. Espectro de massa molecular da To4.....	51
Figura 24. Espectro de massa molecular media da To5.	52
Figura 25. Espectro de massa molecular acurada da To5.....	53
Figura 26. Sequência parcial da To4.....	54
Figura 27. Espectro de sequência parcial da To5 por ISD.....	55
Figura 28. I _{Na} deflagradas com e sem To4 a 70 nM.....	56
Figura 29. I _{Na} deflagradas com e sem To4 a 500 nM.....	57
Figura 30. Representação gráfica dos registros dos Na _v S depois de aplicada a To4.....	58
Figura 31. Variação do <i>shift</i> de voltagem produzido pela To4 sobre os hNa _v S. 59	
Figura 32. I _{Na} deflagradas com e sem To5.....	60
Figura 33. Representação gráfica dos efeitos da To5 sobre os Na _v S testados. 61	
Figura 34. Avaliação da inativação rápida pela constante de tempo nos hNa _v S.	62

Figura 35. Variação do <i>shift</i> de voltagem produzido pela To5 sobre os hNa _v s.	63
Figura 36. Alinhamento de toxinas similares procedentes de <i>Tityus</i> testadas eletrofisiologicamente.....	64
Figura 37. Alinhamento dos segmentos dos Na _v s prováveis alvo de β-toxinas.	65
Figura 38. Gel de poliacrilamida mostrando os passos de extração da proteína de fusão heteróloga.....	66
Figura 39. Gel de poliacrilamida mostrando os passos de extração da proteína de fusão heteróloga.....	67
Figura 40. Massa molecular da proteína de fusão expressa.....	68
Figura 41. To5 fusão produzida em Rosetta (DE3).	70
Figura 42. Cinética enzimática da enteroquinase sobre a To5 fusão.....	71
Figura 43. Tentativa de produção da To5 fusão em SHuffle®T7.	72
Figura 44. Teste enzimático com enteroquinase sobre a To5 fusão produzida em Origami.....	73
Figura 45. Cromatografia da To5His fusão após digestão com enteroquinase.	74
Figura 46. Espectro de massa molecular da fração cromatográfica To5His. ...	75

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Estrutura/função das toxinas escorpiônicas.....	3
Tabela II. Localização, função e doenças relacionadas aos Na _v s.....	9
Tabela III. Massas moleculares da To5 nativa e recombinantes.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

α -ScTx_s, α -toxinas: Toxinas próprias de escorpiões que agem sobre canais iônicos para sódio no sítio 3 (Explicação detalhada no texto)

β -ScTx_s, β -toxinas: Toxinas próprias de escorpiões que agem sobre canais iônicos para sódio no sítio 4 (Explicação detalhada no texto)

BeKm-1: Toxina purificada da peçonha do escorpião *Mesobuthus euspeus* que bloqueia canais para K⁺

BmK- β IT, Bm32-VI: Uma β -ScTx_s com atividade excitatória anti-inseto isolada da peçonha do escorpião *Mesobuthus martensii* Karsch

CsslI: Uma β -ScTx_s com atividade antimamífero isolada da peçonha do escorpião *Centruroides suffusus suffusus*

CHO: Ovario de hamster chinês

DAN: 1,5-diaminonaftaleno

EGTA: Ácido Etileno Glicol Tetracético

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

G_{Na}: Condutância ao íon sódio

HCCA: Ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico

HEK: Células embrionárias de rim humano

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

I_{Na}: Correntes produzidas pelo íon sódio

hERG: Gene humano relacionado com canais iônicos tipo *Ether-à-go-go*

KTxs: Toxinas que agem sobre canais para potássio

MALDI-TOF/TOF: Ionização por dessorção à laser assistida por matriz-
Detecção por tempo-de-voo

MeuTXK β 1: Toxina da subfamília β -KTx purificada do escorpião *Mesobuthus eupeus*

MS/MS: Espectrometria de massa/ espectrometria de massa

NaScTx: Toxinas que agem sobre canais para sódio

Navs: subtipos de canais iônicos para sódio

NMDG: N-Metil-D-glucamina

OmTx4: KTxs purificada da peçonha do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDB: Banco de dados de proteínas

PBS: Salina tampão de fosfato

PPB: Tampão de proteína periplasmática

ppm: Partes por milhão

RP-HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

TFA: Ácido Trifluoroacético

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosida

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 TOXINAS ESCORPIÔNICAS.....	3
1.2.1. Toxinas que modulam a atividade dos canais para cloreto	3
1.2.2. Toxinas que modulam a atividade dos canais para cálcio	4
1.2.3. Toxinas que bloqueiam os canais para potássio	5
1.3 CANAIS IÔNICOS PERMEÁVEIS A SÓDIO	8
1.3.1. Estrutura dos canais iônicos para sódio.....	10
1.3.2. Modo de ação dos canais iônicos para sódio.....	11
1.3.3. Pontos de interação dos Na _v s e NaScTxS	12
1.4 TOXINAS QUE MODULAM A ATIVIDADE DOS Na _v s	13
1.4.1. α-toxinas	14
1.4.2. β-toxinas	18
1.5 NaScTxS DO ESCORPIÃO <i>Tityus obscurus</i>	23
1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TOXINAS DE ESCORPIÃO.....	25
2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA.....	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HPLC.....	29
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	29
4.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DAS TOXINAS POR ISD.....	29
4.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN	30
4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA	30
4.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	32
4.6.1. Desenho e construção do plasmídeo de interesse.....	33
4.6.2. Produção da proteína recombinante.....	43
4.6.3. Tampões de extração.....	46
4.6.4. Cromatografia de afinidade	47
4.6.5. Avaliação da expressão por gel de poliacrilamida.....	48
4.6.6. Preparação alternativa para Gel de poliacrilamida SDS PAGE	48

4.6.7. Digestão da To5 fusão com enteroquinase.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1 PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS To4 e To5 NATIVAS POR RP-HPLC.....	50
5.2 MASSA MOLECULAR DAS TOXINAS To4 E To5 NATIVAS.....	51
5.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DAS TOXINAS NATIVAS POR ISD	53
5.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA To5 NATIVA POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN	54
5.5 TESTES ELETROFISIOLÓGICOS	56
5.5.1 Atividade da To4 sobre as I_{Na} dos Na_v s	56
5.5.2 <i>Shift</i> de voltagem produzido pela To4.....	57
5.5.3 Atividade da To5 sobre as I_{Na} dos Na_v s	60
5.5.4 <i>Shift</i> de voltagem produzido pela To5	62
5.5.5 Análise de estrutura/atividade de β -toxinas e os hNa_v s.....	64
5.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA To5.....	65
5.6.1. <i>E. coli</i> BL21(DE3)	66
5.6.2 Rosetta (DE3) ρ LysS	69
5.6.3 SHuffle [®] T7(NEB)	71
5.6.4 Origami (DE3)	72
6. DISCUSSÃO	76
6.1 To4 e To5 NATIVAS.....	76
6.2 To5His RECOMBINANTE	83
7. CONCLUSÕES	87
8. PERSPECTIVAS.....	88
9. BIBLIOGRAFIA	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Durante milhões de anos muitos organismos têm desenvolvido ferramentas bioquímicas como mecanismo de predação e defesa (Casewell *et al.*, 2013). Estas ferramentas bioquímicas são diversas moléculas que vão desde estruturas simples, como os alcaloides, até aquelas mais complexas como as proteínas (Dutertre, 2014). Todas elas formam uma mistura denominada de peçonha, veneno ou secreção cutânea segundo o organismo. Cada organismo produz seu próprio arsenal bioquímico que permite a ação destas moléculas nos diferentes alvos, ainda que muitas delas compartilhem características estruturais sendo estas provenientes de organismos de diferentes taxa (Morgenstern & King, 2013).

Os escorpiões, como um pequeno grupo destes organismos, têm sua própria mistura denominada peçonha. Esta é composta por substâncias proteicas e não proteicas (Gómez *et al.*, 2010): enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas e peptídeos. Destes, os peptídeos têm sido descritos como os principais causadores da atividade neurotóxica (Pringos *et al.*, 2011). Dada esta atividade neurotóxica procedente da peçonha da maioria destes organismos, especialmente daqueles da família Buthidae, existem numerosos trabalhos de caracterização dos alvos moleculares desses peptídeos visando a descoberta de novas ferramentas farmacológicas (Ortiz *et al.*, 2015), ou mesmo o entendimento do processo evolutivo pelo qual os escorpiões atravessam.

Apesar da grande variedade de toxinas descritas da peçonha de escorpiões (Rodríguez de la Veja *et al.*, 2010), o universo destas é ainda maior, pois vários autores reiteradamente enfatizam que somente a mínima quantidade foi caracterizada (Possani *et al.*, 1999; Diego-Garcia *et al.*, 2014). Adicionalmente, deste pequeno grupo de toxinas identificadas ainda existem muitas destas sem sua atividade biológica definida (Sunagar *et al.*, 2013). Por outro lado há algumas toxinas com seu alvo bem caracterizado e mostram serem candidatos promissores como futuros fármacos (ver revisão de Gati e colaboradores, 2012).

Contudo, entre as toxinas já caracterizadas, atualmente só uma delas está em processo de aprovação para uso como fármaco para tratamento de um tipo de câncer de cérebro (Cheng *et al.* 2014). Trata-se da TM-601, uma clorotoxina modificada quimicamente, originária da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Mamelak & Jacoby, 2007). Esta consegue se ligar na superfície das células do glioma reduzindo sua capacidade de proliferação (Vetter *et al.*, 2011).

As possíveis explicações ante a falta de avanço biotecnológico destas toxinas são o tempo que toma desenvolver quimicamente elas para afinar e melhorar sua atividade; testes biológicos para identificar e/ou descartar atividade secundária e; sua síntese em quantidades comerciais. Conseguir produzir moléculas grandes como estas requerem de processos complexos e de alto custo.

No entanto, estas fases iniciais de pesquisa permitem avanços biotecnológicos a partir das toxinas que poderiam ser aplicados como futuros tratamentos às diversas doenças envolvidas com canais iônicos, desenvolvimento de inseticidas, antimicrobianos, etc., segundo seja o objetivo da pesquisa. Desta maneira, pesquisar estas toxinas poderia permitir um impacto direto ou indireto sobre este avanço futuro. Por exemplo, as NaScTx, objeto da nossa pesquisa, poderiam ser diretos fármacos para tratamento contra doenças que envolvam canais iônicos para sódio.

Por enquanto, a pesquisa das NaScTx permite avaliar indiretamente seu futuro avanço biotecnológico: Quando é pesquisada a interação destas com seus alvos poderá ser avaliada tanto as características da toxina, quanto a natureza do canal iônico. O conhecimento das propriedades intrínsecas das toxinas permite desenvolver antígenos para produção de antivenenos de espécies perigosas à saúde humana, por exemplo. Conhecer a natureza dos canais iônicos a partir dessa interação permite elucidar seu mecanismo de ação que fornece uma visão prévia que poderia ser usada no tratamento futuro contra doenças envolvidas com canalopatias.

1.2 TOXINAS ESCORPIÔNICAS

As toxinas de escorpiões causadoras das diversas atividades biológicas características do escorpionismo são de natureza proteica. Estas variam em tamanho e estrutura. A maioria são peptídeos, muitos deles empacotados por entre dois a quatro ligações dissulfeto (Mouhat *et al.*, 2004). Estas toxinas estão classificadas principalmente segundo a sua estrutura primária, ainda que caracterizadas conforme seu alvo farmacológico. Antimicrobianos de natureza peptídica (Harrison *et al.*, 2014), neurotoxinas de diversos tamanhos e outras toxinas com alvos moleculares diferentes (Ortiz *et al.*, 2015) têm sido descritos. Dado nosso foco de pesquisa, as toxinas de nosso interesse são as neurotoxinas que agem sobre canais iônicos. A Tabela I resume algumas características estruturais destas toxinas, que por sua vez, são classificadas segundo o canal iônico alvo, como “clorotoxinas”, que modulam a atividade dos canais iônicos para cloreto, “calcinas”, que modulam a atividade dos canais iônicos para cálcio, KTxS, que são exclusivamente bloqueadoras de canais iônicos para o potássio e as NaScTxS, que são toxinas que atuam sobre canais iônicos para o sódio (Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

Tabela II. Estrutura/função das toxinas escorpiônicas. (Adaptado da dissertação Morales D., 2013).

Tipo de toxina	Estrutura		Resíduo(s) de aa chave(s)	Função
	Secundária	Terciária (Ligações dissulfeto)		
NaScTxS	$\beta\alpha\beta\beta, \alpha\alpha\beta\beta\alpha$	3 ou 4	*	Modulam a atividade dos Na _s
KTxS	$\alpha\beta\beta, \beta\alpha\beta\beta, \alpha\alpha\alpha\beta, \alpha\alpha$	2, 3 ou 4	Lys	Bloqueiam os canais para K ⁺
“Clorotoxinas”	$\beta\alpha\beta\beta$	4	Indefinido	Modulam a atividade dos canais para Cl ⁻
Calcinas	$A\beta\beta, \beta\beta\beta\alpha\beta\beta$	3 ou 4	His, Lys, Arg	Modulam a atividade dos canais para Ca ⁺⁺

* As NaScTxS tem múltiplos locais de reconhecimento com seu canal iônico alvo, portanto, está indefinido um único resíduo de aminoácido chave para sua atividade biológica.

1.2.1. Toxinas que modulam a atividade dos canais para cloreto

São poucas as toxinas caracterizadas para esta atividade biológica (Diego-Garcia *et al.*, 2014). No entanto, uma sequência de pesquisas levou a

caracterizar uma clorotoxina (Fig. 1) promissora como fármaco para tratamento contra glioblastoma multiforme (Cheng *et al.* 2014). Estas toxinas se caracterizam por serem compostas de 31 resíduos de aminoácidos (Mouhat *et al.*, 2004) e possuir 4 ligações dissulfeto (www.uniprot.org).

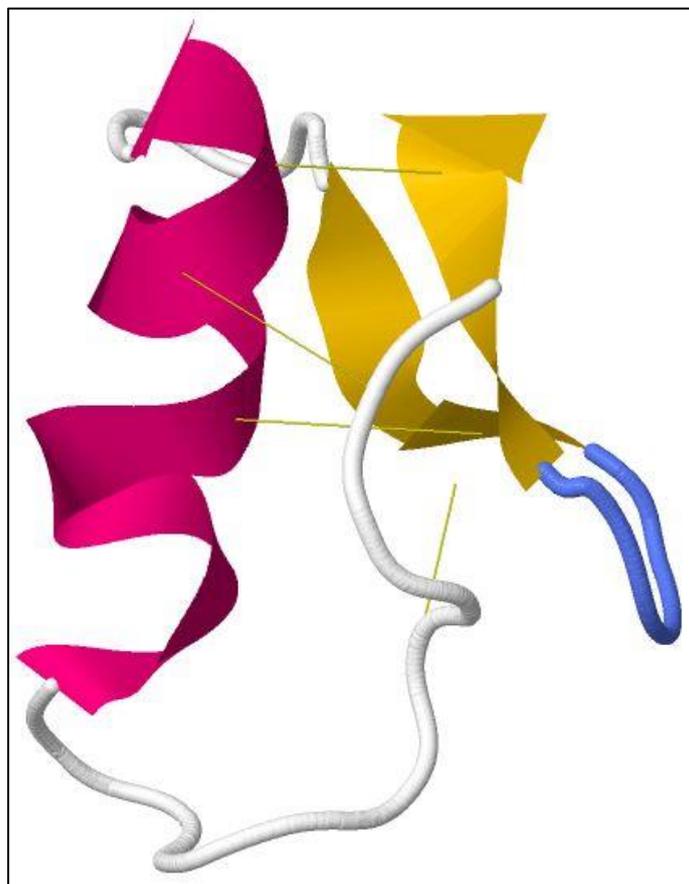


Figura 1. Representação estrutural da clorotoxina. Toxina isolada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (Acesso PDB, 1HCL). Nesta se identifica estruturalmente uma α -hélice (rosa) e duas fitas- β (amarelo) antiparalelas estabilizadas por 4 ligações dissulfeto (Lippens *et al.*, 1995).

1.2.2. Toxinas que modulam a atividade dos canais para cálcio

Dentre estas toxinas existem aquelas que agem sobre canais iônicos para cálcio próprios da membrana celular e outro grupo de toxinas que agem sobre aqueles canais expressos na membrana do retículo endoplasmático e/ou sarcoplasmático nos receptores de rianodina (Fig. 2). As primeiras são de natureza polipeptídica, cadeia de aminoácidos que superam os 60 resíduos estabilizados por 4 ligações dissulfeto e que normalmente são ativas em canais para sódio com atividade bloqueadora ou moduladora (Norton & McDonough, 2008). O segundo grupo são peptídeos bem caracterizados de 33 a 35

resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 ligações dissulfeto e com atividade moduladora das correntes iônicas (Schwartz *et al.*, 2009), embora se conheçam alguns deles com 4 ligações dissulfeto e/ou de maior tamanho (Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

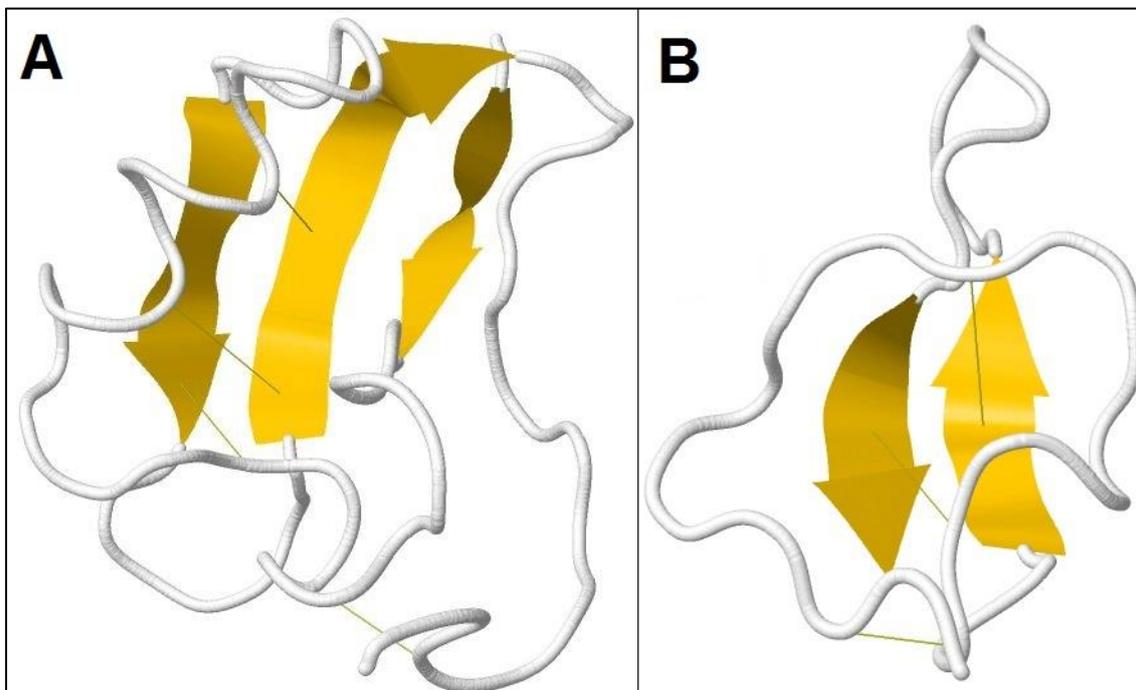


Figura 2. Representação estrutural das toxinas que agem sobre canais iônicos para o cálcio. **A.** A kurtoquina (Acesso PDB, 1T1T) isolada da peçonha do escorpião *Parabuthus transvaalicus* formada por 63 resíduos de aminoácidos com 3 fitas- β antiparalelas (amarelo), 1 α -hélice e uma estrutura randômica. Esta toxina está estabilizada por 4 ligações dissulfeto (Lee *et al.*, 2012). **B.** A maurocalcina (Acesso PDB, 1C6W) isolada da peçonha do escorpião *Scorpio maurus* se compõe de 33 resíduos de aminoácidos com 2 fitas- β antiparalelas (amarelo) e uma estrutura randômica. Esta toxina está estabilizada por 3 ligações dissulfeto (Mosbah *et al.*, 2000).

1.2.3. Toxinas que bloqueiam os canais para potássio

Estas toxinas, assim como seus canais iônicos alvo, têm grande diversidade estrutural. Este tipo de toxinas é classificado principalmente segundo sua estrutura primária. No entanto, outras características como os padrões tridimensionais por pareamento de cisteínas e atividade permitiram dividi-las em sete subfamílias (Fig. 3) e, cada uma destas, subdividida segundo a ordem da descoberta. Estas subfamílias são α -, β -, γ -KTx (Possani *et al.*, 2000; Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tytgat *et al.*, 1999), κ -KTx (Srinivasan *et al.*, 2002), δ -KTx (Chen *et al.*, 2013a), λ -KTx (Gao *et al.*, 2013) e finalmente, a ϵ -KTx (Cremonez *et al.*, 2016). As toxinas que agem sobre canais iônicos

para potássio são denominadas KTx e possuem entre 22 (Mouhat *et al.*, 2004; 2008) a 75 (Zhu *et al.*, 2010) resíduos de aminoácidos (Bergeron & Bingham, 2012) estabilizadas por 2, 3 ou 4 ligações dissulfeto, segundo a família da toxina (Martin-Eauclaire & Bougis, 2012).

As α -KTx (Fig. 3A) são a subfamília mais diversa com 28 representantes (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>; Chen *et al.*, 2012) se constituindo por aproximadamente 162 toxinas diferentes (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>), que estão estruturadas por duas fitas- β unidas a uma α -hélice por 3 ou 4 ligações dissulfeto (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tytgat *et al.*, 1999).

As β -KTx (Fig. 3B) são peptídeos compostos por uma estrutura α -hélice e duas fitas- β , unidas por três ligações dissulfeto (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Tan *et al.*, 2006; Tytgat *et al.*, 1999), com 47-68 resíduos de aminoácidos (<http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>), arranjadas em dois motivos estruturais bem diferenciadas em estrutura e função (Diego-García *et al.*, 2008).

As γ -KTx (Fig. 3C) são principalmente classificadas pela sua função. Elas agem especificamente sobre os canais iônicos tipo hERG (Tytgat *et al.*, 1999). Este tipo de toxinas são formadas por uma α -hélice e duas fitas- β (Rodríguez de la Vega & Possani, 2004), unidas por quatro ligações dissulfeto (Corona *et al.*, 2002).

As κ -KTx (Fig. 3D) são a subfamília de toxinas mais simples (Srinivasan *et al.*, 2002). Estas se compõem de duas estruturas α -hélice estabilizada por duas ligações dissulfeto (Nirathanan *et al.*, 2005).

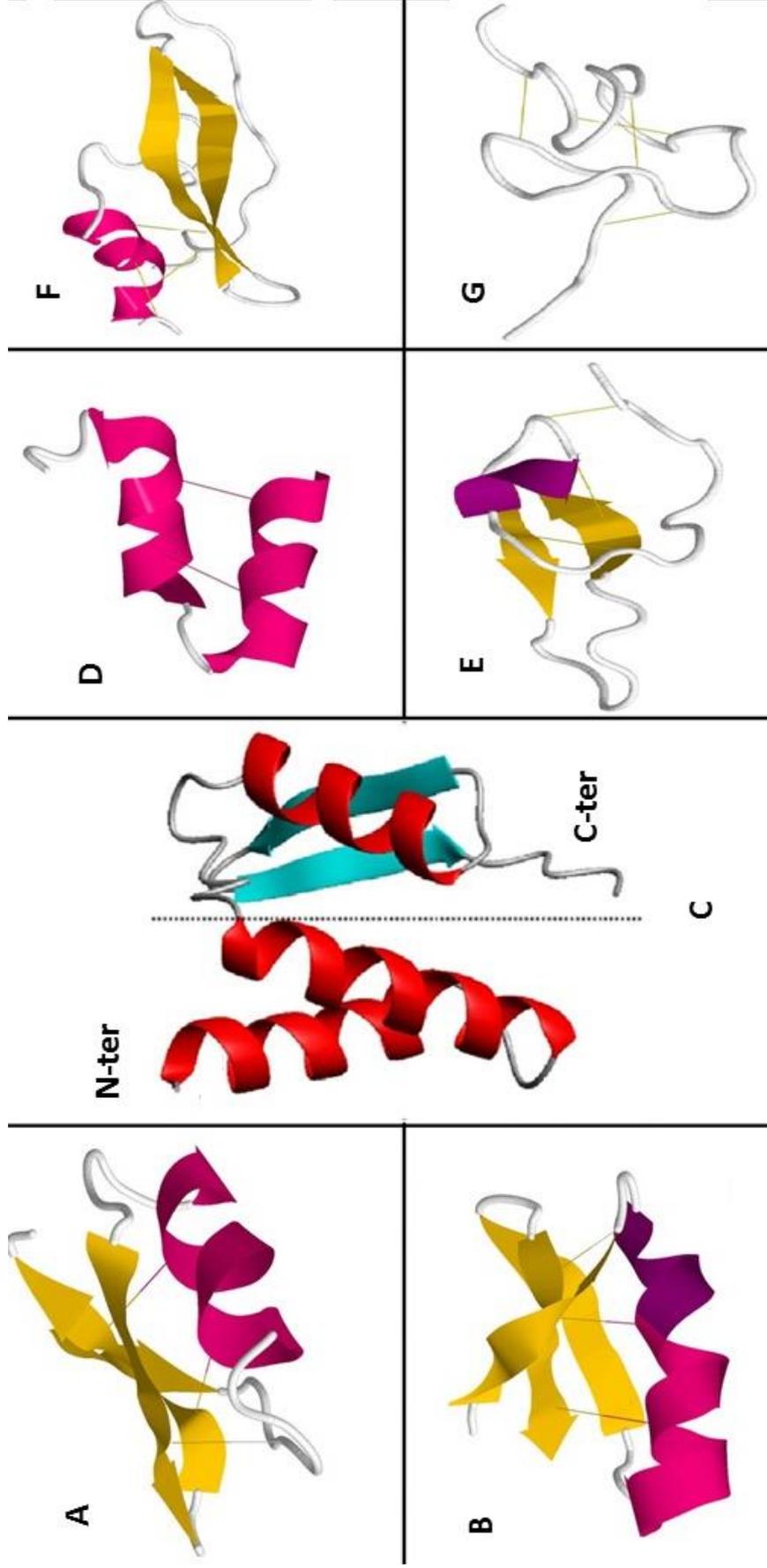


Figura 3. Estruturas tridimensionais de KTxs. **A.** Caribdotoxina, pertencente às α -KTxs se constitui de 1 α -hélice (rosa) e 2 fitas- β (amarelo) estabilizadas por três ligações dissulfeto (Acesso PDB, 2CRD); **B.** BeKm-1 pertencente às γ -KTxs que compartilha similaridade estrutural com as α -KTxs, mas com atividade biológica específica sobre canais tipo *ether-á-go-go* (Acesso PDB, 1J5J); **C.** Modelagem molecular por identidade da MeuTXK β 1 (Zhu *et al.*, 2010), pertencente às β -KTxs compostas pelos domínios N e C-terminal; **D.** A OmTx4 da subfamília k-KTx é constituída de duas α -hélices ligadas entre si por duas ligações dissulfeto (Acesso PDB, 1WQC); **E.** Modelo tridimensional da Maurocalcina (Acesso PDB, 1C6W) como representante estrutural das λ -KTxs; **F.** Estrutura da LmKTT-1a (Acesso PDB, 2M01) do escorpião *Lychas mucronatus*, como primeira representante das δ -KTxs, e; **G.** A Ts11 (Acesso PDB, 2MSF) como o único representante da última subfamília caracterizada, a ϵ -KTx caracteriza-se por não possuir estruturas secundárias definidas. Adaptado da dissertação de Morales D., 2013.

As toxinas tipo Kunitz que foram destacadas em peçonhas provenientes de outros grupos taxonômicos pelo seu padrão de pareamento de Cys, também foi determinado para escorpiões estabelecendo a subfamília δ -KTx (Chen et al., 2013). A função biológica adicional destas toxinas é inibir serinoproteases (revisado por Mourão & Schwartz, 2013).

As toxinas tipo (*inhibitor cystine knot*) ICK pela sua estrutura e função diversa foram catalogadas como a família λ -KTx (Gao et al., 2013). Finalmente, foi proposta a subfamília ϵ -KTx mostrando um motivo tipo ICK mas sem as clássicas estruturas secundárias alpha-hélice e fitas beta (Cremones et al., 2016). Para melhor compreensão sobre KTxs foi criado “Kalium”, uma base de dados que compila 174 KTxs descritas com suas informações técnicas (Kuzmenkov et al., 2016).

Antes de descrever as toxinas que agem sobre canais iônicos para sódio é preciso conhecer um pouco destes canais transmembrânicos. Portanto, se detalha informação dos canais iônicos para sódio, seguido pelas NaScTxS.

1.3 CANAIS IÔNICOS PERMEÁVEIS A SÓDIO

Estes canais iônicos são estruturas proteicas transmembrânicas que permitem o fluxo do íon sódio através da membrana celular, com isso, levando à despolarização da célula necessária para desenvolver sua atividade fisiológica normal (Catterall, 2012). Sua função está em, após um estímulo, iniciar uma entrada massiva de íons sódio para dentro da célula gerando uma despolarização. Os canais para potássio abrem permitindo a entrada de íons potássio (encarregado de repolarizar a célula) e se preparar de novo para continuar o ciclo do potencial de ação. Estas despolarizações geram potenciais de ação que atuam em células excitáveis como neurônios, células musculares, células do sistema imune entre outras (Catterall, 2014). Este grupo de canais iônicos são conhecidos como Canais para Sódio Dependentes de Voltagem (sigla em inglês VGSC) os quais são catalogados como subtipos desde $\text{Na}_v1.1$ até $\text{Na}_v1.9$ (Tabela II).

Tabela II. Localização, função e doenças relacionadas aos Na_vs.

Subtipo de Na _v	Expresso em	Funções	Doenças relacionadas
Na _v 1.1	NC e primariamente em miócitos cardíacos.	PA e DR no SNC e SNP. Acoplamento da excitação/contração dos miócitos cardíacos.	Epilepsia, enxaqueca, ataxia e autismo.
Na _v 1.2	NC, principalmente em axônios não mielinizados e pre-mielinizados.	PA e condução, DR no SNC e SNP.	Epilepsia, enxaqueca, ataxia e autismo.
Na _v 1.3	NC e primariamente em miócitos cardíacos.	PA e condução, DR no SNC e SNP.	Epilepsia, enxaqueca, ataxia e autismo.
Na _v 1.4	Músculo esquelético.	PA e transmissão.	Paralisia periódica hipercalêmica, Paralisia periódica hipocalêmica e paramiotonia congênita.
Na _v 1.5	Músculo cardíaco.	PA e condução.	Síndrome de Brugada, Síndrome QT e Fibrilação atrial.
Na _v 1.6	SNC: células do cerebelo, córtex cerebral, hipocampo células de Purkinje, tronco encefálico medula espinhal e astrocitos. SNP: células de Schwann, DRG.	PA e transmissão em NC e seus axônios mielinizados, responsáveis pelas correntes ressurgentes e persistentes das células de Purkinje.	Epilepsia, enxaqueca, ataxia, autismo e coceira paroxística.
Na _v 1.7	SNP: células de Schwann, neuroendócrinas e DRG.	PA e transmissão, lenta inativação facilitando lenta resposta.	Anemia, tosse, diabetes, distúrbios da dor e coceira paroxística.
Na _v 1.8	SNP: DRG e retina.	Promove inativação lenta	Distúrbios da dor e coceira paroxística. Altera o processo visual.
Na _v 1.9	SNP: DRG e retina.	Amplifica despolarizações de sub-limiar lento e modula e excitabilidade da membrana plasmática.	Distúrbios da dor e coceira paroxística. Altera o processo visual.

Esta tabela apresenta informações da localização dos Na_vs nos diferentes tecidos onde são preferencialmente expressos, suas funções fisiológicas e as doenças envolvidas quando acontece alterações na sua estrutura. Informações compiladas de Catterall *et al.*, 2005; de Lera & Kraus, 2015 e Kwong & Carr, 2015. NC, neurônios centrais. SNC, sistema nervoso central. SNP, sistema nervoso periférico. DRG, Gânglios da raiz dorsal. PA, potencial de ação. DR, disparos repetitivos. Os Na_v1.8 e 1.9 não foram testados neste trabalho porque não disponibilizamos deles no laboratório.

Tais subtipos têm distribuição diferenciada no sistema nervoso e o mau funcionamento desses canais está relacionado a várias doenças neurológicas, que podem ser classificadas como canalopatias (Catterall, 2000; Catterall *et al.*, 2007; Catterall, 2012). Um resumo geral da função fisiológica e doenças relacionadas aos Na_vs são apresentados (Tabela II). Entre estas doenças, não apresentado na tabela, alguns tipos de câncer cujo crescimento e metástase está relacionado com a expressão dos Na_vs poderia ser tratado a partir fármacos que agem sobre eles (de Lera & Kraus, 2015). Desde este enfoque, as NaScTxS poderiam ser uma aplicação potencialmente terapêutica.

1.3.1. Estrutura dos canais iônicos para sódio

Os VGSC (denominados Na_vs de agora em diante) são proteínas cuja estrutura quaternária se compõe de duas subunidades, uma denominada alfa e outra(s) acessórias denominada(s) beta ($\beta 1$ e $\beta 2$), expressa(s) segundo o subtipo de Na_v (Catterall, 2012) (Fig. 4). A subunidade alfa, de aproximadamente 2000 resíduos de aminoácidos é tetramérica, com cada tetrâmero composto de seis segmentos transmembrânicos (S1 – S6) denominados Domínios (DI – DIV) (Cestèle & Catterall, 2000; Payandeh *et al.* 2012; Catterall, 2012; 2014) (Fig. 6A).

Os segmentos transmembrânicos adotam a conformação de α -hélices ligadas entre si por estruturas randômicas em alças chamadas *loops*. Por sua vez, os *loops* podem estar imersos no citoplasma ou fora da célula conectando segmentos transmembrânicos. Eles são denominados segundo os segmentos que ligam; por exemplo, o *loop* vermelho apresentado na figura 4 é chamado de *loop* S3-S4 do domínio DII. Alguns *loops* que estão localizados extracelularmente são alvo das toxinas de escorpiões (Fig. 4). Os segmentos S5 e S6 de cada Domínio se juntam no centro da subunidade alfa para constituir o poro seletivo ao íon Na⁺ (Catterall, 2000; 2012; 2014). Os segmentos S4 de cada Domínio são sensíveis às mudanças no potencial de membrana pelo que eles são responsáveis pela ativação ou inativação rápida dos Na_vs (Fig. 4) (Catterall *et al.*, 2012; 2014).

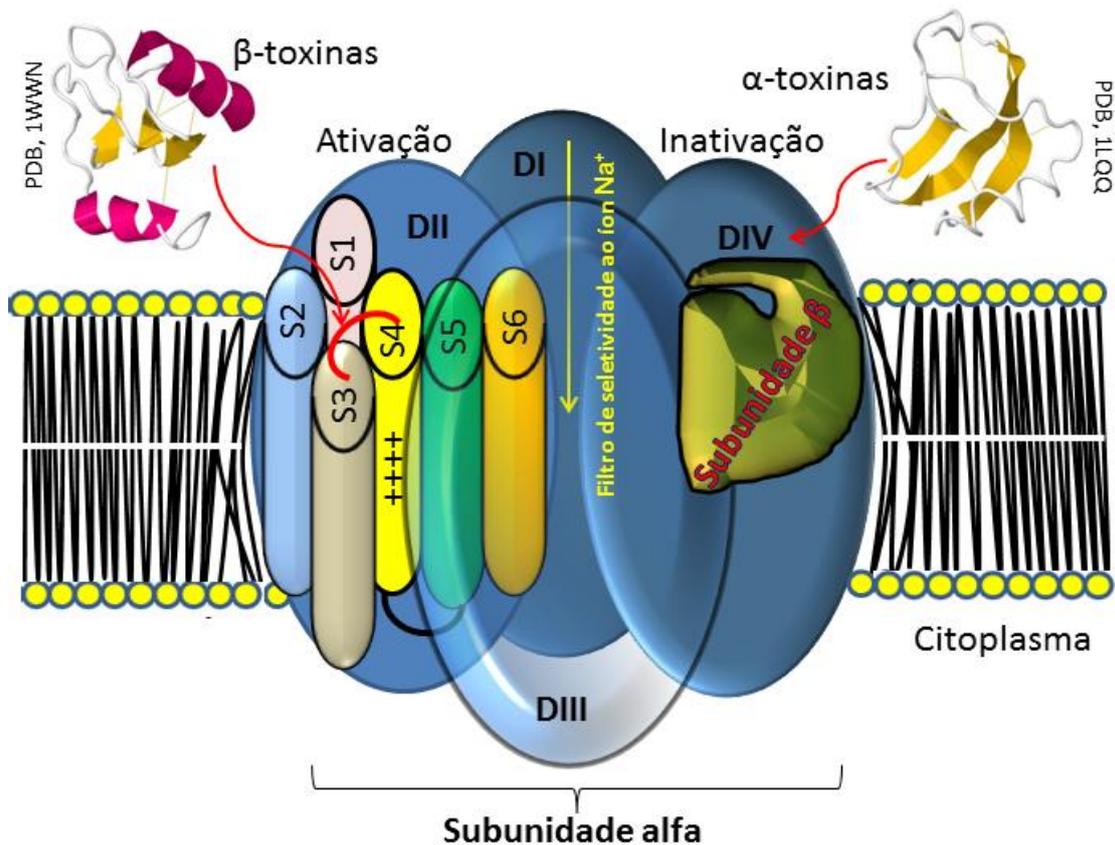


Figura 4. Representação esquemática do modelo estrutural do Na_v . Representação esquemática do modelo estrutural do Na_v . Este apresenta as subunidades α e β , os segmentos transmembrânicos (em cilindro) representativos de cada Domínio (DI – DIV) e alguns locais alvo de toxinas de escorpião NaScTx.

1.3.2. Modo de ação dos canais iônicos para sódio

Os Na_v s possuem dois estados, ativado e em repouso, e entre estes outros estados intermediários (Catterall, 2014). A ativação dos Na_v s se dá pelo deslocamento, no sentido externo da membrana, do segmento S4 do domínio DII (Catterall, 2012) (Fig. 5). Este segmento S4 possui resíduos básicos (usualmente arginina) ao longo da sua sequência de aminoácidos que detecta as variações no potencial de membrana. Dado que a célula no seu estado de repouso está polarizada, ela está negativa no citoplasma com isso puxando o sensor de voltagem S4 para dentro. Quando ocorre despolarização (inversão de polaridade transitória), há troca de cargas entre esses resíduos de aminoácidos ao longo do segmento S4. Este segmento começa a se deslocar linearmente para fora da célula, produzindo torque sobre si, e sobre os segmentos S1, S2 e S3 (Catterall, 2014). Com isso, o *loop* S4 – S5 é puxado

Dado que os domínios DII e DIV estão envolvidos com a ativação e inativação dos Na_vs , respectivamente (Catterall, 2000), as NaScTxs modulam estas atividades segundo seu sítio alvo (Jover *et al.*, 1980). Mesmo que ainda falte aprofundar o conhecimento destes resíduos de aminoácidos que são chave dos Na_vs , atualmente se conhece que a Glu779 e a Pro782 localizados no *loop* S1-S2 do domínio DII são fundamentais para o reconhecimento das β -toxinas, igualmente acontece com os resíduos de aminoácidos Glu837, Leu840, Gly845, Ala841 e Leu846 localizados no *loop* S3-S4 do mesmo domínio (Pedraza & Possani, 2013).

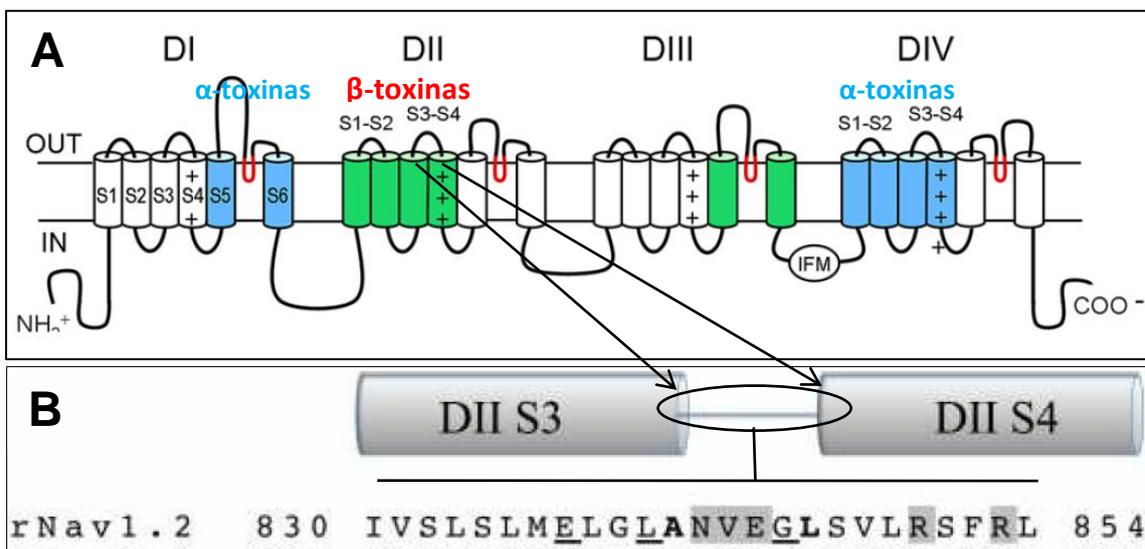


Figura 6. Desenho representativo da estrutura da subunidade α de um Na_v . **A**, apresenta o formato da subunidade α identificando os locais específicos de reconhecimento das α -toxinas e β -toxinas (Adaptado de Gurevitz, 2012). **B**, apresenta a estrutura primária do *loop* S3-S4 do domínio II identificando os resíduos chave para a interação entre β -toxinas e Na_vs (Adaptado de Pedraza & Possani, 2013). Os resíduos de aminoácidos sublinhados estão envolvidos na afinidade de interação das β -toxinas com o canal iônico, aqueles que estão em negrito estão envolvidos com a fixação do sensor de voltagem e aqueles marcados com cinza, quando sofrem mutações, aumentam a atividade do sensor de voltagem do canal iônico.

1.4 TOXINAS QUE MODULAM A ATIVIDADE DOS Na_vs

As NaScTxs são toxinas definidas por exercerem atividade modulatória sobre os canais iônicos para sódio. Estas inicialmente foram divididas em dois grupos quando Jover e colaboradores (1980) testaram duas toxinas (a toxina II do escorpião *Centruroides suffusus* e a toxina II do escorpião *Androctonus*

australis) achando que estas, além de não serem competitivas, não tinham a mesma atividade sobre os sinaptossomas preparados do cérebro de ratos. Assim, estas toxinas por um longo período foram catalogadas como α -toxinas e β -toxinas segundo seus locais específicos de interação nos canais iônicos para sódio. Foram, inclusive, catalogadas como toxinas provenientes de peçonha de escorpiões do velho e do novo mundo, respectivamente.

Após serem consideradas como α - e β -toxinas (Jover *et al.*, 1980), quase duas décadas depois as NaScTxS demonstraram ser ativas sobre diferentes subtipos de canais iônicos para sódio. Assim, considerando suas propriedades estruturais e funcionais as NaScTxS passaram a ser divididas em 10 grupos como descrito a seguir: toxinas do velho mundo, β -toxinas clássicas, β -toxinas, depressantes, ativas sobre insetos, α -toxinas para insetos, inseto-excitatórias, toxinas fracamente ativas, toxinas do novo mundo e excitatórias (Possani *et al.*, 1999).

Paralelamente, estas NaScTxS foram caracterizadas evolutivamente como α - e β -toxinas próprias da peçonha de escorpiões do velho e novo mundo, respectivamente (Gordon *et al.*, 1998). Posteriormente, foi constatado que algumas das toxinas próprias da peçonha de escorpiões do velho mundo foram encontradas em peçonhas de escorpiões do novo mundo, incluindo-se nessa lista uma toxina (a Lqhb1 da peçonha do escorpião do velho mundo *Leiurus quinquestriatus hebraeus*) que apresentou características estruturais e funcionais semelhantes às NaScTxS tanto do velho quanto do novo mundo (Gordon *et al.*, 2003). Adicionalmente, em uma análise filogenética destas NaScTxS foi sugerida uma seleção positiva, na qual estas α - e β -toxinas respondiam a uma força adaptativa gerada pela ampla variedade e distribuição nos diferentes tecidos dos canais iônicos para sódio (Zhu *et al.*, 2004). Atualmente, a separação de toxinas seguindo o padrão biogeográfico velho ou novo mundo está em desuso.

1.4.1. α -toxinas

Este grupo de toxinas (Fig. 7) se constitui por três fitas- β unidas a uma α -hélice estabilizadas por 4 ligações dissulfeto (Gordon *et al.*, 2007; Kahn *et al.*, 2009).

Os resíduos de aminoácidos chave destas toxinas para reconhecimento do local específico de seu canal iônico alvo estão localizados em dois pontos da toxina: são 5 resíduos localizados entre as posições 8-13 e no extremo C-terminal a partir do resíduo 56, resíduos que por sua vez variam segundo o subtipo de canal iônico alvo (Gordon *et al.*, 2007).

A distribuição desses resíduos nas α -toxinas permitiu dividir a superfície ativa destas em dois domínios, o “Domínio básico” que se compõe de resíduos básicos e o “Domínio NC”, que faz parte do extremo C-terminal (Karbat *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2007). Mais recentemente, foi indicado que além de outros prováveis resíduos localizados estrategicamente, o resíduo de aminoácido na posição 39 está envolvido não só na atividade da toxina, como também com sua especificidade pelo alvo no canal iônico (Weinberger *et al.*, 2010; Gurevitz *et al.*, 2012).

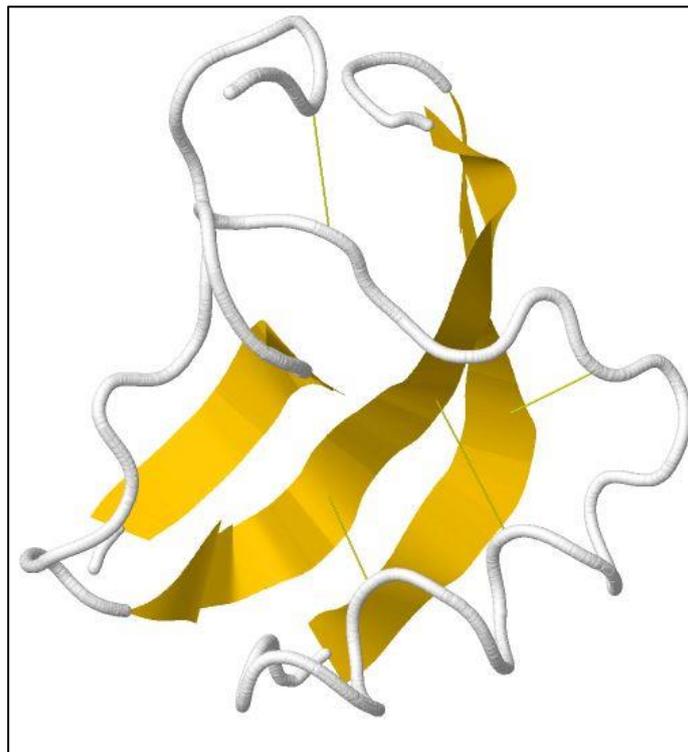


Figura 7. Representação estrutural de uma α -toxina. A toxina III (Acesso PDB, 1LQQ), com atividade anti-mamífero/inseto (α -like) isolada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* se constitui de uma estrutura α -hélice e 3 fitas- β (amarelo) antiparalelas, estabilizadas por quatro ligações dissulfeto (Landon *et al.*, 1996).

Como foi explicado, este grupo de toxinas age no sítio 3 dos Na_vs (Ver Fig. 6A). Como resultado dessa interação, a nível celular ocorre uma “despolarização” prolongada produzida pela diminuição no processo de inativação do canal iônico (Quintero-Hernández *et al.*,2013). O mecanismo de ação das α-toxinas sobre seus respectivos subtipos de canais iônicos alvo foi proposto (para suporte ver o modo de ação dos Na_vs, Fig. 5): a toxina interage com o *loop* S3-S4 do DIV impedindo que o segmento transmembrânico S4 se desloque livremente diminuindo assim, a cinética normal do canal iônico (Ma *et al.*, 2013).

Sua subclassificação atual se compõe de três grupos (Fig. 8): As clássicas α-toxinas, as anti-inseto α-NaScTxS e as toxinas α-like (Gordon *et al.*, 2007; Gurevitz *et al.*, 2012; Quintero-Hernández *et al.*,2013). As primeiras agem especificamente sobre Na_vs de mamíferos (sinaptossomas isolados do cérebro de rato) com um *Kd* de 0.2–5 nM e alguns exemplos são as toxinas **Aah1** UniProtKB P01479 (Rochat *et al.*, 1970), **Aah2** UniProtKB P01484 (Rochat *et al.*, 1972) e **Aah3** UniProtKB P01480 (Kopeyan *et al.*, 1979), **Lqq5** UniProtKB P01481 (Kopeyan *et al.*, 1978) e **Bot3** UniProtKB P01485 (Benkhaddir *et al.*, 2004) dos escorpiões africanos *Androctonus australis* Hector, *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* e *Buthus occitanus tunetatus*, respectivamente.

As toxinas do segundo grupo agem especificamente sobre canais para sódio dependentes de voltagem de neurônios de inseto com *Kd* de 0,06 –1 nM e alguns exemplos são as toxinas **Lqq3** UniProtKB P01487 (Kopeyan *et al.*, 1993) e **BotIT1** UniProtKB P55902 (Borchani *et al.*, 1997) dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* e *Buthus occitanus tunetatus*, respectivamente. Por último, as toxinas α-like agem inespecificamente sobre insetos e mamíferos e alguns exemplos são as toxinas **Lqh3** UniProtKB P56678 (Sautiere *et al.*, 1998), **Lqh6** UniProtKB P59356 (Hamon *et al.*, 2002) e **BmK-M1** UniProtKB P45697 (Ji *et al.*, 1996) dos escorpiões *L. quinquestriatus hebraeus* e *Mesobuthus martensii* Karsch, respectivamente.

Espécie	Toxina
TdNa9	MLKFAIAVALLFIGLELREARDGYPQSKVNYCKIYCP--PNTTVQWTCCKNRAGATDGDGRWS--SCYCFNVAPDTVLYGDPGTKFCMA---
TdNa10	MWTFAIVLA-FLLIIGLDEGEALDGYP LSKNNYCKIYCP--PNTEVCKDTCKRRAGATDGEGRWD--GCYCFNVAPDTKMY--PGELFCH----
To10	-MNYSTLIAVASLLTAGTESKLDGYPV-EGS-CAFFC-GYDNAYCDKLCER-KADSGYCYWVNILCYCYGLPD---NAAIKGYGRCKPGKK
TdNa8	-MNYLTIAAASLLTAGTESKLDGYPVKEGD-CAFFC-GYDNAYCDKLCER-KADSGYCYWVNILCYCYGLPD---KAAIKGYGRCKPGKK
To9	-MNYSTLIAVASLLTAGTESKLDGYPVKEGD-CAFFC-GYDNEYCDKLCER-KADSGYCYWVNILCYCYGLPD---KAAIKGYGRCKPGKK
Ts5	-----KLDGYPVEGDN-CAFACFGYDNAYCDKLCER-KADSGYCYWVNILCYCYGLPD---KADDDGYCVWSP-DCYCYGLPEHILKEPTKTSGRFC----
Tpa4	-MNYFVLIAVACLLTAGTESKLDGYPLEYDN-CAYDCLGYDNKCKDKLCKDK-KADSGYCYWAHILCYCYGLPD---NEPIKTSGRCKPGKK
Tst3	-----KLDGYPVEYDN-CAYICWNYDNAYCDKLCER-KADSGYCYWAHILCYCYGLPD---SEPTKTNGKCKS----
Tb3	-----KLDGYPVEADN-CAFVCFGYDNAYCDKLCER-KADSGYCYWVNILCYCYGLPD---NEPTKTNGKCKS----
TbTx5	-MNDFVLVVAACLLTAGTEGKLDGYPVEGDN-CAFVCFGYDNAYCDKLCER-KADSGYCYWVNILCYCYGLPD---KEPTKTNGKCKPGKK
Ts2	-----KEGYAMDHEG-CKFSCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWP--ACYCYGVPDHIKVVWDYA-TNKC----
Tst2	-----KEGYAMDHEG-CKFSCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWP--ACYCYGVPDHIKVVWDYA-TNKC----
Tf4	-----GKEGYPADSKG-CKVTCFFTGVGVCDECKLK-KASSGYCAWP--ACYCYGLPDSASVWDSA-TNKC----
To2	MIRFVLFISCFLLIGTVVECNLDGYLMEGDG-CKMGLTRKASVQVDCCKEVGGKDGICYAWL--SCYCFNMPDSVEIWDSK--NNKCGKGGK-

Figura 9. Alinhamento das α -toxinas próprias de escorpiões do gênero *Tityus*. Cys indicadas em vermelho. Peptídeo sinal em realce verde. (*) Resíduo de aminoácido idêntico, (:) Resíduo de aminoácido semiconservativo.

1.4.2. β -toxinas

Este tipo de toxinas é muito variado (Fig 10). A maioria delas se estrutura por uma α -hélice e três fitas- β antiparalelas, estabilizadas por 3 ou 4 ligações dissulfeto (Rodríguez de la Vega & Possani, 2005; 2007; Pedraza & Possani, 2013). No entanto, outras podem possuir estruturas adicionais como uma α -hélice acessória, com a Bj-xtrIT, uma β -toxina inseto-excitatória da peçonha do escorpião *Hottentotta judaicus* (Fig. 11). Similarmente às α -toxinas, para este grupo de toxinas já se tem caracterizado alguns locais específicos que permitem a interação com seus canais iônicos alvo. São eles:

- 1) A “região do farmacoporo”, que está associada à estrutura α -hélice das toxinas, é constituída de resíduos de aminoácidos negativos e está envolvida com o ponto de reconhecimento da toxina (pode ser seletivo aos subtipos de canais iônicos);
- 2) Resíduos no C-terminal com características hidrofóbicas que permitem afinidade ao sítio receptor;
- 3) Um grupo exposto de resíduos aromáticos localizados no *loop* que conecta as fitas- β 2 e 3 da toxina que facilita sua atividade;
- 4) alguns resíduos localizados no sulco N-terminal que estão envolvidos na fixação do sensor de voltagem (Rodríguez de la Vega & Possani, 2007; Pedraza & Possani, 2013);

5) além da variável presença de resíduos de aminoácido nos *loops* que conectam as estruturas secundárias e daqueles resíduos localizados no C-terminal das β -toxinas que estão envolvidos com sua especificidade (Quintero-Hernández *et al.*,2013).

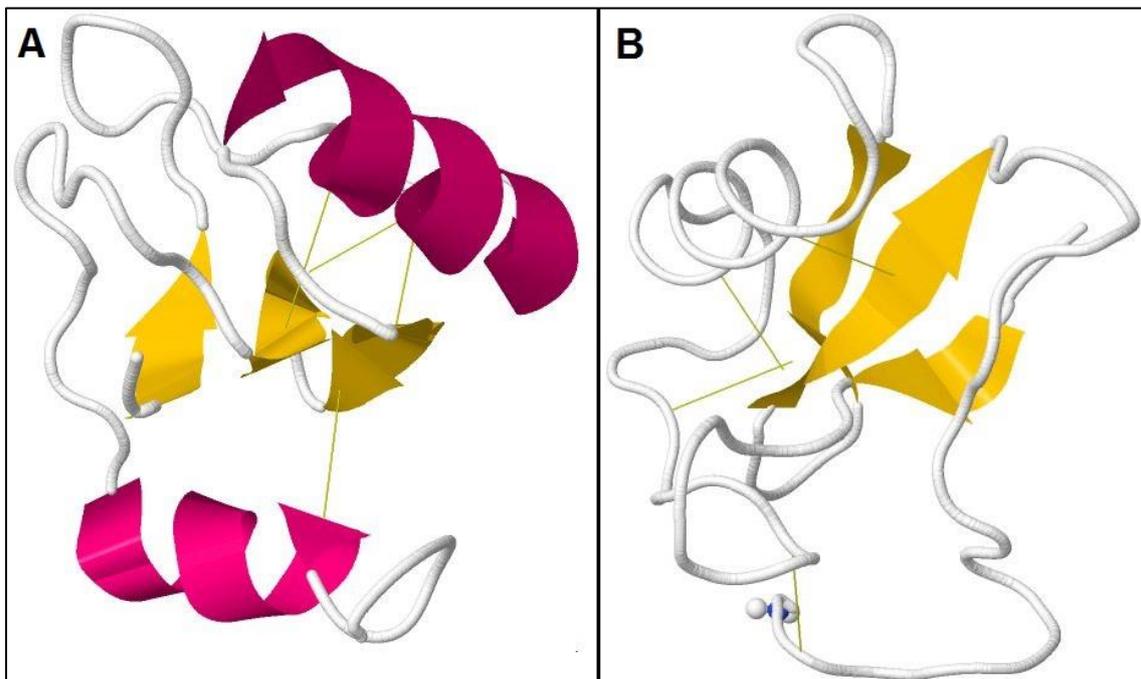


Figura 10. Representação estrutural de duas β -toxinas. As duas toxinas apresentam estruturas similares com α -hélice e 3 fitas- β (amarelo) antiparalelas, estabilizadas por quatro ligações dissulfeto. A. Bm32-VI (Acesso PDB, 1WWN), com atividade excitatória anti-inseto isolada da peçonha do escorpião *Mesobuthus martensii* Karsch (Tong *et al.*, 2006) e B. CsslI (Acesso PDB, 2LI7), com atividade antimamífero isolada da peçonha do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* (Saucedo *et al.*, 2012).

Após interação das β -toxinas com seu alvo, estas deslocam a dependência de voltagem dos Na_v s para potenciais mais negativos (Possani *et al.*, 1999; Quintero-Hernández *et al.*,2013; Pedraza & Possani, 2013) fazendo com que a célula fique mais sensível a potenciais despolarizantes e promova estímulos espontâneos e repetitivos. O mecanismo de interação destas toxinas com os canais iônicos tenta ser elucidado. Foi proposto que as β -toxinas interagem com o sensor de voltagem do domínio II do canal iônico alvo impedindo sua

livre movimentação e, por conseguinte, produzindo a diminuição do pico da corrente do íon sódio.

No entanto, quando este sensor de voltagem do domínio II preso pela toxina é submetido a pré-pulsos despolarizantes, esta estrutura consegue se deslocar parcialmente permitindo fixar o canal iônico em estado pré-ativado (Rodríguez de la Vega & Possani, 2007). Atualmente, este mecanismo é apresentado por 3 passos. No primeiro, a β -toxina se une aos sítios receptores S1-S2 e S3-S4 do domínio II no momento em que o canal iônico está inativo. Isso faz com que esta estrutura fique fixa e se mantenha impedindo o fluxo do íon sódio por tempo prolongado.

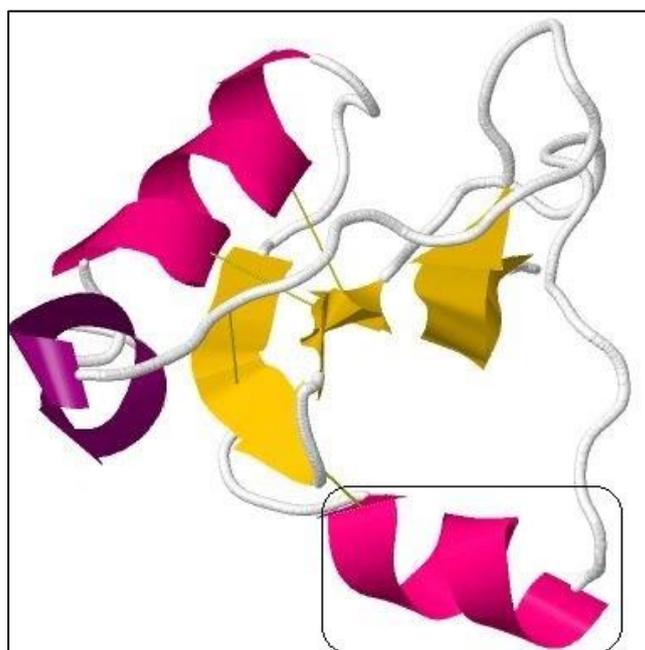


Figura 11. Representação estrutural de uma β -toxina inseto-excitatória. A BjxtrIT purificada da peçonha do escorpião *Hottentotta judaicus* (Acesso PDB, 1BCG) se estrutura como as outras β -toxinas, mas possui uma α -hélice acessória indicada no quadro (Oren *et al.*, 1998).

No segundo passo, a estimulação celular com um pré-pulso produz uma forte despolarização que permite a movimentação do segmento S4 encarregado de abrir o poro do canal iônico (estado ativado). Esta movimentação do S4 em direção à face externa da membrana expõe alguns resíduos de aminoácidos

que são alvo da toxina. No terceiro passo, a toxina fixa esta nova posição estrutural do canal iônico fazendo com que este permaneça em estado ativado, tanto que na repolarização o canal iônico só consegue voltar até seu estado pré-ativado (Pedraza & Possani, 2013).

As β -toxinas foram subclassificadas (Fig. 12) segundo sua atividade biológica e estrutura (Rodríguez de la Vega & Possani, 2007; Gurevitz *et al.*, 2012; Quintero-Hernández *et al.*, 2013):

I) β -toxinas com atividade antimamíferos: São as toxinas que agem exclusivamente em canais iônicos para sódio de células de mamíferos. São próprias de escorpiões do gênero *Centruroides*. Seus aminoácidos chave no reconhecimento dos *loops* do canal iônico são na região do “farmacoporo” com a Glu28 que está bordeada pelas Phe17, Tyr24, Arg27 e Gln32, na região dos *loops* da toxina antes da estrutura α - e entre as estruturas β -2 e β -3 que se compõe de Leu19, Asn22 e as Tyr40, Tyr42 e Phe44, respectivamente. Por último, as Tyr4, Trp47 e Lys63 aparecem bem conservadas entre este tipo de toxinas e a região C-terminal com a presença de resíduos básicos (Pedraza & Possani, 2013).

II) β -toxinas com atividade excitatória anti-inseto: Este tipo de toxinas age especificamente em canais iônicos de inseto, por exemplo, produzem paralisia sobre o músculo das larvas de varejeira dado pela ativação dos canais iônicos nos menores potenciais de membrana. A lista de aminoácidos que são chave para reconhecimento do canal iônico não varia muito daquelas outras β -toxinas, embora tenha uma diferença na estruturação terciária, pois o pareamento de Cys nas ligações dissulfeto varia (Pedraza & Possani, 2013).

III) β -toxinas com atividade depressiva anti-inseto: Este tipo de toxinas age sobre canais iônicos de células de inseto produzindo paralisia flácida. Os resíduos de aminoácidos chave localizados na região do “farmacoporo” são a Glu24 rodeada por Ile e Trp como resíduos constantes. Os resíduos no C-terminal são a Gly9, Lys11, Trp53, Asn58, Thr59 e Gly61, por último, uma região muito hidrofóbica se constitui de Tyr3, Tyr34, Trp36, Trp38, Leu40 e Trp43 (Pedraza & Possani, 2013).

IV) β -toxinas com atividade anti-mamífero/inseto: São toxinas que agem sobre os dois grupos taxonômicos e são afins às toxinas do gênero *Tityus*. Os resíduos de aminoácidos na região do “farmacoporo” são semelhantes às outras β -toxinas, embora, exista uma variabilidade entre as toxinas deste subtipo. É importante destacar a presença conservada de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos no extremo C- terminal como a Tyr4, Tyr36, Trp39, Tyr43, Tyr45 e a Trp54 (Pedraza & Possani, 2013).

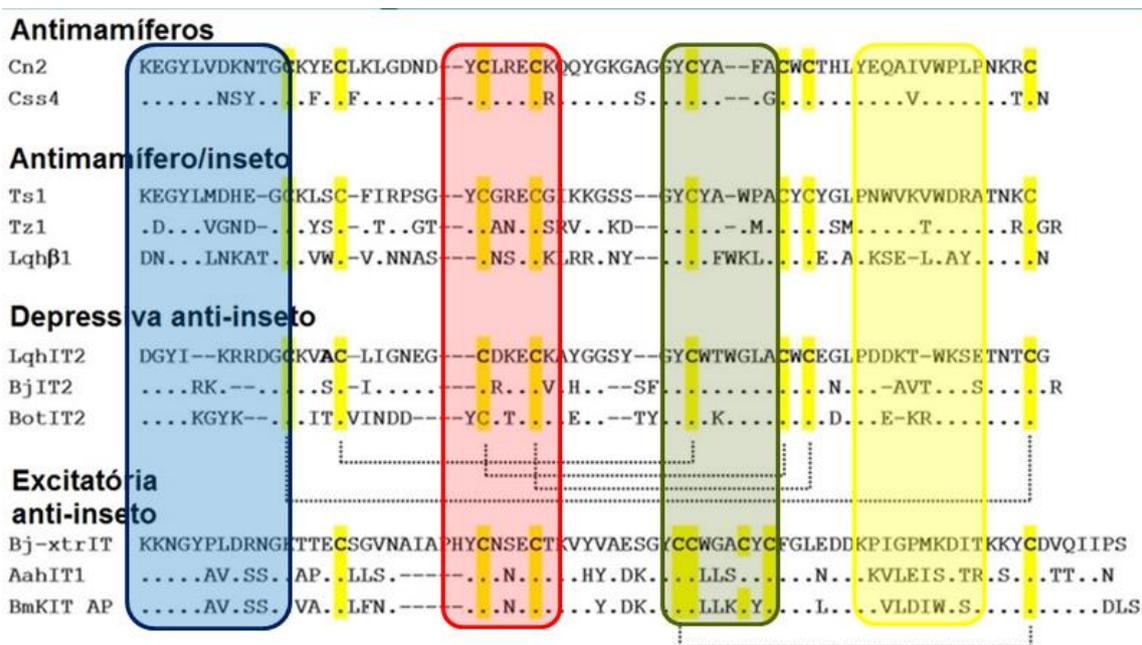


Figura 12. Alinhamento de β -toxinas. Apresenta a subclassificação das β -toxinas com as ligações dissulfeto (linhas pontilhadas). Os traços indicam *gaps*, os pontos indicam resíduos de aminoácidos idênticos e as Cys ressaltadas em amarelo (Adaptado de Gurevitz *et al.*, 2012). Os realces quadrados indicam distribuição de resíduos de aminoácidos importantes para a interação com os respectivos N_a_v s: em azul, distribuição daqueles básicos; em vermelho, aqueles ácidos como o glutamato; em verde, alguns aromáticos e em amarelo, esses de características hidrofóbicas.

As β -toxinas descritas para espécies do gênero *Tityus* são alinhadas na figura 13. Estas incluem toxinas identificadas diretamente da peçonha e precursores ainda não testados biologicamente, para algumas delas, seus peptídeos sinais estão identificados (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=tityus+beta-toxins&sort=score>). Em contraste com as α -toxinas, estas toxinas são mais

(<http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>) e é considerado promotor de risco à saúde por conta dos acidentes causados no estado de Pará (Pardal *et al.*, 2014). Entre os componentes da peçonha já foram caracterizadas toxinas que agem em canais iônicos tanto para sódio (UniProt: P60213, P60212, P60215, H1ZZH9, H1ZZI0, H1ZZI4, H1ZZI1, H1ZZI3, P60214, P84693, P84685, P84688, H1ZZH7, H1ZZH8, P84686 e H1ZZI2), quanto para potássio (UniProt: P83243, P60211 e P60210).

No total quinze NaScTxs desta espécie de escorpião (Fig. 14) foram identificadas: duas na peçonha (Batista *et al.*, 2002b; 2004), como também por precursores elucidados diretamente dos mRNAs, que permitiram inferir sua possível classificação como α -toxinas ou β -toxinas (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Além disso, para NaScTxs provenientes do gênero *Tityus*, uma classificação adicional em 14 subfamílias (NaTx1 a NaTx14) com base no alinhamento de Cys das estruturas primárias e dos domínios conservados destas toxinas foi proposto (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012).

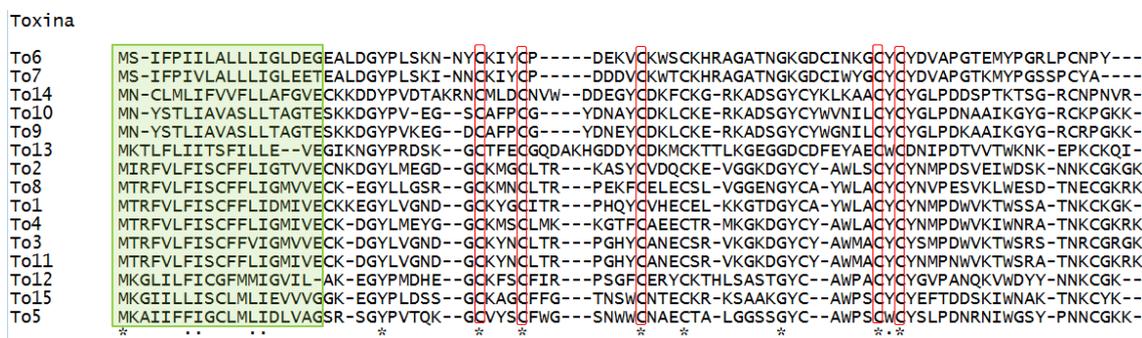


Figura 14. Alinhamento das NaScTxs próprias do escorpião *T. obscurus*. Cys destacadas em vermelho. Peptídeo sinal em realce verde. (*) Resíduo de aminoácido idêntico, (.) Resíduo de aminoácido conservativo, (:) Resíduo de aminoácido semiconservativo.

As toxinas To4 e To5 objeto desta pesquisa fazem parte dessas subfamílias. A primeira pertence à subfamília NaTx13 e, como as toxinas de seu grupo, ainda não têm sido nem bioquimicamente, nem biologicamente caracterizadas. A To4 tem homologia com β -toxinas que agem tanto em mamífero quanto em inseto.

Toxina	Sequência
To5	SRSGYPVTQKGCVYSCFWGSNWWCNAECTALGGSSGYC-AWPSWCYSLPDNRNIWGSYPNNC--
Bactridina-1	-KDGYYIEHRGCKYSCFFGTNSWCNTECTLKKGSSGYC-AWPACWCYGLPDNVKIFDSNNLKC--
Bactridina-2	-KDGYLVGNDGCKYSCFTRPGTYCANEC SRVKGKDGICYAWMACYCYSPNWWKTWNRATNRCGR
Ardiscretin	-KNGYIIEPKGCKYSCFWGSSTWCNRECKFKKGSSGYC-AWPAWCYGLPDNVKIFDYNNKC--
	:. ** : ** **** . : * ** * .. *** ** : *: ** . : * : : . . . *

Figura 15. Alinhamento da To5 e suas toxinas homólogas. O alinhamento só apresenta as toxinas que foram testadas biologicamente. A ardiscretina é amidada no C-terminal. As bactridinas teoricamente seriam amidadas. Cys em realce sinza. (*) Resíduo de aminoácido idêntico, (.) Resíduo de aminoácido conservativo, (:) Resíduo de aminoácido semiconservativo.

A segunda toxina, a To5, faz parte da subfamília NaTx2, que por homologia teria atividade de β -toxina. Sua identidade de 62 % com um grupo de toxinas que são específicas para artrópodes ou de 60 % com aquelas que agem sobre canais iônicos para sódio próprios de bactérias poderia incluir a To5 no grupo das anti-inseto, como a ardiscretina (D'Suze *et al.*, 2004), ou das bactridinas (Díaz *et al.*, 2009), respectivamente (Fig. 15).

1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TOXINAS DE ESCORPIÃO

Dado que conseguir quantidades suficientes de toxina para realizar a caracterização farmacológica é dispendioso, são utilizadas estratégias alternativas para obter este material. A síntese de proteína por expressão heteróloga, além de propiciar as quantidades requeridas, permite modificar estruturalmente estas toxinas para avaliar sua atividade, comparar seus efeitos biológicos com suas homólogas nativas, modular sua atividade, etc. Este desenvolvimento biotecnológico tem sido usado para toxinas ao longo de duas décadas e meia, e com o tempo foram melhorando as estratégias de expressão até a atualidade. A toxina To5 foi selecionada neste trabalho para ser expressa devido a que, como foi descrito, compartilha identidade com duas toxinas cujas atividades são bem diferentes ao atuarem sobre organismos de diferentes grupos taxonômicos, e, não sendo menos importante, esta toxina é um dos componentes mais abundantes na peçonha do *T. obscurus*.

Pelo menos 80 toxinas diferentes de escorpião têm sido expressas em organismos de diferentes grupos taxonômicos como células de mamífero, leveduras, células de inseto e, o sistema majoritariamente usado e o de bactérias. Particularmente, com *Escherichia coli* têm sido produzidas aproximadamente 50 ScTxNas recombinantes. Embora esta técnica apresente

dificuldades, há um considerável número de toxinas expressas reportadas na literatura, suportando o desenvolvimento desta etapa do projeto.

Uma detalhada análise no desenho do material genético a expressar, vetor e linhagem celular a serem usados para expressão e posteriores passos de purificação são cruciais para o sucesso da expressão (Costa *et al.*, 2014). Um desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficiência de expressão das toxinas de escorpiões tem ocorrido ao longo do tempo. A toxina recombinante LqhIT2, por exemplo, uma β -toxina que primeiramente foi expressa usando o sistema bactéria/vector BL21 (DE3) pLysS/pET-11cK produzindo espécies insolúveis da toxina (corpos de inclusão) (Turkov *et al.*, 1997; Karbat *et al.*, 2007), posteriormente foi produzida utilizando o sistema bactéria/vector BL21(DE3)/ pGEX-6P-1 conseguindo espécies solúveis da toxina (Tianpei *et al.*, 2014). No primeiro caso, a toxina recombinante foi produzida sem proteína carreadora, no segundo caso, a solubilidade e estruturação foram favorecidas pela glutathione *s-transferase*, uma proteína que faz o papel de transportadora.

Um dos requerimentos desafiantes na hora de produzir proteínas heterólogas é conseguir purificar a proteína alvo enovelada, individual e solúvel, usando o menor número de passos na produção e purificação (Makrides, 1996). Quando uma proteína recombinante se expressa em corpos de inclusão esta é produzida na forma desnaturada e agregada (Sørensen & Mortensen, 2005^a; De Marco, 2009), sendo requeridos, portanto, mais passos de purificação e estruturação como a oxidação *in vitro*. Contrariamente, quando uma toxina recombinante é produzida no estado solúvel, isto é, completamente estruturada e individualmente solubilizada dentro do microrganismo, menor número de passos de purificação serão necessários e maior será a eficiência de obtenção (Sørensen & Mortensen, 2005^b).

2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

As peçonhas de escorpiões têm sido alvo de pesquisas durante anos com vistas à descrição de toxinas com potencial farmacológico e/ou biotecnológico. Já é bem conhecido que o alvo farmacológico da maioria das toxinas produzidas por estes animais são os canais iônicos de células. Várias toxinas caracterizadas provenientes de escorpiões, principalmente da família Buthidae que agem em canais iônicos para K^+ , se mostram promissoras para tratamento de diversas doenças (Gati *et al.*, 2012). Entretanto, somente um fármaco foi desenvolvido a partir de uma toxina escorpiônica, a CITx (Debin *et al.*, 1993), uma clorotoxina denominada TM-601 após modificação química (Mamelak & Jacoby, 2007). A TM-601 é candidata ao uso dado que inibe o crescimento do glioblastoma multiforme (Cheng *et al.* 2014).

T. obscurus ocorre no norte do Brasil na floresta amazônica e, com frequência, são reportados acidentes mostrando sérias complicações em pacientes picados. Atualmente, poucos componentes da peçonha deste escorpião foram identificados e testados por meio da eletrofisiologia: três toxinas que agem sobre canais iônicos para potássio (Batista *et al.*, 2000; 2002a) e duas de canais para sódio (Batista *et al.*, 2002b; 2004). Deste último grupo, as toxinas To1 e To2 deflagraram respostas sobre correntes gerais de sódio medidas em células granulares do cerebelo de rato e F-11, respectivamente.

No entanto, estas toxinas ainda não foram testadas sobre subtipos específicos de canais iônicos para sódio. Resumindo, ainda nenhuma toxina que age sobre canais para sódio da peçonha deste escorpião tem sua atividade biológica totalmente caracterizada. As toxinas To4 e To5 por homologia parecem ser do tipo β . Sendo que a To5 compartilha identidade com duas toxinas cujas atividades biológicas são sobre Na_v s provenientes de diferentes grupos taxonômicos (D'Suze *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2009) e se representa como uma das toxinas mais abundantes da peçonha de *T. obscurus*. Por tanto, os resultados produto da pesquisa com estas toxinas fornecem informações valiosas sobre prováveis mecanismos de interação toxina- canal iônico além de brindar informações importantes sobre o alcance biológico da peçonha desta espécie de escorpião.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o(s) alvo(s) farmacológico(s) sobre hNa_vs das To4 e To5, duas toxinas da peçonha do escorpião *Tityus obscurus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar e identificar a To4 nativa por cromatografia e espectrometria de massa, respectivamente;
- Avaliar as atividades biológicas da toxina To4 nativa por meio de testes eletrofisiológicos;
- Purificar e identificar a To5 nativa por cromatografia e espectrometria de massa, respectivamente;
- Avaliar as atividades biológicas da toxina To5 nativa por meio de testes eletrofisiológicos;
- Produzir heterologicamente a toxina To5 com o intuito de avaliar estrutura/função quando comparada eletrofisiologicamente com a nativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HPLC

Usando uma coluna analítica C_{18} (*Phenomenex* 250 x 4,6 mm, 4 μ m), foi preparado um programa de gradiente linear dos solventes A (1,2 % TFA em água Milli-Q) e B (1,0 % de TFA em acetonitrila) de zero a 60% de B para purificar as toxinas de interesse em um RP-HPLC, com fluxo de 1 mL/min usando uma detecção a 216 e 280 nm.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A massa molecular do material de interesse foi determinada em um espectrômetro de massa tipo MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). A amostra foi preparada junto com a matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água Milli-Q/TFA 3%; 5:4:1;v:v:v) contendo uma relação de amostra/matriz 1:3, respectivamente. Esta mistura foi aplicada na placa tipo MALDI, secada no ambiente e posteriormente, foi colocada no equipamento para sua respectiva análise. Opcionalmente, por electrospray, a amostra foi medida usando uma matriz constituída de 50/50 H_2O/ACN com ácido fórmico 0,1%.

4.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DAS TOXINAS POR ISD

Para identificar a correspondência das massas moleculares das toxinas nativas To4 e To5, e suas sequências de aminoácidos previamente determinada pela biblioteca de cDNA (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), foi feita uma fragmentação de proteínas com o MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) usando o método *in source decay* (ISD). Para este processo as amostras foram misturadas com a matriz redutora *1,5-Diaminonaphthalene* (DAN), o equipamento foi calibrado com BSA, as medições e posterior análise foram feitas usando o *software* FlexControl 3.4 *off-line*.

4.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN

A To5 foi parcialmente sequenciada por degradação automática de Edman no CENARGEN, EMBRAPA (Brasília, Brasil). Logo após, foi submetida a 40 ciclos para sequenciamento pelo N-terminal no equipamento *Applied Biosystems 494 Procise Protein Sequencing System*.

4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

As toxinas To4 e To5 nativa foram testadas nos subtipos de canais iônicos para sódio Na_v1.1 até 1.6 que estão expressos em células HEK e o canal iônico Na_v1.7 expresso em células CHO. As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM da SIGMA (4,5 g/L glicose) adicionado de Soro Fetal Bovino inativado estéril (Cultilab), aminoácidos não essenciais MEM (Sigma), e o antibiótico G-418 (Sigma) às proporções 1:10, 1:100 v/v e 0,4 mg/mL, respectivamente. As células foram cultivadas em incubadora a 37°C sob 5 % de CO₂.

Para os testes eletrofisiológicos foram preparadas as soluções interna e externa necessárias para o contato no interior e exterior da célula, respectivamente. A solução interna em concentração mM foi constituída de 5 NaCl, 1 MgCl₂+6H₂O, 10 HEPES, 130 CsCl, 10 EGTA ajustado para o pH 7,2 com CsOH, e a solução externa em concentração mM constituída de 140 NaCl, 2 CaCl₂+2H₂O, 1 MgCl₂+6H₂O, 15 glicose e 10 HEPES ajustada para o pH 7,4 com NaOH. A solução interna foi colocada na pipeta de borosilicato (entre 1,5 e 2 MΩ de resistência aproximadamente) que contém o eletrodo, e a solução externa foi usada para o banho das células a testar. Nesta solução também foi adicionada cada toxina para seus respectivos testes eletrofisiológicos. Os testes foram feitos a temperatura ambiente.

O programa para registros eletrofisiológicos foi na configuração *whole-cell* com um potencial de repouso de -100 mV. Após obter o selo de 1 GΩ, a célula alvo recebeu um pré-pulso de voltagem (10 mV por 10 ms) para despolarização da célula (abertura de todos os canais alvo). Posteriormente, a célula recebeu pré-pulsos despolarizantes gradativos de +5 mV ($\Delta mV = 20$) entre -100 e +30 mV (rampa de voltagem) com intervalos de 50 ms como controle. Alternativamente,

cada célula foi exposta a pulsos despolarizantes sem usar o pré-pulso. Posteriormente, foi testada a toxina repetindo a rampa de voltagem com e sem pré-pulso.

Análise da atividade das toxinas sobre a ativação dos Na_v s

As correntes do íon sódio I_{Na} geradas foram analisadas com software *off-line*, fitmaster HEKA. A atividade da toxina sobre o canal iônico para Na^+ foi determinada pelo deslocamento da curva Corrente/Voltagem (I/V) do controle quando comparado com a curva (I/V) gerada pela toxina. Dito deslocamento baseia-se na diferença de voltagem media de ativação (V_{half}), usando a função de Boltzman:

$$y = \frac{1}{1 + e^{(V - V_{half})/k}}$$

Onde V é o potencial de membrana e k é o fator de inclinação. A curva que determina a diferença (V_{half}) entre controle e toxina foi plotada. Esta foi determinada com a relação condutância/Voltagem (g/V), cuja condutância é:

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{V - V_{Na}}$$

Onde I_{Na} é o pico da corrente de Na^+ provocada pelo potencial V , e V_{Na} corresponde ao potencial de reversão. Este último se calcula:

$$V_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na]_o}{[Na]_i}$$

Com R = constante dos gases; T = temperatura em Kelvin; F = constante de Faraday; $[Na]_o$ = concentração de Na^+ no meio extracelular; $[Na]_i$ = Concentração de Na^+ no meio intracelular.

Para cada teste eletrofisiológico foram usadas entre 3 e 5 células por tratamento de toxina. As figuras de *shift* de voltagem e as curvas de correntes foram construídas usando o software *OriginPro8*, e sua estatística básica foi realizada usando o mesmo software.

Análise da atividade das toxinas sobre a inativação dos Na_v s

As curvas de correntes produzidas pelas células com e sem toxina foram avaliadas fazendo uso dos pontos adquiridos no momento da inativação de cada registro. Usando a fórmula exponencial permitiu determinar a constante de tempo de inativação tau (τ) antes e depois de aplicar toxina:

$$y = y_0 + y_1(1 - e^{-t/\tau})$$

Onde y_0 é a amplitude inicial de cada ponto na curva, y_1 é a amplitude final, t é o tempo para cada ponto de inativação e τ , seria a constante tau dessa inativação.

Cada registro por estímulo na célula com e sem toxina gerou uma curva e seu respectivo tau (τ), que logo depois foi plotado fazendo uso do software *OriginPro8*. O deslocamento das curvas originadas a partir dos taus das correntes com e sem toxina permitiram avaliar se houve ou não, aumento do tempo de inativação depois de aplicada a toxina.

4.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

A expressão heteróloga da To5 foi iniciada a partir do transcrito previamente publicado da Biblioteca de cDNA por Guerrero-Vargas e colaboradores em 2012 (Fig. 16). Este código genético foi otimizado para uso de transferentes em *E. coli*, já que este tipo celular foi o sistema selecionado para expressão.

1	ATG	AAA	GCA	ATC	ATT	TTC	TTT	ATC	GGA	TGC	TTA	ATG	CTG	ATT	GAC	45
1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	15
46	CTG	GTG	GCG	GGA	TCT	AGA	AGT	GGA	TAT	CCC	GTG	ACT	CAA	AAA	GGC	90
16	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	S	R	S	G	Y	P	V	T	Q	K	G	30
91	TGC	GTA	TAC	AGT	TGC	TTC	TGG	GGC	TCG	AAC	TGG	TGG	TGT	AAT	GCG	135
31	C	V	Y	S	C	F	W	G	S	N	W	W	C	N	A	45
136	GAA	TGC	ACA	GCT	TTA	GGG	GGA	TCA	TCG	GGC	TAC	TGC	GCC	TGG	CCA	180
46	E	C	T	A	L	G	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	60
181	TCG	TGT	TGG	TGC	TAC	AGC	CTG	CCA	GAT	AAC	CGA	AAT	ATT	TGG	GGT	225
61	S	C	W	C	Y	S	L	P	D	N	R	N	I	W	G	75
226	AGT	TAC	CCA	AAT	AAC	TGT	GGA	AAA	AAG						252	
76	S	Y	P	N	N	C	G	K	K							

Figura 16. Transcrito original da To5. A sequência de resíduos de aminoácidos sublinhados indica o peptídeo sinal, a toxina To5 madura está em negrito e finalizando em sinal de amidação, indicado com itálico.

4.6.1. Desenho e construção do plasmídeo de interesse

Otimização do gene *To5* para uso em *E. coli*

Para este processo a sequência de nucleotídeos foi reorganizada com o software disponibilizado *on-line* Graphical Codon Usage Analyzer (Fig. 17) com a finalidade de favorecer a expressão da toxina. Como foi descrito para a expressão da β -toxina Css II própria da glândula de peçonha do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* (Johnson *et al.*, 2000), a produção de componentes de origem eucariota em organismos procarióticos representa um desafio à produção de proteínas recombinantes, portanto estes requerem de um desenho especial na utilização de códons para vincular o material genético a expressar na maquinaria molecular da bactéria.

Número de códons por aminoácido	
Ala=3	GCA=1 GCC=1 GCG=1 GCT=0
Cys=8	TGT=4 TGC=4
Asp=1	GAT=1 GAC=0
Glu=1	GAA=1 GAG=0
Phe=1	TTT=1 TTC=0
Gly=7	GGT=3 GGC=2 GGA=1 GGG=1
His=0	CAT=0 CAC=0
Ile=1	ATT=1 ATA=0 ATC=0
Lys=1	AAA=1 AAG=0
Leu=2	CTG=1 TTA=1 CTT=0 TTG=0 CTC=0 CTA=0
Met=0	ATG=0
Asn=6	AAT=4 AAC=2
Pro=4	CCG=1 CCT=1 CCA=1 CCC=1
Gln=1	CAG=1 CAA=0
Arg=2	CGT=1 CGC=1 CGG=0 AGA=0 AGG=0 CGA=0
Ser=9	AGC=2 AGT=2 TCA=2 TCT=1 TCC=1 TCG=1
Thr=2	ACC=1 ACA=1 ACG=0 ACT=0
Val=2	GTT=1 GTG=1 GTC=0 GTA=0
Trp=6	TGG=6
Tyr=5	TAT=3 TAC=2

Sequencia <i>To5</i> harmonizada com os sítios <i>Bam</i> HI, <i>E</i> K e <i>Xho</i> I:	
GAGGATCCGGT GATGACGATGACAAG AGCCGCAGTGGTTATCCGGTGAC	
CCAGAAAGGCTGTGTTTACTCTTTGCTTTTTGGGGATCAAATTGGTGGTGT	
AACGCAGAAATGCACAGCCCTGGGTGGCAGCTCCGGGTATTGTGCGTGGC	
CCAGTTGCTGGTGTACTCATTACCTGATAATCGTAATATTTGGGGTTC	
GTATCCAAACAATTGCCTCGAGTC	

Figura 17. Sequência nucleotídica otimizada a partir do precursor original da *To5*. Nesta se apresenta o número de códons e sua respectiva sequência utilizada na expressão heteróloga. Adicionalmente à sequência nucleotídica do peptídeo maduro da *To5*, foram incluídos sítios de restrição e reconhecimento da enteroquinase.

Estes códons para uso de transferentes raros usados em bactérias favorecem a tradução de proteínas nestas. A reorganização desses nucleotídeos poderia

favorecer sua produção heteróloga. Assim, os oligonucleotídeos ótimos desenhados para montagem da To5 foram Fw1, Rev2, Fw3 e Rev4:



Estes quatro oligonucleotídeos foram submetidos a PCR de montagem como indicado a seguir (Fig. 18A):

PCR de montagem

Previamente, quatro oligonucleotídeos foram sintetizados para construir o material gênico que codifica a To5. Estes oligonucleotídeos foram usados a uma concentração final de 0,2 μ M por oligonucleotídeo, dNTP's 0,2 mM, tampão 1X da polimerase, polimerase Vent[®] DNA (NEB) 0,04 U/ μ L e completando a reação total para 100 μ L com água Milli-Q. As condições da PCR foram 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos: 94°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 72°C por 30 seg; 72°C por 5 min e finalizado com 4°C. A temperatura de anelamento usada foi menor em 5 °C da temperatura média do oligonucleotídeo desenhado.

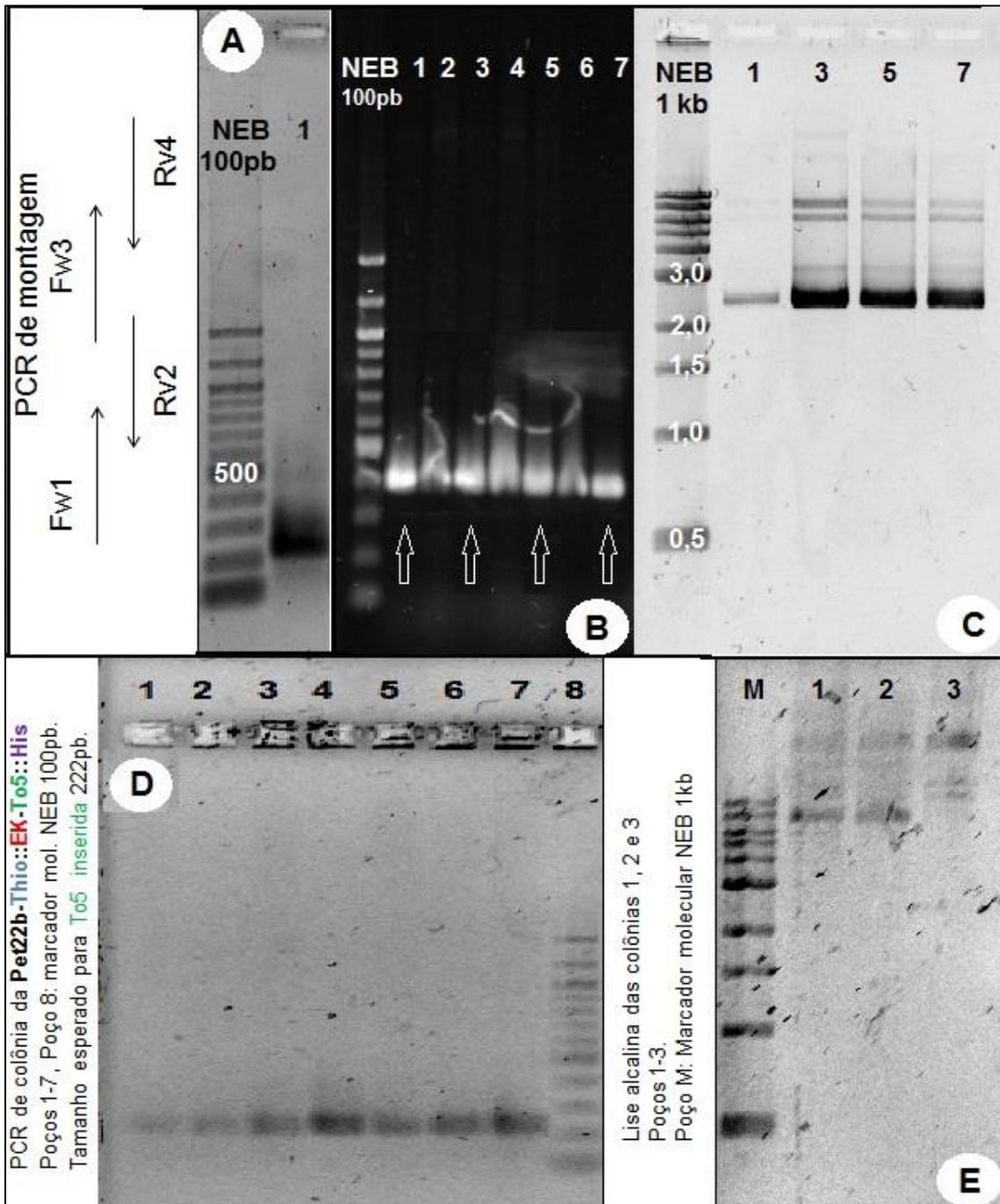


Figura 18. Processo de construção do material gênico que expressa a To5 com histidinas. **A**, montagem da sequência nucleotídica reorganizada da To5 a partir de 4 oligonucleotídeos. **B**, PCR de colônia de sete clones To5 identificando com setas aquelas que foram selecionadas para as próximas etapas. **C**, Lise alcalina dos clones previamente selecionados. **D**, apresenta a PCR de colônia do clone pET22b-Thio::EK-To5. **E**, lise alcalina dos três primeiros clones selecionados do gel anterior pET22b-Thio::EK-To5.

Esta PCR foi a montagem de todos os oligonucleotídeos (Fw1, Rev2, Fw3 e Rev4) em uma única reação. Este produto foi purificado para preparar sua inserção no vetor de clonagem:

Purificação do DNA de interesse

Parte do material de DNA produto de cada processo de PCR de montagem, ou tratamento com endonucleases de restrição foi primeiramente observado em gel de agarose 0,1% para identificar se a reação correspondente ocorreu. Com material da reação exitosa foi feito um gel de agarose 0,1% preparativo. A banda de interesse foi separada do gel e, dito material de DNA foi extraído deste fragmento de gel com o Kit PAAG-QIA da QIAGEN. Neste processo, primeiro é derretido o gel contendo a banda de interesse a 50°C usando uma solução tampão do Kit. Logo depois, fazendo uso de soluções tampão adicionais (próprias do Kit), o gel dissolvido foi passado por uma coluna cromatográfica que permitiu separar o DNA de interesse. O uso de etanol absoluto foi necessário durante o penúltimo passo de centrifugação.

O seguinte passo foi inserir o DNA To5 purificado no vetor de clonagem pBluescriptKS/EcoRV (Fig. 19) como indicado a seguir:

Reação de ligação

Para cada reação com 100 ng de vetor (5 ng/μL) foi usado 1/3 do inserto (3:1, respectivamente), tampão para T₄ DNA ligase 1x, T₄ DNA ligase (NEB) 0,05 U/μL e completado com água Milli-Q até 20 μL. A reação ocorreu durante a noite a 16°C ou a 22°C durante 3 horas.

Simultaneamente, a linhagem bacteriana de clonagem foi preparada para receber este plasmídeo montado seguindo o processo:

Preparo de células competentes

A partir de 5 μL de uma cultura de *E. coli* DH5α previamente congelada foi preparado um pré-inóculo que foi mantido durante a noite a 37°C sob agitação, em 5 mL de meio YT2x o qual se compõe de Bacto-triptona 0,012 g/mL, extrato de levedura 0,01 g/mL, NaCl 0,0025 completando para 200 mL com água destilada e o pH ajustado para 7,0.

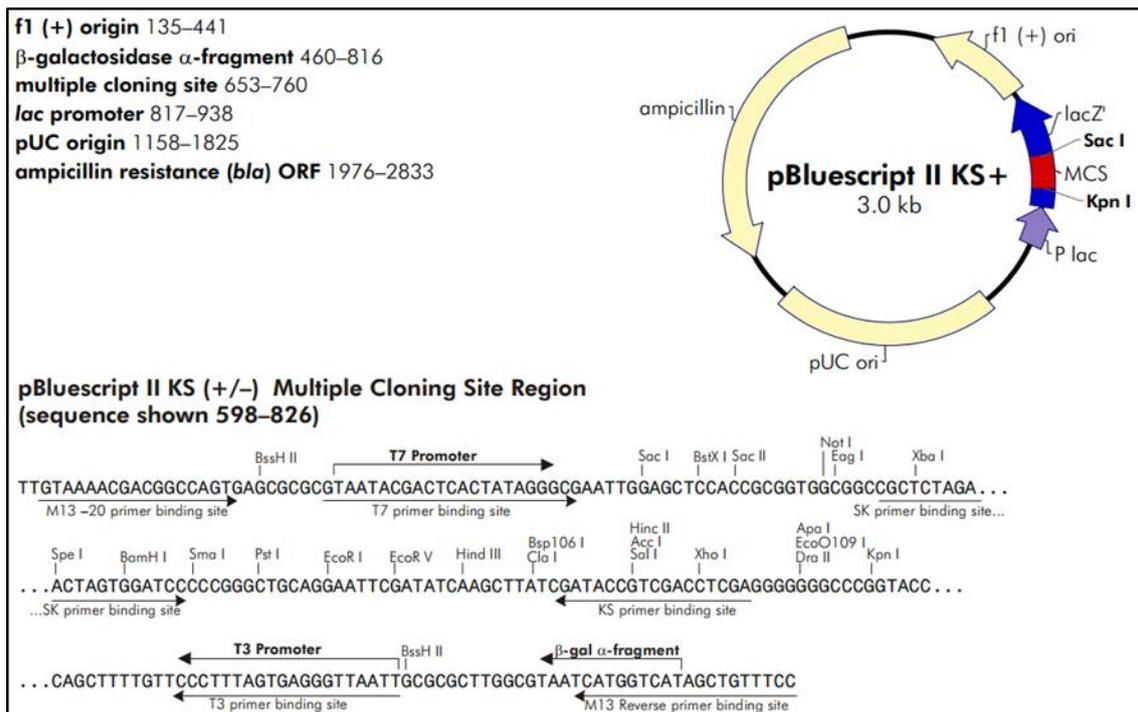


Figura 19. Vetor de clonagem pBluescript II KS (+/-). Especificações do vetor como indicadas na figura (http://www.genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescriptII_KSplus_webpg.pdf).

Uma alíquota de 5 µL deste pré-inóculo foi colocada a crescer em 200 mL do meio YT2x a 37 °C sob agitação até atingir uma OD₆₀₀ de 0,6 – 0,8 e posteriormente foi incubado no gelo (mantendo o material resfriado). Após resfriar a cultura celular, esta foi centrifugada a 1.700 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado, com delicadeza, em 200 mL de glicerol 10%. Esta nova suspensão celular foi centrifugada a 5.000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o processo anterior foi repetido usando a metade do volume de glicerol 10%. O último processo foi repetido mais uma vez, mas com a metade do volume de glicerol usado. Após descartar a maior parte do sobrenadante as células foram homogeneizadas com pipeta no volume residual de glicerol e alíquotas foram preparadas em microtubos usando gelo seco ou nitrogênio líquido.

A transformação da *E. coli* DH5α competente foi realizada com o plasmídeo montado como segue:

Transformação por eletroporação

Em condições estéreis, 5 µL de plasmídeo foram inseridos em 50 µL de células competentes. Foram misturados delicada e rapidamente os componentes

mencionados para posteriormente dar um pulso no eletroporador em condições de voltagem e tempo de 2,5 kV e 5,0 ms, respectivamente. Imediatamente, estas células foram reanimadas transferindo-as a 3 mL de meio SOC o qual se compõe de Bacto-triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,584 g/L, KCl 0,186 g/L, adicionado de MgCl₂ 0,1 M, MgSO₄ 0,1 M e glicose 0,2 M com pH ajustado para 7,0. Esta suspensão celular foi recuperada sob agitação a 37°C por 1 hora. Finalmente, desta cultura recuperada foram semeadas diluições de 1:10, 1:100 e direto (100 µL) em placas com meio ágar YT2X adicionado de ampicilina 150 µg/mL e IPTG 100 mg/mL e X-GAL 20 mg/mL segundo seja o caso.

As colônias brancas maiores e mais isoladas foram selecionadas para avaliar a qualidade e integridade do material de interesse (DNA da To5). Estas colônias foram avaliadas por:

PCR de colônia

A mistura foi preparada para cada reação com tampão KCl 1x, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0,2 mM, *primers* 0,2 µM, Taq DNA Polimerase (NEB) 0,1 U/µL, 5 µL de células e completando para 10 µL com água Milli-Q. As condições de PCR são como indicadas nos PCRs anteriores, sendo o produto desta reação observado em gel de agarose 0,1%.

As PCR de 7 colônias foram feitas, sendo selecionadas as colônias 1, 3, 5 e 7 para posterior lise alcalina mostrando que todas tinham o tamanho esperado de 343 pb (Fig. 18B). A lise alcalina permite extrair da bactéria o plasmídeo com o DNA de interesse:

Lise alcalina

Colônias previamente selecionadas da PCR de colônia foram colocadas a crescer em meio LB líquido adicionado de ampicilina 100 µg/mL, a 37 °C sob agitação por 12 horas. Logo após, as colônias foram separadas por centrifugação a 4.000 g. Foi adicionado 200 µL da solução I (em concentração mM Dextrosa 50, Tris 25 e EDTA 10 a pH8), passados 5 min foi colocada a solução II em gelo (SDS 1 %, NaOH 2 M) e, por último, a solução III (KCH₃CO₂ 5M e ácido acético glacial). Após esperar 15 min, o material foi

centrifugado a 19.000 g e o DNA foi precipitado com ajuda de metanol 100 % e 70 %, respectivamente.

Este material foi avaliado com gel de agarose 0,1% observando pureza e integridade. Das quatro colônias selecionadas as últimas três foram indicadas para continuar o processo dado que tiveram o tamanho esperado de $\pm 2,5$ kb (Fig. 18C). O plasmídeo da colônia 1 foi rejeitado para próximas etapas. O posterior sequenciamento do plasmídeo seguido da análise no *software* ApE da colônia 3 mostrou fidelidade com a sequência precursora da To5 esperada:

```
Sequência 1>GAGGATCCGGTATGACGATGACAGCAGCCGAGTGGTTATCCGGTGACCCAGAAAGGCTGTGTTACTCTTGCTTTTGGGGATCAAATTTGGTGGTGTAA>100
Esperado 1>GAGGATCCGGTATGACGATGACAAGAGCCGAGTGGTTATCCGGTGACCCAGAAAGGCTGTGTTACTCTTGCTTTTGGGGATCAAATTTGGTGGTGTAA>100

Sequência 101>CGCAGAATGCACAGCCCTGGGTGGCAGCTCCGGGTATTGTGCGTGGCCAGTTGCTGGTGTACTCATTACCTGATAATCGTAATATTTGGGGTTCGTAT>200
Esperado 101>CGCAGAATGCACAGCCCTGGGTGGCAGCTCCGGGTATTGTGCGTGGCCAGTTGCTGGTGTACTCATTACCTGATAATCGTAATATTTGGGGTTCGTAT>200

Sequência 201>CCAAACAATTGCCTCGAGTC>220
Esperado 201>CCAAACAATTGCCTCGAGTC>220
```

A sequência apresenta o sítio de restrição da BamHI, seguido pela sequência de reconhecimento pela EK (enteroquinase) e, por último, a endonuclease XhoI. Este último sítio de restrição foi necessário incluí-lo para inserir este fragmento de DNA no vetor de expressão. Portanto, adicionará dois resíduos de aminoácido (L e E) no extremo C-terminal da To5 antes das Histidinas. O seguinte passo foi separar este fragmento de DNA do vetor de clonagem com as enzimas de restrição BamHI e XhoI usando a reação:

Tratamento com endonucleases de restrição

O vetor foi digerido (3,3 ng/ μ L aproximadamente) e seguindo as especificações do fabricante *New England Biolabs*, foram usadas as enzimas de restrição, os respectivos tampões e aditivos correspondentes segundo requerimentos da enzima em uso, completando com água Milli-Q até 200 μ L. Para as enzimas NdeI, BamHI, XhoI (adicionadas com BSA 1 μ g/mL) e EcoRI foi usado 0,5 U/ μ L de cada enzima por reação. O tampão NEBuffer 3 foi usado à concentração final de NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM e DTT 1 mM a pH 8,0. Para todas as enzimas as reações ocorreram a 37 °C durante 2 horas, com exceção da enzima EcoRI (1 hora de incubação).

Este fragmento nucleotídico da To5 foi separado por gel de agarose 0,1% e purificado usando o *kit* de extração do gel da QIAGEN (descrito antes). A

quantidade de material obtido foi de 15 ng/μL em 50 μL que foi armazenado a – 20°C para sua posterior inserção no vetor de expressão pET22b (Fig. 20).

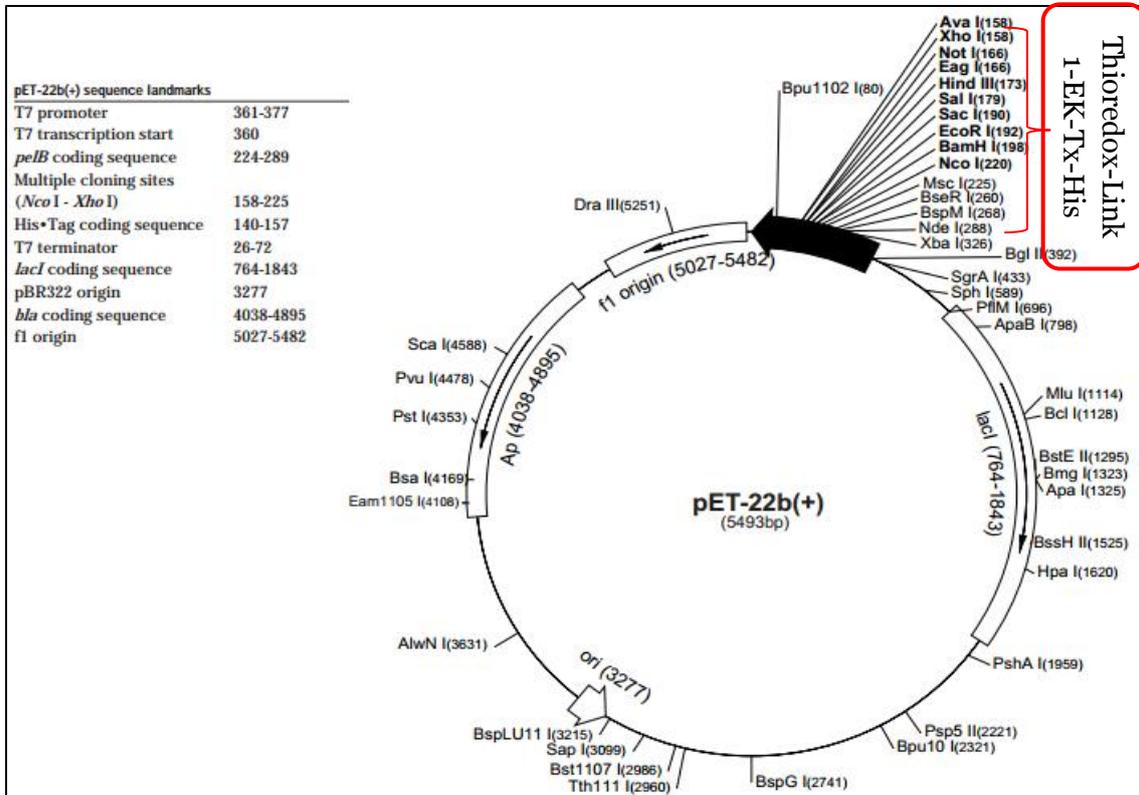


Figura 20. Vetor de expressão pET-22b(+). Especificações do vetor como indicadas na figura. Em vermelho se indica o vetor de trabalho previamente modificado com Tioredoxina, seguido do sítio de reconhecimento da enteroquinase e a toxina Cn2 substituindo uma faixa (130 pb aproximadamente) do sítio de reconhecimento das enzimas de restrição entre Xho I e Nde I. A sequência deste fragmento nucleotídico é apresentada na frente. Mapa do vector tomado do site (http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf).

Neste trabalho foi desenhado o material de expressão da To5 com cauda de histidinas no C-terminal e uma proteína carreadora no N-terminal. Para desenvolver este passo, o gene da toxina To5 foi fusionado com o gene da tioredoxina para finalmente expressar o complexo Tioredoxina-To5His. Para tanto foi proposto o desenho:

pET22b::ThioEK-TxHis

Onde **pET22b** é o vetor de expressão, **Thio** é a proteína fusão (Tioredoxina) que será expressa junto à toxina de interesse, **EK** é o sítio de reconhecimento

Primeiramente, este plasmídeo modificado foi clonado em *E. coli* DH5 α e foi extraído da célula por lise alcalina (processos mencionados antes). Após quantificação 15ng/ μ L, foi feita digestão deste vetor (Fig. 20) com BamHI/XhoI. Em seguida, este material foi separado com gel de poliacrilamida 12 % e extraído usando o *kit* de extração do gel da QIAGEN. Com isso foi separada a sequência de DNA que codificava a toxina **Cn2**, ficando o plasmídeo pET22b purificado e pronto para receber o novo inserto (To5) previamente sintetizado e purificado.

As duas moléculas (To5 e pET22b) foram submetidas a reação de ligação (anteriormente explicado), inserindo o DNA que codifica a To5 do clone 3 no vetor. Esta ligação foi clonada em células *E. coli* DH5 α . As células transformadas foram crescidas a 37°C por uma hora e, logo após, as células foram plaqueadas em meio LB ágar adicionado de Ampicilina 100 μ g/mL e crescidas por 12 horas a 37°C. As colônias foram selecionadas para avaliação do plasmídeo por meio de PCR de colônia. Após conferir os tamanhos do clone por gel (Fig. 18 D), as colônias selecionadas foram crescidas por 12 horas a 37°C sob agitação (100 rpm). Dita suspensão de bactérias foi submetida a lise alcalina e posteriormente identificadas por sequenciamento (Fig 18 E). Para continuar nosso processo de expressão heteróloga da proteína fusão (Tiorredoxina-To5His), os clones 1 e 2 foram selecionados.

O desenho deste plasmídeo foi estrategicamente realizado para facilitar a expressão da toxina. A saber, O vetor selecionado é do tipo T7 que permite uma taxa elevada de transcrição dos mRNAs da proteína alvo e possui o *pelB*, um código genético para um peptídeo sinal que transporta a proteína alvo ao periplasma da bactéria favorecendo sua estruturação terciária. A tiorredoxina, expressa junto à To5, favorece a expressão e solubilidade do produto recombinante. O sitio de reconhecimento da enteroquinase será o local da sequência de aminoácidos que permitirá separar a tiorredoxina da To5 após ser expressa. E por último, as seis histidinas no C-terminal adicionado à toxina auxiliará na separação e purificação por cromatografia de afinidade. Cabe destacar que estas histidinas permanecem ligadas nesse extremo da To5. Portanto, entre a To5 nativa e a To5 recombinante haverá diferenças estruturais. A proteína fusão final seria:

10 20 30 40 50 60
 AMSDKIIHILT DDSFDTDVLK ADGAILVDFW AHWCGPCKMI APILDEIADE YQGKLTVAKL

 70 80 90 100 110 120
 NIDHNPGTAP KYGIRGIPTL LLFKNGEVAA TKVGALSKGQ LKEFLDANLA GSGSG**DDDDK**

 130 140 150 160 170 180
 SRSGYPVTQK GCVYSCFWGS NWWCNAECTA LGGSSGYCAW PSCWCYSLEP NRNIWGSYPN

 190
 N**C**LEHHHHHH

A sequência da proteína fusão recombinante mostrando a **Tiorredoxina**, seguida do sítio de reconhecimento pela **enteroquinase** e a **To5-6His** como indicado anteriormente. Em negrito, dois resíduos de aminoácidos adicionais no C-terminal da To5 produto da montagem com a endonuclease **XhoI**.

4.6.2. Produção da proteína recombinante

Para produzir a proteína recombinante fusão foi necessário transformar as linhagens usadas neste trabalho (Tabela II) com o vetor de expressão anteriormente desenhado e montado. O processo de preparação de células competentes e transformação foi como já mencionado.

A expressão de proteínas nem sempre é satisfatória. Para tanto se devem seguir alguns processos com o intuito de melhorar o processo de produção. Usando informações de toxinas recombinantes reportadas na literatura, foi iniciado um protocolo de expressão. A partir desse protocolo começou-se a modificar as diversas variáveis por cada processo de expressão na tentativa de conseguir bons resultados. Por exemplo, O processo de expressão é iniciado com uma linhagem, um meio de cultura, concentrações de indutor, etc. definidos. Depois de purificar e avaliar por gel a produção da recombinante, um novo processo é começado mudando só um dos parâmetros no processo de produção por vez (Fig. 21). Assim, o processo é cíclico até achar a melhor estratégia a usar para expressão da proteína alvo.

Tabela II. Linhagens de *E. coli* e plasmídeos usados.

Linhagem de <i>E. coli</i> testada	Característica
DH5 α	Linhagem para clonagem do plasmídeo
BL21 (DE3)	Mutação das proteasas. Inclui no seu genoma o lisogeno λ DE3. Expressão sob controle do <i>LacUV5</i> .
Rosetta (DE3)plysS	Adicionalmente à BL21, tem uso de transferentes usados por eucariotas. O plasmídeo <i>plysS</i> regula a expressão basal da proteína alvo.
SHuffle®T7(NEB)	Expressa a DsbC que favorece a oxidação “correta” de proteínas no citoplasma. Possui regulação no controle da expressão que permite a produção de genes potencialmente tóxicos. Favorece a expressão de proteínas para cristalização.
Origami (DE3)	Adicionalmente à BL21, possui mutações nas redutases que tornam o citoplasma redutor.
Plasmídeos usados	
pBluescript II KS (+/-)	Vetor de clonagem do DNA To5
pET-22b(+)	Vetor de expressão da proteína To5 fusão com promotor T7, <i>pelB</i> e histidinas.



Figura 21. Processo geral de expressão heteróloga da To5. Neste organograma são apresentados os três passos gerais do processo completo. Desde o desenho e montagem do material genético para expressão, passando pela produção nas células hospede, até finalizar a extração e purificação do material recombinante. As setas indicam o processo a seguir sendo que pode

iniciar (seta verde) tantas vezes seja necessário até atingir uma produção satisfatória.

A partir do seguinte protocolo foi testado o maior número de alternativas possíveis usando cada linhagem bacteriana mostrada na tabela II. O último processo no qual foi obtida a melhor expressão da To5 fusão está indicado nos resultados para cada linhagem testada. A primeira linhagem testada foi a *E. coli* BL21. Para isso foram preparados os seguintes meios de cultura para fazer os diferentes processos requeridos como preparo de células competentes e posterior expressão:

Meios de cultura

YT2x: A solução constituída de (em g/L) Triptona 16, extrato de levedura 10 e NaCl 5.

LB: A solução constituída de (em g/L) Triptona 10, extrato de levedura 5 e NaCl 10, com pH ajustado para 7,0. Para preparação de placas sólidas foi preparado meio LB adicionado de 15 g/L à agar.

TB: Constituído de (em g/L) 12,5 K₂HPO₄, 2,3 KH₂PO₄, 12 Bacto Triptona, 24 extrato de levedura e 4 mL de glicerol.

A partir de uma colônia selecionada contendo o material gênico a expressar foi preparado um pré-inóculo em meio LB adicionado de ampicilina 150 µg/mL. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm por 6 horas. Um volume deste pré-inóculo foi transferido ao meio de cultura YT2x adicionado de ampicilina 100 µg/mL atingindo uma OD₆₀₀ de 0,05 como indicado a seguir:

$$\text{Quantidade do pré – inóculo a utilizar (mL)} = \frac{[0,05] \times 500 \text{ mL de meio}}{\text{OD}_{600} \text{ do pré – inóculo}}$$

Onde [0,05] é a concentração celular ótima inicial no meio de cultura total.

Foi incubado a 37°C sob agitação a 200 rpm até atingir uma OD₆₀₀ = 1 ou mais (este parâmetro de crescimento celular é crítico para a otimização da expressão). A partir deste passo foi separada uma alíquota de cada processo para verificação em gel de poli-acrilamida 12%.

Para induzir a expressão do alvo foi adicionado IPTG a uma concentração final de 1 mM. Logo após, foi incubado a 30°C sob agitação entre 100 - 130 rpm durante a noite ou mínimo 6 horas (a cinética da expressão pode ser avaliada separando uma amostra de células a cada hora de crescimento celular, seguido de uma lise celular para extração de proteína total e observando os produtos da expressão em gel de poliacrilamida). Esta cultura celular foi resfriada no gelo e a partir daqui todo o processo foi feito a 4°C. Esta cultura foi centrifugada a 4°C por 10 min entre 8.000 – 8.500 g e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente foi pesado o crescimento celular (biomassa) e de imediato estas células foram mantidas a – 20°C durante, no mínimo, 2 horas.

4.6.3. Tampões de extração

Foram preparados as soluções e tampões necessários para extração da proteína alvo. Os reagentes a seguir:

H₂O destilada

Esta solução hipotônica foi usada para extrair parte da proteína por choque osmótico.

PPB

Um tampão hipertônico constituído de sacarose 20 % Tris-base 30 mM, pH 8,0.

Tampão Tris-Base

Solução de Tris-base 30 mM a pH 8,0, resfriada foi usada alternativamente.

Para extração da proteína recombinante do espaço periplasmático foi necessário expor as células a choque osmótico. Primeiramente, estas células foram homogeneizadas em (25 mL/L de cultura preparada) de tampão de extração periplásmica PPB, o qual se constitui de sacarose 20% e Tris base 30 mM pH8, e foram incubadas no gelo por, no mínimo, 30 min. Esta suspensão celular foi centrifugada a 4°C entre 4.000 – 6.500 g durante 20 min. O sobrenadante foi guardado na geladeira (esta solução contém a primeira extração da proteína recombinante de interesse) e o *pellet* continuou o processo a seguir para extração da proteína fusão remanescente.

Para a segunda extração foi preciso adicionar (25 mL/L de cultura preparada) água destilada resfriada, logo após se homogeneizou e se deixou por mais 30 min no gelo. Foi preciso repetir o passo de centrifugação do processo anterior. Neste sobrenadante se obtém a segunda extração de proteína recombinante.

Ao *pellet* do processo anterior foi adicionado (~ 2 volumes do *pellet*) Tris base 50 mM, pH 8 ou água Milli-Q. Depois, foi adicionado 10 % v/v de lisozima 10 mg/mL o material mantido no gelo por mais 30 min. Após esse tempo, o material foi submetido a três pulsos de 30 seg, com intervalos de 30 seg, de ultrassom (desruptor de célula ultrassônico UNIQUE). Posteriormente, esta solução foi diluída com soluções tampão Tris base ou tampão fosfato-salino PBS até que o volume da preparação alcançou entre 4 – 6 vezes o volume inicial e homogeneizado. As condições de centrifugação foram as mesmas do processo anterior. Deste sobrenadante se obteve a terceira extração de proteína recombinante.

4.6.4. Cromatografia de afinidade

O sobrenadante do processo anterior contém a proteína alvo. Este foi passado pela coluna de afinidade de níquel como primeiro passo de purificação. Os reagentes necessários a seguir:

Soluções de equilíbrio e eluição para cromatografia de afinidade

4 Soluções de Tris-base 50 mM a pH 8,0, constituídas de Imidazol 10 mM, 20 mM 35 mM e 0,3 M, respectivamente.

Para purificação da proteína recombinante foi usado um protocolo de afinidade por Níquel (QIAexpress® System QIAGEN) aproveitando a aderência que tem a cauda de histidinas desenhadas nas proteínas recombinantes à resina de Níquel Ni-NTA ou Ni-IDA. Mais um passo de purificação foi feito por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa RP-HPLC (Método explicado anteriormente). Neste processo por afinidade, as três soluções primeiramente extraídas das células foram eluídas por uma coluna previamente preparada de Ni-NTA onde a fase móvel é imidazol a três concentrações (20 mM, 35 mM e 300 mM) diluído em Tris HCl 50 mM, pH 8, ou, alternativamente, PBS.

4.6.5. Avaliação da expressão por gel de poliacrilamida

Finalizada a extração da proteína fusão foram feitos géis de poliacrilamida 12% para identificar a expressão da proteína alvo. As condições de corrida são 15 min. a 60 V durante a fase de concentração de proteína. Após isso, a voltagem foi aumentada para 85 V durante 2 horas aproximadamente. Os reagentes a seguir:

Tampão de corrida para gel de poliacrilamida

Solução constituída de Tris 0,025 M, Glicina 0,190 M e SDS 0,1 % com pH 8,6

Tampão da amostra para gel de poliacrilamida

Solução constituída de Tris 50 mM pH 6,8, Glicerol 10%, SDS 2 %, Azul de bromofenol 0,1 % e β -mercaptoetanol 2 %.

Azul de coomassie

Solução constituída de Coomassie Blue 0,25%, Metanol/H₂O destilada 1/1 e ácido acético 10 %.

4.6.6. Preparação alternativa para Gel de poliacrilamida SDS PAGE

Diversas preparações de géis de poliacrilamida foram realizadas segundo os requerimentos da amostra. Usando uma mistura convencional de gel de poliacrilamida 30% (Bis-acrilamida e acrilamida 0,8 e 29,2%, respectivamente), foram preparados diversos géis que variaram entre 12 e 16 % para correr as amostras. As modificações, quando necessárias, foram realizadas usando como tampão de corrida Tris-glicina (convencional para proteínas) ou Tris-tricina, sistema especialmente usado para peptídeos (Schägger, 2006) e suas adaptações ao sistema como indicado em (Haider *et al.*, 2012). Adicionalmente ao corante convencional coomassie blue, outro corante foi preparado para usar com peptídeos ou amostras em pequenas quantidades. O azul de coomassie coloidal que permite resolução em nível de nanogramas foi preparado como indicado (Candiano *et al.*, 2004). Soluções como a solução de fixação de peptídeos no gel foram preparadas como descrito (Santucci *et al.*, 2015).

4.6.7. Digestão da To5 fusão com enteroquinase

Por último, dado que a proteína recombinante é uma fusão da toxina To5 com a Tioredoxina, este complexo foi digerido com a enteroquinase (NEB) seguindo as especificações do fabricante. Este processo foi avaliado por gel de poliacrilamida. As massas moleculares respectivas desta molécula e seus fragmentos após digestão foram caracterizados como indicado anteriormente. A relação destes dados é apresentada nos resultados da expressão heteróloga.

5. RESULTADOS

5.1 PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS To4 e To5 NATIVAS POR RP-HPLC

As toxinas To4 e To5 foram primeiramente purificadas da peçonha bruta por cromatografia líquida de alta eficiência seguindo o padrão explicado na metodologia (Fig. 22A). Após isso, cada toxina foi purificada seguindo suas próprias características hidrofóbicas.

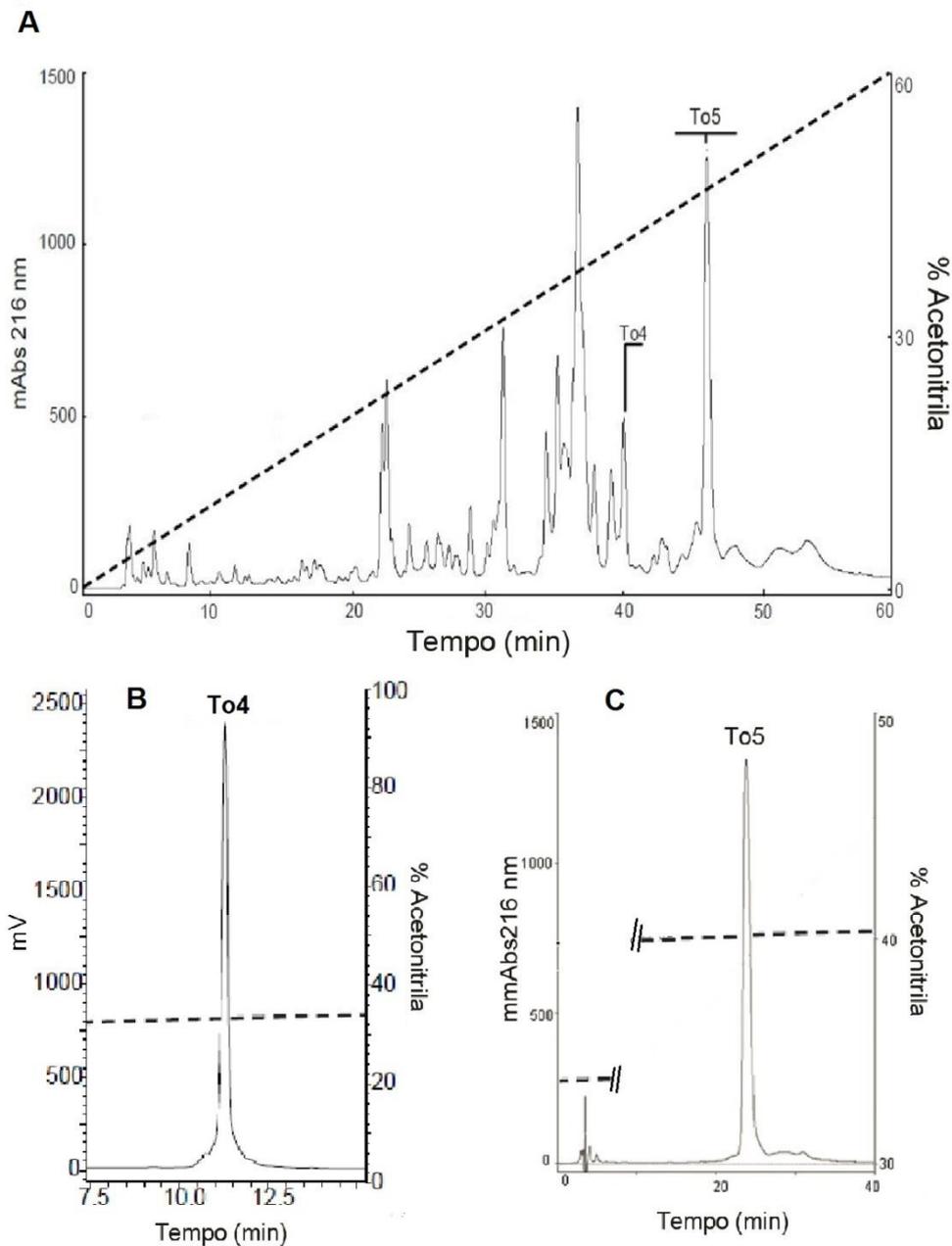


Figura 22. Purificação das toxinas To4 e To5 nativas. **A**, Cromatografia geral da peçonha do escorpião *T. obscurus* seguindo o protocolo especificado na

metodologia. **B**, purificação da To4 por recromatografia. **C**, purificação da To5 por recromatografia.

A To4 apresentou dificuldade em ser purificada e finalmente foi separada colocando temperatura (50°C) durante o processo. Esta eluiu em 33% de acetonitrila (Fig. 22B). A To5 eluiu em 47% de acetonitrila (47 min) na primeira etapa de purificação. Na última etapa utilizou-se uma gradiente linear de 0,25% de acetonitrila eluindo esta toxina em 40% de acetonitrila (Fig. 22C).

5.2 MASSA MOLECULAR DAS TOXINAS To4 E To5 NATIVAS

As massas moleculares experimentais destas toxinas mostraram ser próximas das massas moleculares teóricas. A To4 apresentou uma massa molecular acurada de 7.249,44 Da. com erro de 41ppm (Fig. 23). A To5 mostrou uma massa molecular média $[M+H]^+$ de 6.937,35 Da (Fig. 24). No entanto, esta massa molecular não mostra a diferença de aproximadamente 1 Da como esperado pela amidação C-terminal desta toxina.

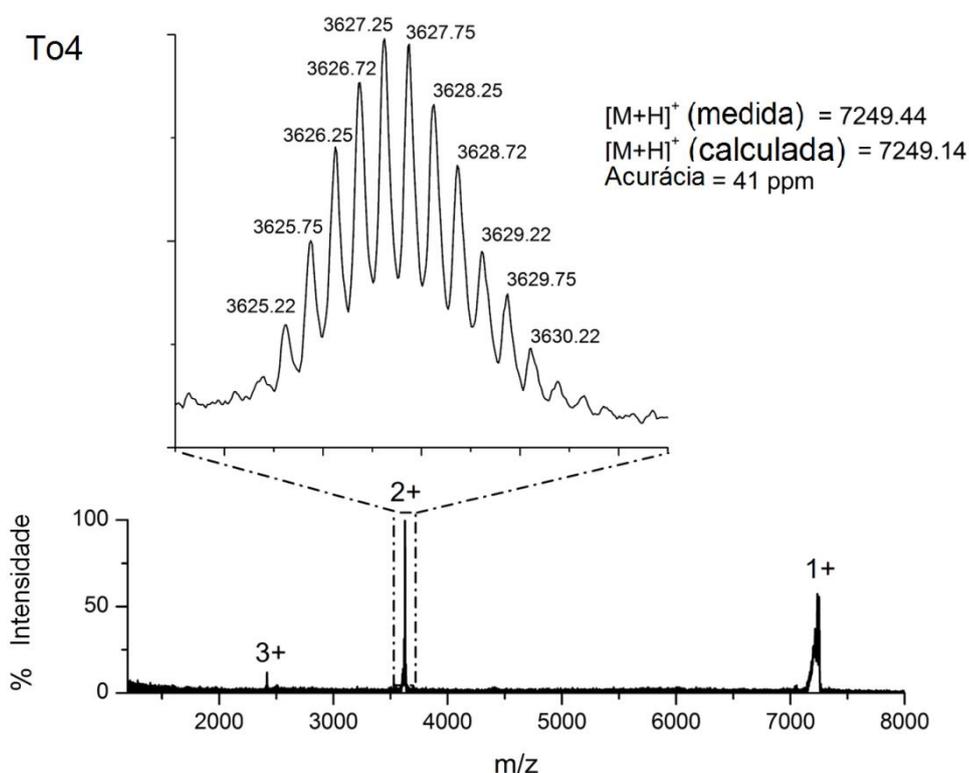


Figura 23. Espectro de massa molecular da To4. Espectro de massa mostrando a massa molecular média (1+) e mais dois estados iônicos da molécula (2+ e 3+). A massa molecular acurada mostrada no espectro em dupla carga.

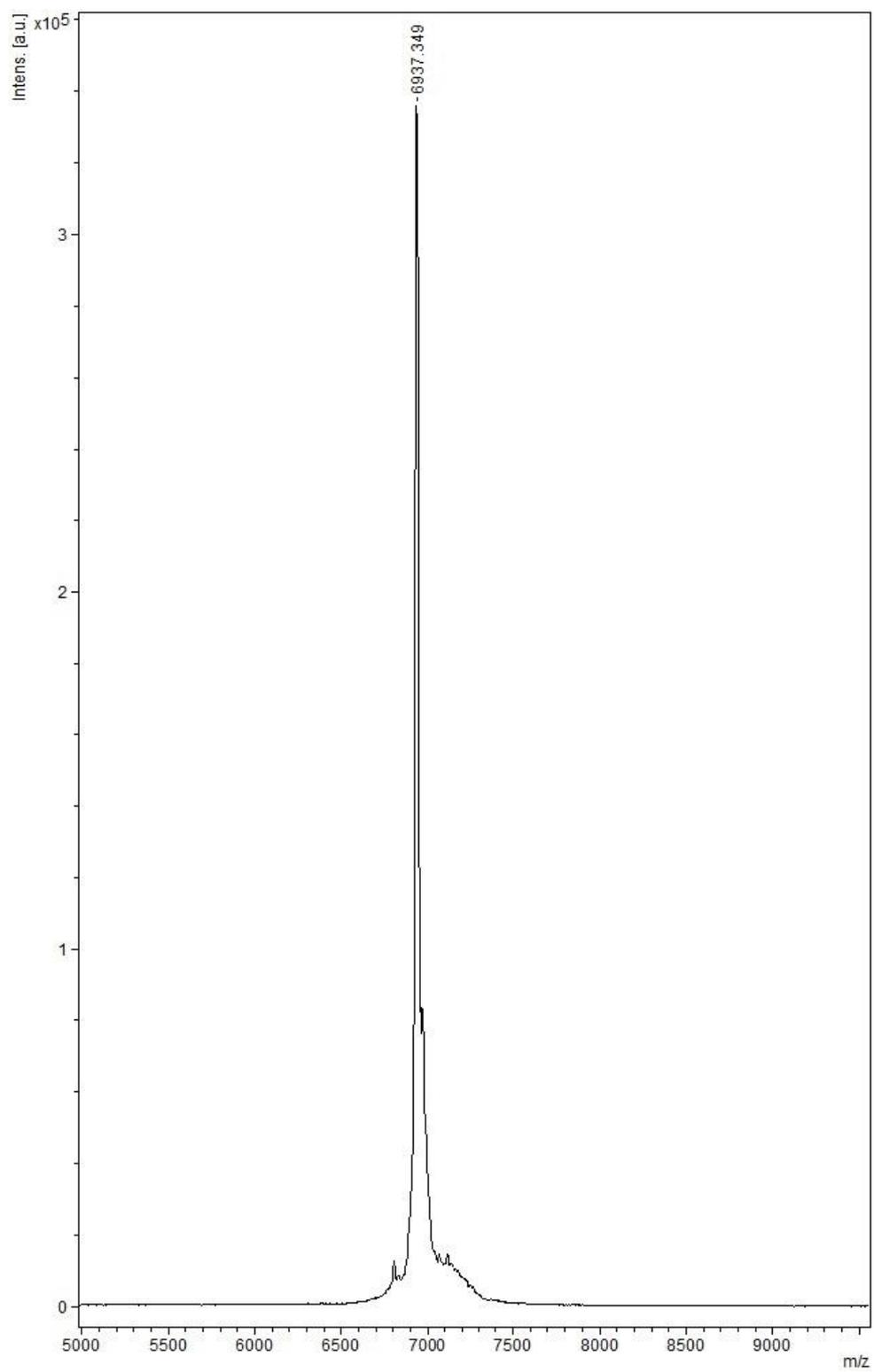


Figura 24. Espectro de massa molecular media da To5.

A massa molecular experimental acurada usando modo refletido $[M+2H]^+$ da To5 permitiu achar seu íon $[M+H]^+$ que foi de 6.932,52 Da (Fig. 25). Considerando as 4 ligações dissulfeto e a amidação C-terminal desta toxina, a massa molecular teórica acurada seria de 6.932,88 Da. A diferença entre estas massas moleculares apresenta um erro experimental de 51 ppm. Portanto, a massa molecular achada da To5 junto ao sequenciamento parcial mostrado na frente, mostram que esta é a toxina alvo purificada da peçonha e que, esta encontrasse amidada no extremo C-terminal como predito pela sequência fornecida da biblioteca de cDNA (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012).

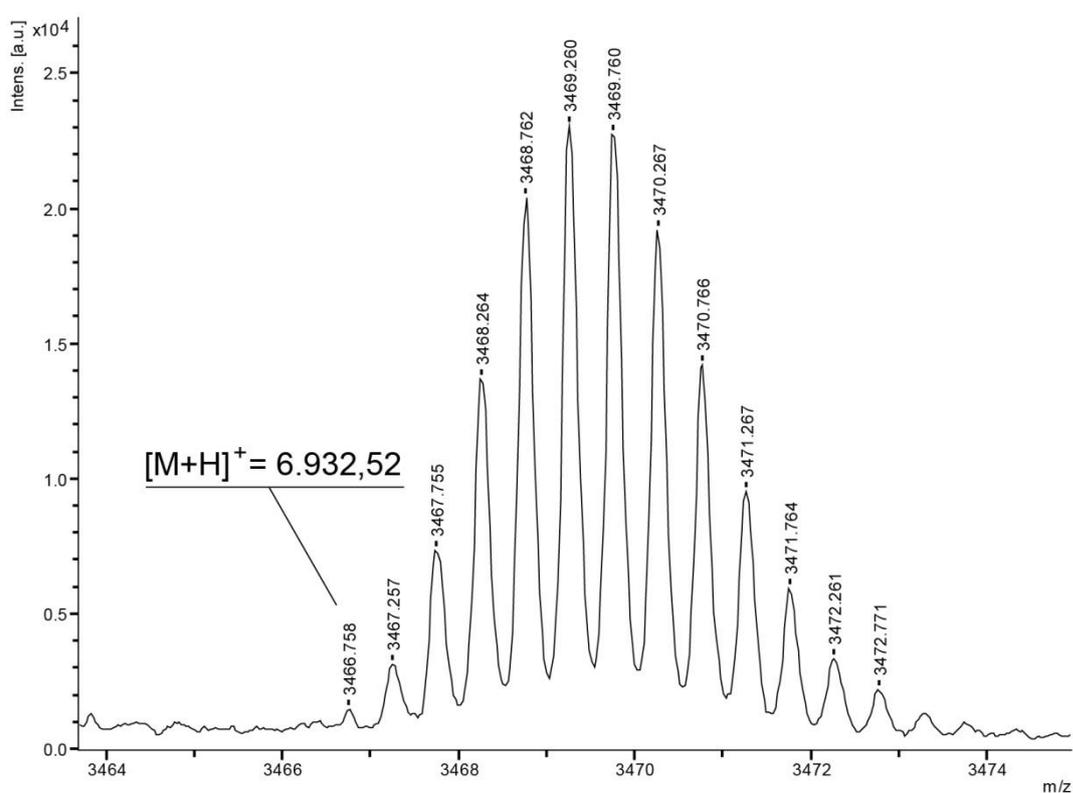


Figura 25. Espectro de massa molecular acurada da To5. Espectro mostrando o estado iônico $[M+2H]^+$ de massa molecular da To5.

5.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DAS TOXINAS NATIVAS POR ISD

Para conferir se as toxinas purificadas da peçonha do escorpião *T. obscurus* eram aquelas previamente determinadas pela biblioteca de cDNA (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), suas sequências parciais foram caracterizadas. As toxinas To4 e To5 foram submetidas à fragmentação de proteínas por ISD usando a matriz redutora DAN. Da To4 dezoito resíduos de aminoácidos foram

sequenciados por ISD (Fig. 26). Enquanto que da To5, usando como guia o transcrito, sua sequência parcial permitiu identificar 51 resíduos de aminoácidos no extremo C-terminal (Fig. 27).

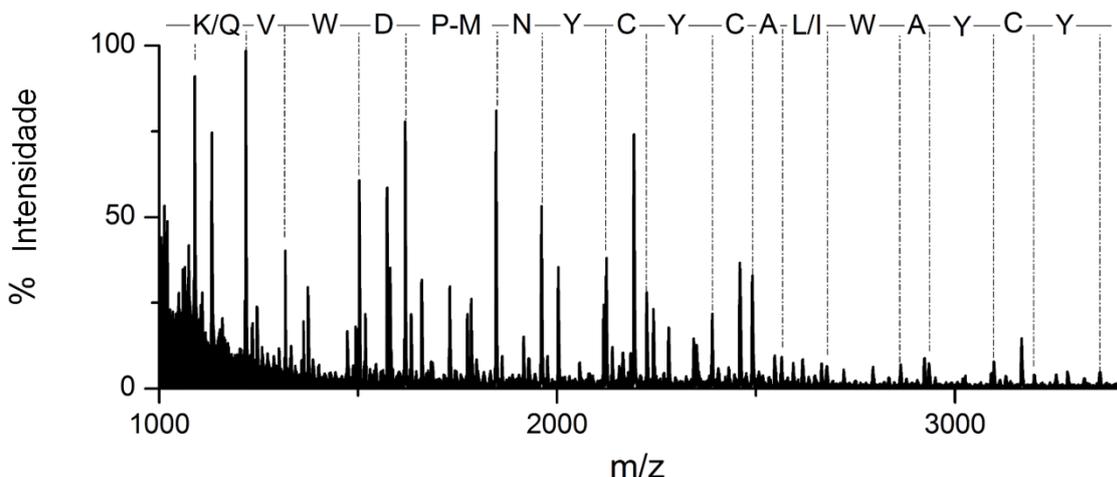


Figura 26. Sequência parcial da To4. Espectro de massa apresentando sequência parcial N-terminal da toxina.

5.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA To5 NATIVA POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN

Após degradação da toxina por Edman foram identificados 40 resíduos de aminoácidos no extremo N-terminal como indicado a seguir:

cdNA	MKAIIFFIGCLMLIDL VAGSRSGYPVTQKGCVYSCFWGSNWWCNAECTALGGSSGYCAWP
Edman	-----SRSGYPVTQKGCVYSCFWGSNWWCNAECTALGGSSGYCAW-
ISD	-----GCVYSCFWGSNWWCNAECTALGGSSGYCAWP

cdNA	SCWCYSLPDNRNIWGSYPNN CGKK	(Guerrero-Vargas <i>et al.</i> , 2012)
Edman	-----	(este trabalho)
ISD	SCWCYSLPDNRNIWGSYPNN----	(este trabalho)

As sequências da To5 completas ou parciais mostradas pela biblioteca de **cdNA**, degradação de **Edman** e fragmentação por espectrometria **ISD**, respectivamente. Em realce, o N-terminal da To5 mostrando seu peptídeo sinal e no seu extremo C-terminal, o sinal de amidação ausentes na toxina madura.

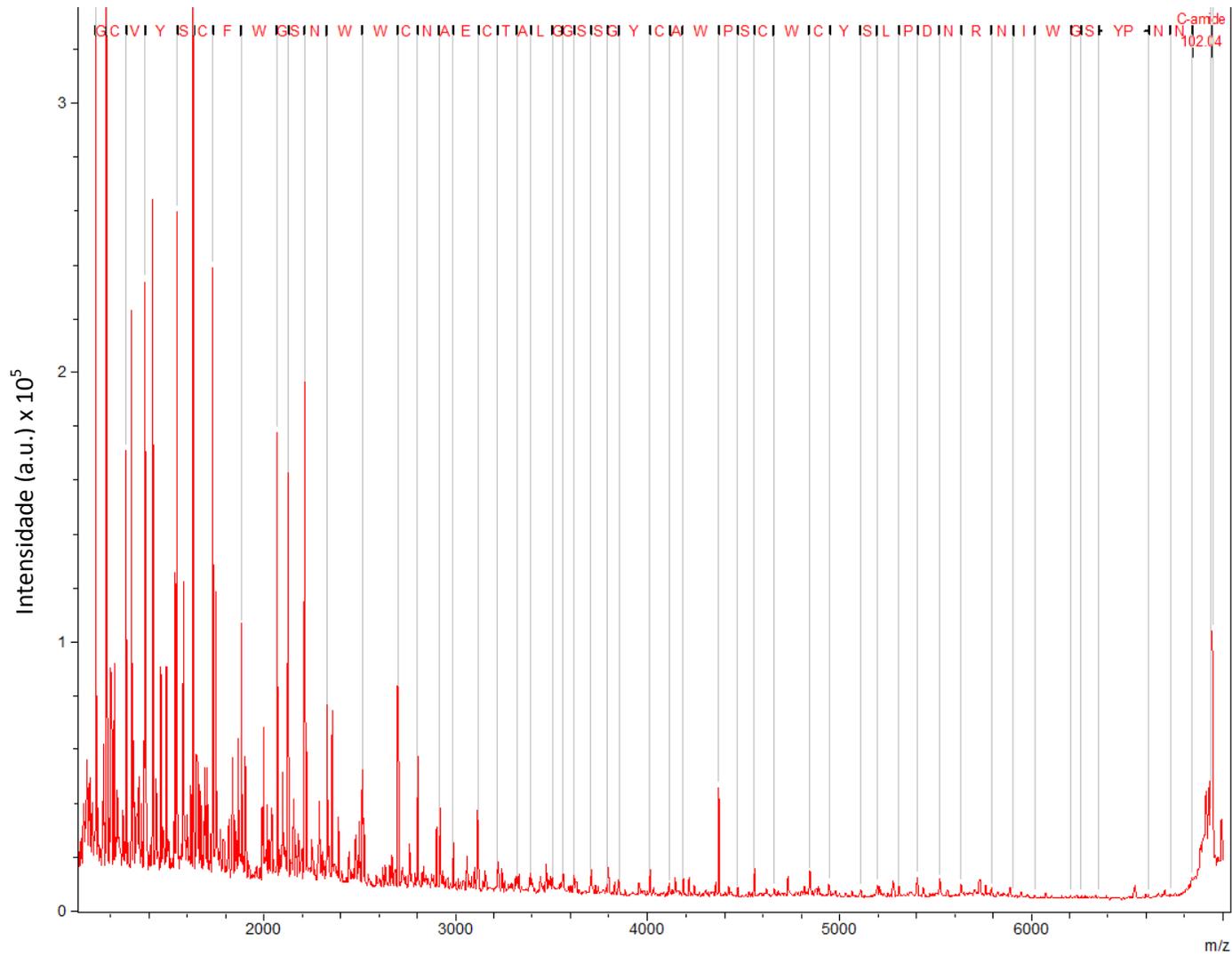


Figura 27. Espectro de sequência parcial da To5 por ISD. O espectro apresenta a sequência parcial da toxina To5 entre a G11 e a N61. Esta sequência de aminoácidos foi guiada pela sequência teórica obtida da biblioteca de cDNA. A degradação de Edman confirmou sua identidade.

5.5 TESTES ELETROFISIOLÓGICOS

As toxinas To4 e To5 nativas foram testadas sobre os subtipos de canais iônicos para sódio $Na_V1.1$, até $Na_V1.7$. Primeiramente, a To4 foi testada a 70 nM sobre cada subtipo de canal iônico. Logo após, foram selecionados os canais iônicos sobre os quais a toxina mostrou maior atividade, para assim, testar uma concentração maior. O critério de seleção foi por atividade no deslocamento da dependência de voltagem na ativação (*shift*), e diminuição das correntes deflagradas pela toxina sobre o canal iônico. A To5, no entanto, foi testada unicamente à maior concentração (500 nM) sobre todos os subtipos de canais iônicos.

5.5.1 Atividade da To4 sobre as I_{Na} dos Na_V s

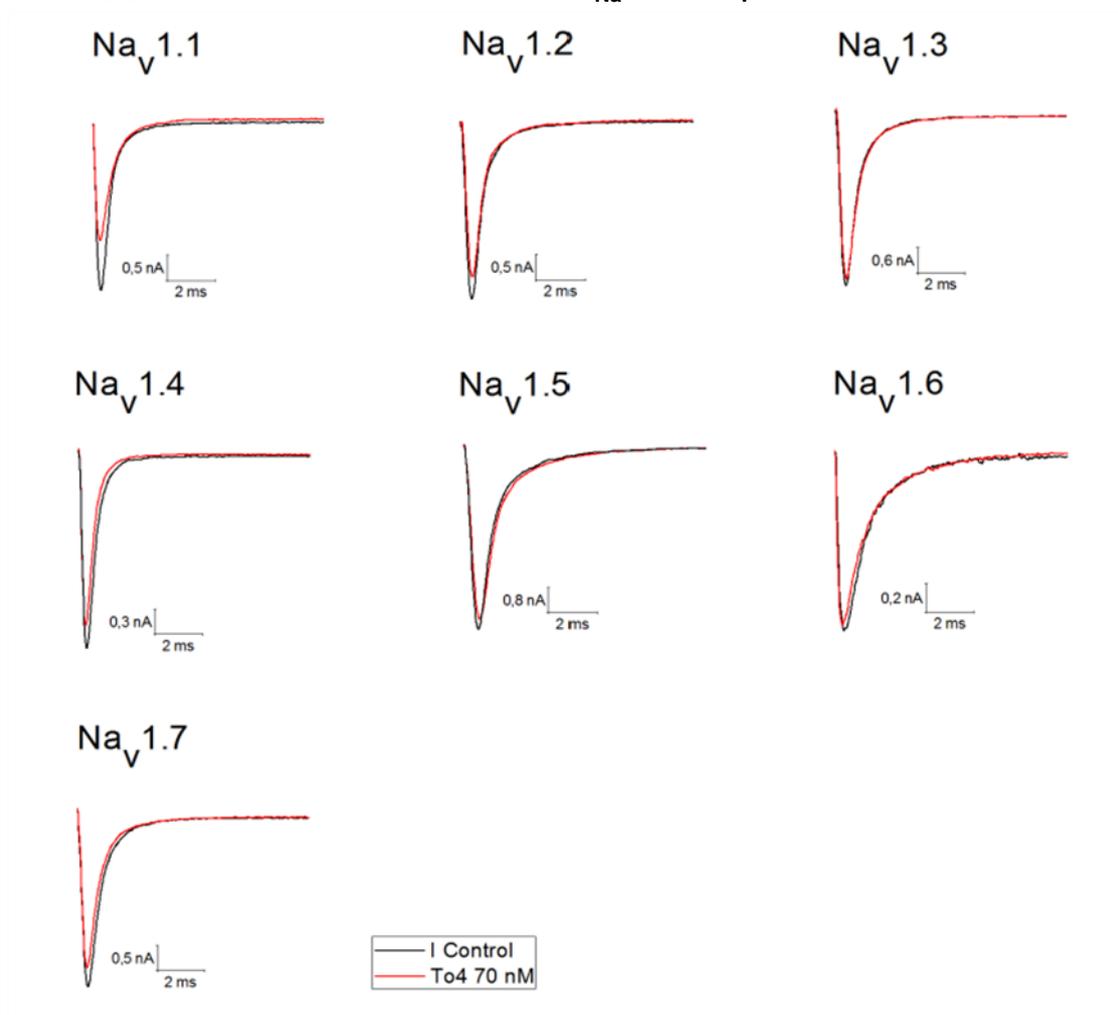


Figura 28. I_{Na} deflagradas com e sem To4 a 70 nM. Nesta figura são apresentados registros de correntes de todos os Na_V s testados. Em preto, o controle sem toxina e em vermelho, a mesma célula com a To4.

Assim que aplicada a To4 (70 nM), esta toxina mostrou afetar as I_{Na} de todos os subtipos de canais iônicos testados (Fig. 28). Os canais iônicos mais afetados foram $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.4$ e $Na_v1.7$ com diminuição de I_{Na} em 30%, 18%, 16% e 14%, respectivamente. Já a 500 nM, a toxina mostrou afetar ainda mais as I_{Na} dos subtipos de canais iônicos testados (Fig. 29). As condutâncias ao íon sódio foram diminuídas em 49%, 40% e 52% sobre os subtipos $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ e $Na_v1.4$, respectivamente (Fig. 30). Estes resultados mostram que a diminuição de I_{Na} deflagrada pela toxina sobre estes subtipos de canais iônicos para sódio, incrementou com a concentração da To4 testada.

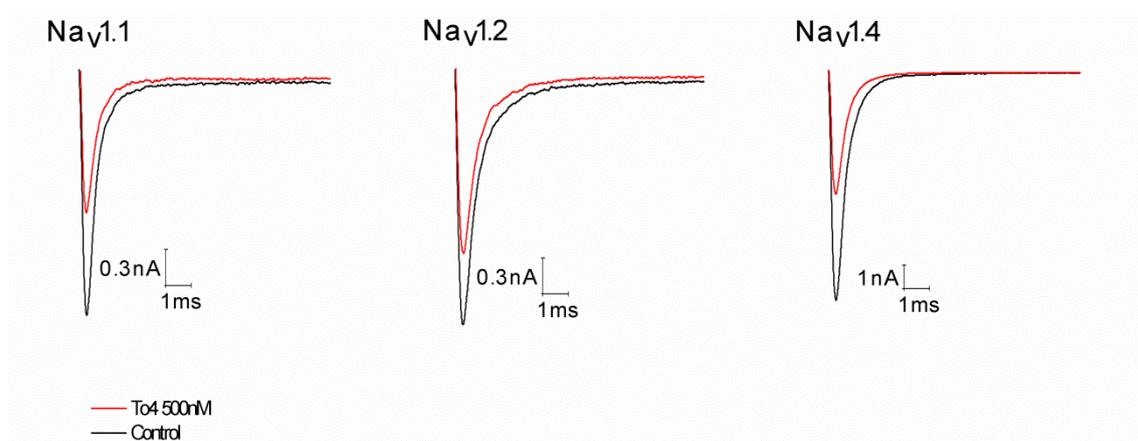


Figura 29. I_{Na} deflagradas com e sem To4 a 500 nM. Nesta figura são apresentados registros de correntes de três subtipos de Na_v s com e sem toxina. Em preto, o controle sem toxina e em vermelho, a mesma célula com a To4.

5.5.2 *Shift* de voltagem produzido pela To4

Para avaliar se a To4 teve atividade sobre a ativação dos canais iônicos testados, foi feita uma análise no deslocamento da curva de ativação dos canais iônicos quando aplicada uma voltagem. Para destacar esta diferença de *shift* de ativação entre o controle (correntes iônicas medidas sem toxina) e a To4 aplicada foi calculada a voltagem média de ativação V_{half} na qual há 50% de efeito desta toxina. Uma diferença entre as V_{half} de ativação com e sem toxina aplicada foi quantificada (Fig. 30).

Como acontecido com as correntes iônicas deflagradas depois de aplicar a toxina, estes experimentos exibem que a To4 (70 nM) afeta o *shift* de voltagem

de todos os canais iônicos testados (Fig. 31). O deslocamento de voltagem de ativação V_{half} foi mais pronunciado para os subtipos $Na_v1.2$, $Na_v1.4$ e $Na_v1.1$ com ΔV_{half} de 6,5 mV, 5,5 mV e 3,5 mV, respectivamente (Fig. 30). Estes subtipos de canais para sódio foram selecionados para testar a To4 a 500 nM. Nestas condições a toxina conseguiu deslocar ainda mais o *shift* de voltagem no subtipo $Na_v1.1$ (Fig. 31). Embora, quando testada sobre $Na_v1.2$ e $Na_v1.4$, a toxina não conseguiu afetar a mais a V_{half} , do que quando foi testada à concentração menor. Ou seja, a ativação destes últimos canais iônicos foi afetada pela toxina To4 similarmente às concentrações de 70 e 500 nM.

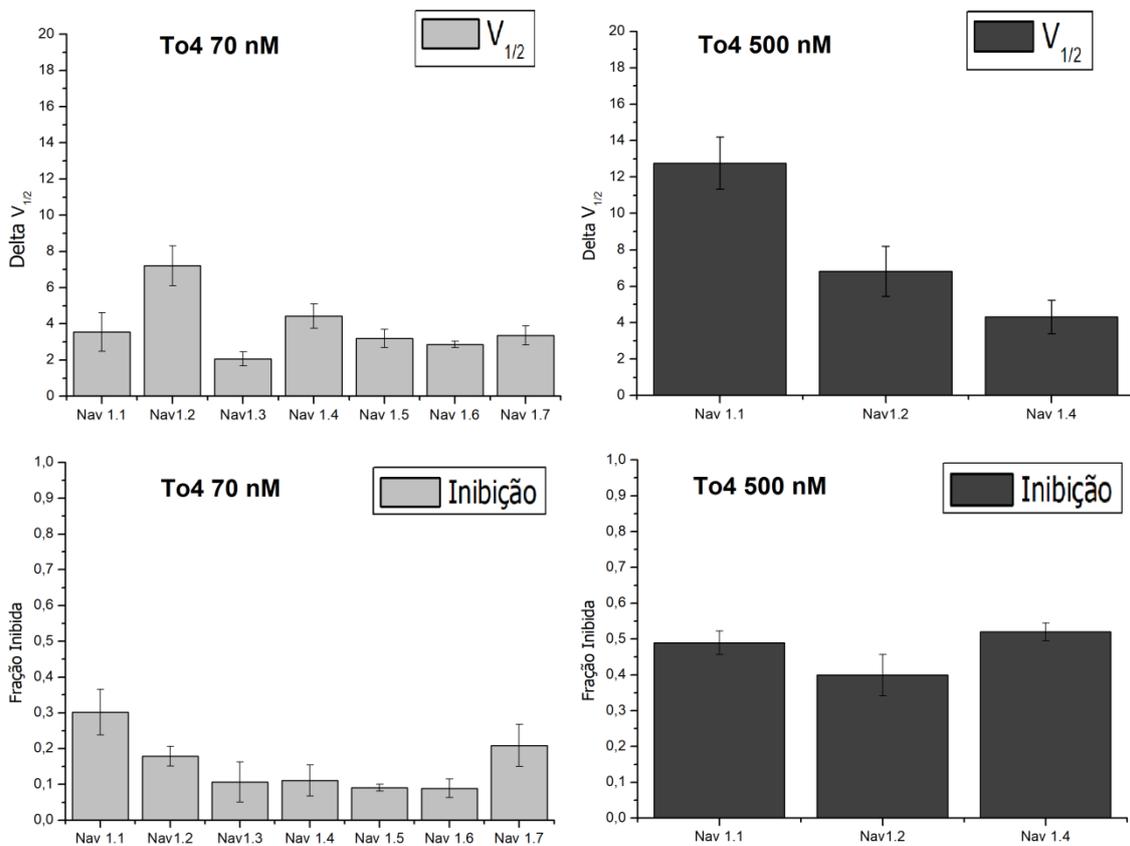


Figura 30. Representação gráfica dos registros dos Na_v s depois de aplicada a To4. Tanto a variação do *Shift* de voltagem (V_{half}) quanto as correntes foram diminuídas do controle sem toxina. A fração inibida está dada pela diminuição da condutância ao íon sódio. Número de células testadas a 70 nM (3-6) e 500 nM (4-6).

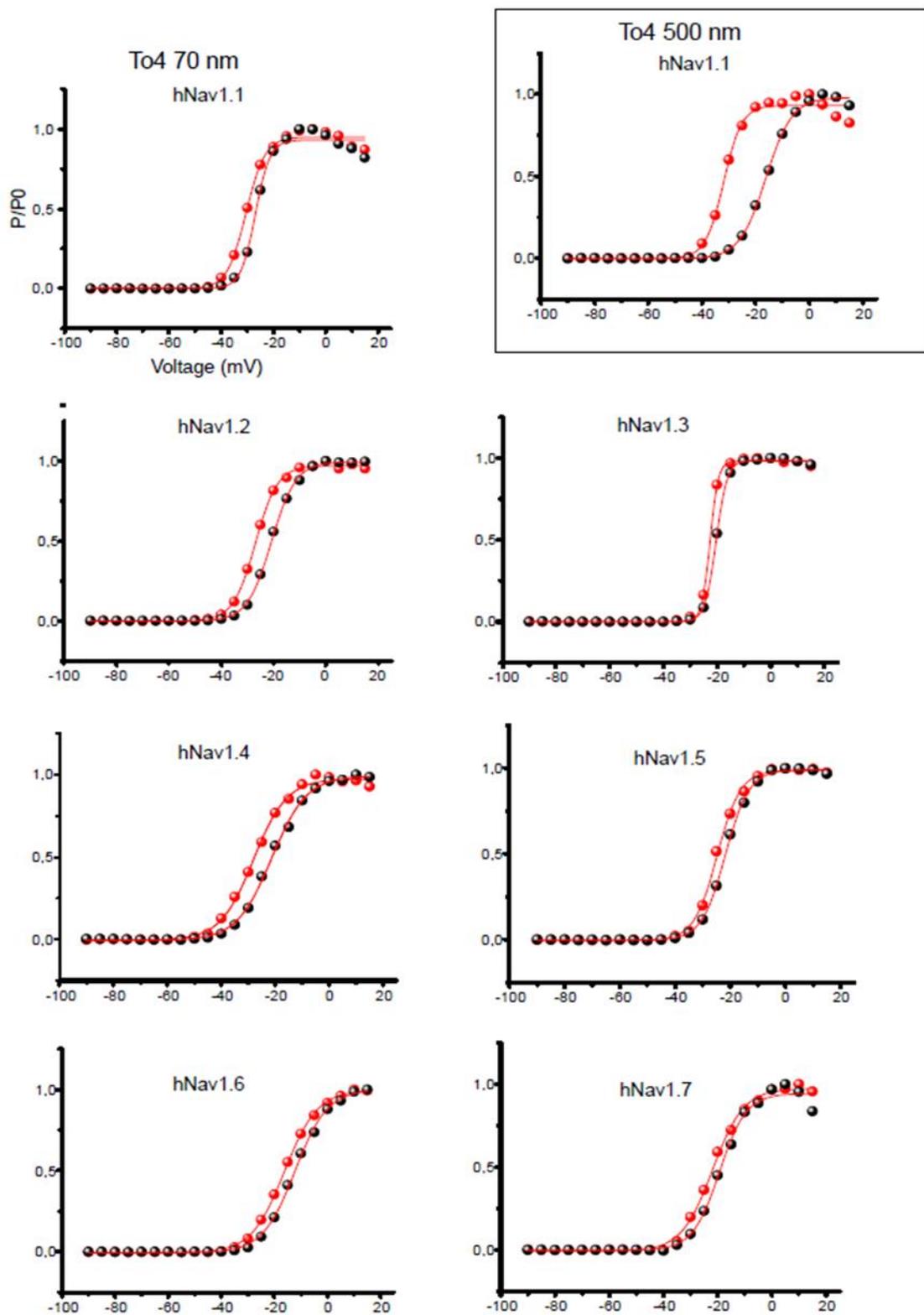


Figura 31. Variação do *shift* de voltagem produzido pela To4 sobre os hNa_v s. O *shift* de voltagem de cada Na_v está indicado pela condutância ao íon sódio ou probabilidade de abertura (P/PO) dos canais. Esta figura apresenta a toxina testada a 70 nM sobre todos os hNa_v s. Depois de testar a To4 a 500 nM sobre hNa_v1 , hNa_v2 e hNa_v4 , somente o hNa_v1 mostrou afetar seu *shift* quando comparado com o teste da To4 a 70 nM (no quadro).

5.5.3 Atividade da To5 sobre as I_{Na} dos Na_v s

Quando testada a toxina nativa To5 sobre os diferentes subtipos de canais iônicos, com exceção do efeito sobre $Na_v1.3$, foi observado que esta diminuiu as I_{Na} sobre quase todos os subtipos de canais iônicos para sódio de humano (Fig. 32). Sendo que a menor diminuição de I_{Na} induzida pela toxina foi sobre o subtipo $Na_v1.6$ e a maior atividade de inibição de I_{Na} , foi sobre os canais $Na_v1.5$.

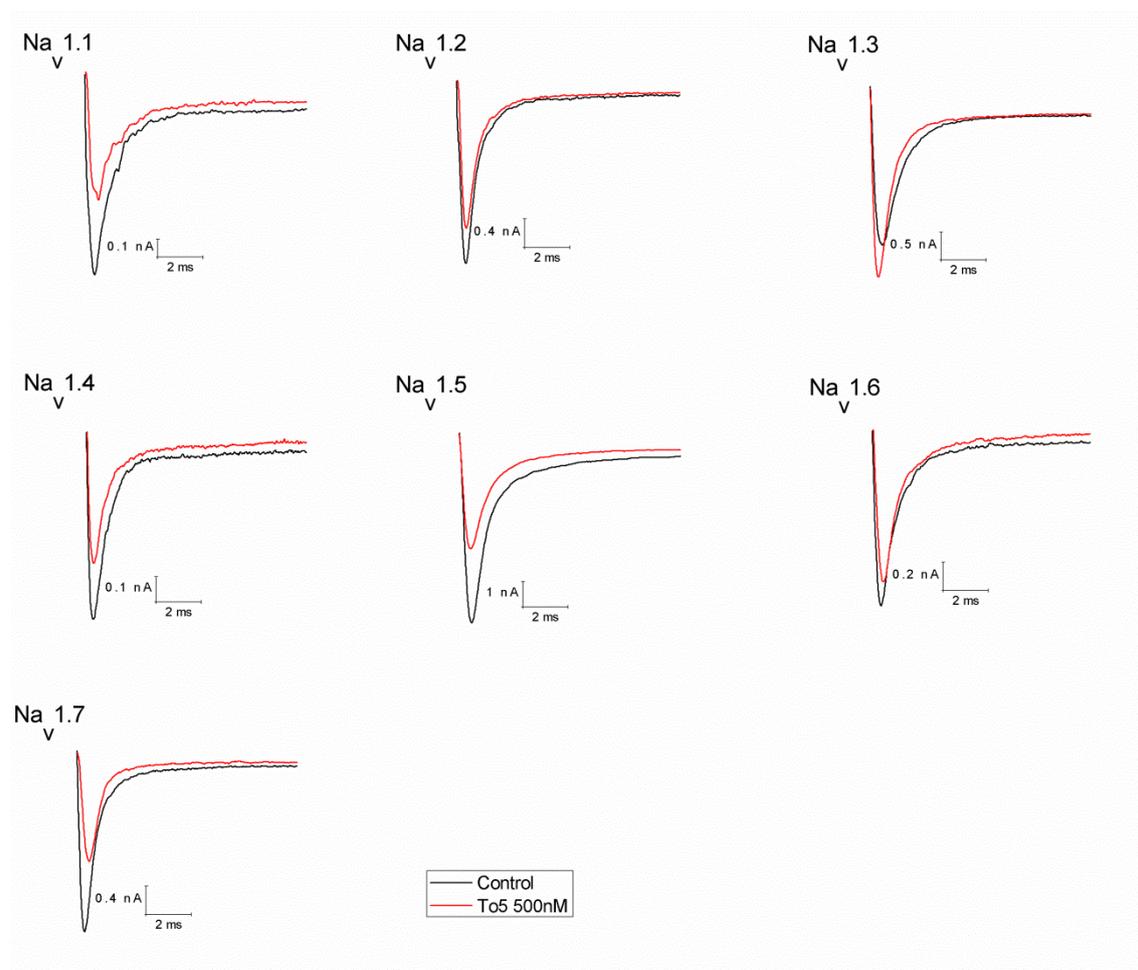


Figura 32. I_{Na} deflagradas com e sem To5. Nesta figura são apresentados registros de correntes dos subtipos de Na_v s com e sem toxina. Em preto, o controle sem toxina e em vermelho, a mesma célula com 500 nM de To5.

Entanto que os canais $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.4$ e $Na_v1.7$ mantiveram um padrão de inibição de I_{Na} quando aplicada a toxina nessa concentração. Curiosamente, oposto ao acontecido com a maioria destes Na_v s testados, as I_{Na} aumentaram após aplicação da toxina sobre os canais $Na_v1.3$ (Fig. 32). Isto pode ser observado com o aumento da condutância ao íon sódio (Fig. 33), mostrando que esta toxina poderia estar agindo de um modo diferente, especificamente

sobre este subtipo de hNa_v . Uma avaliação da inativação rápida destes canais iônicos depois de testar a To5 mostrou que esta toxina não interage com a inativação, pois não houve diferença na constante de tempo de inativação (τ) entre o controle e após adicionar toxina (Fig. 34).

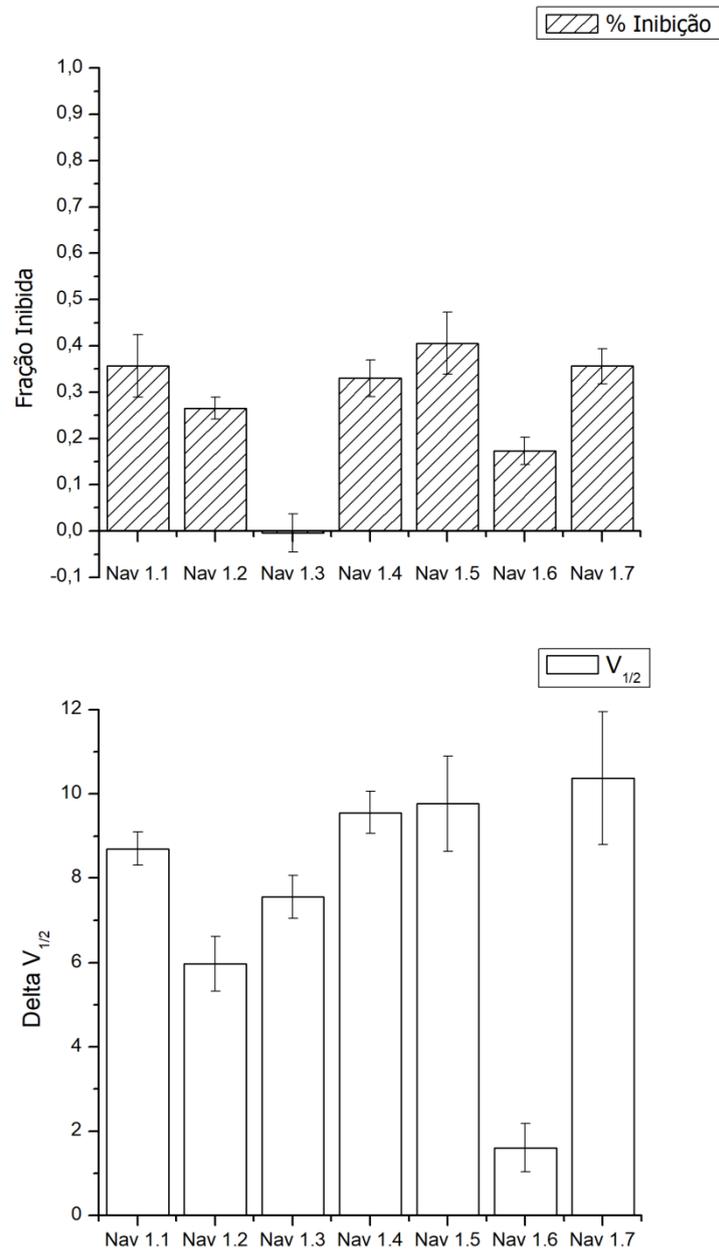


Figura 33. Representação gráfica dos efeitos da To5 sobre os Na_v s testados. Parte superior, gráfico de barras mostrando diminuição de correntes depois de aplicada a toxina. A fração inibida está dada pela diminuição da condutância ao íon sódio. Parte inferior, figura de barras mostrando o deslocamento de voltagem de abertura depois de aplicada a To5 sobre cada subtipo de Na_v . Número de células testadas por Na_v (3-4).

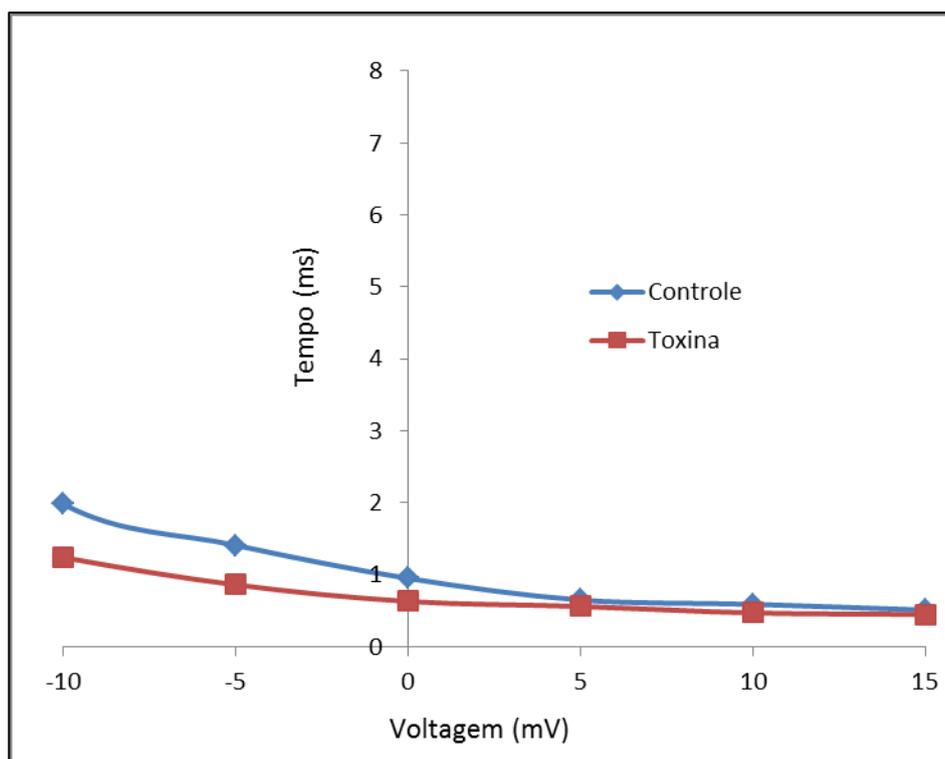


Figura 34. Avaliação da inativação rápida pela constante de tempo nos hNa_v,s . Esta figura representa o efeito da inativação dos hNa_v,s antes e depois de aplicar as toxinas testadas. Nenhum dos testes apresentou lentidão na inativação destes, pois por cada voltagem aplicada o tau (τ) foi localizado em um tempo similar.

5.5.4 *Shift* de voltagem produzido pela To5

Como indicado para a To4, o *shift* de voltagem produzido sobre o canal iônico quando aplicada a toxina, foi também determinado para a To5. Aparentemente, a To5, à concentração estudada (500 nM), mostrou um deslocamento da ativação sobre os subtipos iônicos $Na_v1.1$ e $Na_v1.2$ similar a esses deflagrados pela To4 à mesma concentração (Figs. 29 e 30). No entanto, o *shift* de voltagem foi maior com a To5 sobre o subtipo $Na_v1.4$ do que aquele deflagrado pela To4 à concentração equivalente (Figs. 30 e 33). A To5 foi menos efetiva para deslocar a ativação do subtipo $Na_v1.6$ para voltagens mais negativos. Embora, mostrou o maior efeito de *shift* de voltagem sobre os subtipos $Na_v1.1$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$ e $Na_v1.7$ com valores que variam entre 9.5 e 11 mV (Figs. 33 e 35). Já com o efeito da To5 sobre o $Na_v1.3$ foi demonstrado que evidentemente a toxina age como tipo β , apesar de que o evento de diminuição de correntes próprio deste tipo de toxinas não tenha acontecido. Da mesma maneira que a To4, a To5 mostrou ser promiscua sobre os diferentes subtipos de canais iônicos de humano testados neste trabalho.

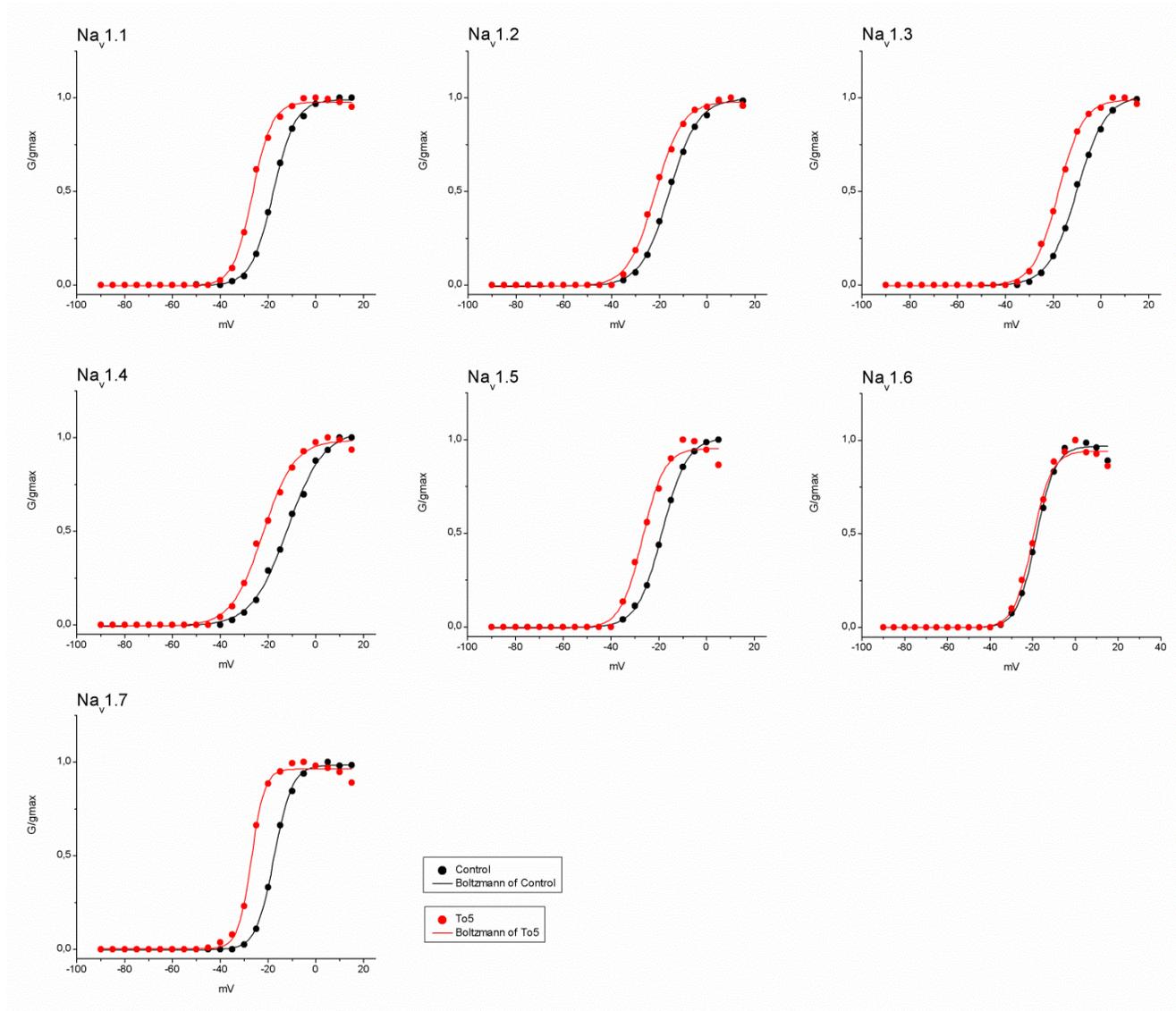


Figura 35. Variação do *shift* de voltagem produzido pela To5 sobre os hNa_vs. O *shift* de voltagem de cada Na_v está indicado pela condutância ao íon sódio. Como observado nesta figura, aparentemente não houve efeito da To5 sobre o subtipo Na_v1.6. No entanto, houve um deslocamento de ativação discreto de aproximadamente 2 mV como mostrado na fig. 36.

5.5.5 Análise de estrutura/atividade de β -toxinas e os hNa_vs

Para relacionar estrutura e atividade das toxinas e seus alvos dois alinhamentos foram construídos. Um alinhamento entre as β -toxinas próximas às toxinas alvo desta pesquisa, já caracterizadas eletrofisiologicamente (Fig. 36), e outro alinhamento mostrando alguns segmentos dos hNa_vs prováveis alvo destas toxinas (Fig. 37). Nestes, são destacados alguns resíduos de aminoácidos chave localizados nos Na_vs já identificados como alvo de algumas β -toxinas. Igualmente, são destacados alguns resíduos de aminoácido próprios destas β -toxinas, os quais são sugeridos neste trabalho como importantes para a interação com seu alvo.

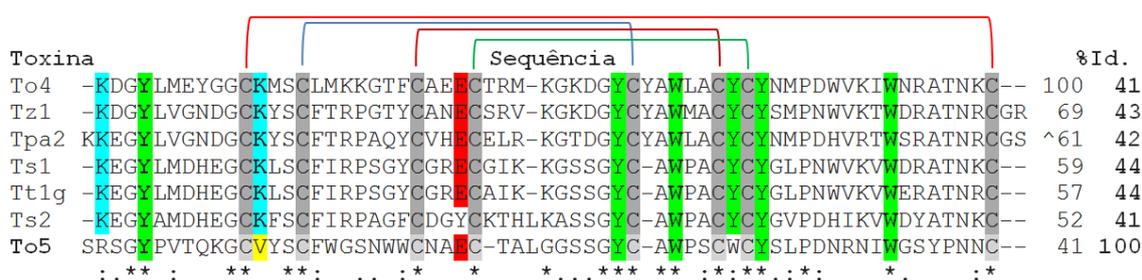


Figura 36. Alinhamento de toxinas similares procedentes de *Tityus* testadas eletrofisiologicamente. As toxinas são das espécies de escorpiões: To4 e To5 (*T. obscurus*), Tz1 (*T. zulianus*), Tpa2 (*T. pachyurus*), Ts1 e Ts2 (*T. serrulatus*) e Tt1g (*T. trivittatus*). Em realce cinza, as Cys sendo estas pareadas como descrito para Ts1 (Pinheiro *et al.*, 2003). Coloridos, os resíduos de aminoácidos que provavelmente estão envolvidos na interação da toxina com seu alvo: Em verde, os resíduos de aminoácido aromáticos, em azul, o básico e em vermelho, o ácido. A Tpa2 não está amidada (^) e a To5 possui uma Valina na posição K13 e um triptofano na posição Y45. Os resíduos de aminoácido idênticos (*), conservativos (:), e semiconservativos (.) aparecem indicados.

O alinhamento das β -toxinas se representa adotando a estrutura terciária ligando as Cys, segundo a estrutura cristalográfica já determinada para a Ts1 (Pinheiro *et al.*, 2003). Todas elas compartilham a distribuição destas Cys e, com exceção da To5, a maioria compartilha os resíduos de aminoácidos considerados chave para sua interação com seus alvos. Estão estes resíduos chaves em realce colorido.

No alinhamento dos *loops* dos Na_vs envolvidos com a interação das β -toxinas já determinados, são identificados os resíduos chave em realce colorido (Fig. 37). Pelo alinhamento, existem resíduos compartilhados entre esses *loops* que

foram alvo das β -toxinas CssIV e Tz1. Importantemente, no loop DII S3-S4 já são identificados três resíduos de aminoácidos alvo das β -toxinas.

Subtipo Na_v	Loop DII S1-S2	Loop DII S3-S4	Loop DIII SS2	
$Na_v1.1$	AMEHYPMTEHFNNHV	LSLVELGLANVEGLSVLRSFR	AAVDSRNVELQPKYEESLY	Revisado
$Na_v1.2$	AMEHYPMTEQFSSV ⁷⁹⁰	LSLMELGLANVEGLSVLRSFR ⁸⁵³	AAVDSRNVELQPKYEDNLY ¹⁴⁴⁸	Pedraza & Possani, 2013
$Na_v1.2$	AMEHYPMTEQFSSV ⁷⁹⁰	LSLMELGLANVEGLSVLRSFR ⁸⁵³	AAVDSRNVELQPKYEDNLY ¹⁴⁴⁸	CssIV
$Na_v1.3$	AMEHYPMTEQFSSV	LSLMELGLANVEGLSVLRSFR	AAVDSRDVKLQPIYEENLY	
$Na_v1.4$	AMEHYPMTEHFDNV ⁶⁰³	LSLVELGLANVQGLSVLRSFR ⁶⁶⁶	AAVDSREKEEQPHYEVNLY ¹²⁶³	Tz1
$Na_v1.5$	ALEHYNMTEFEFEM	LSLMELGLSRMSNLSVLRSFR ⁸¹¹	AAVDSRGYEEQPQWEYNLY	
$Na_v1.6$	AMEHHPMTPQFEHV	LSLMELSLADVEGLSVLRSFR ⁸⁴⁵	AAVDSRKPDEQPDYEGNIY	
$Na_v1.7$	AMEHHPMTEEFKNV	LSLVELFLADVEGLSVLRSFR ⁸²⁷	AAVDSVNVDKQPKYEYSLY	
	*:***: ** .*. :	***:** *: :..*****	***** . ** :* .:*	

Figura 37. Alinhamento dos segmentos dos Na_v s prováveis alvo de β -toxinas. Neste alinhamento se identificam em realce amarelo resíduos de aminoácidos alvo das toxinas CssIV e Tz1. Em realce verde, outros resíduos alvo destas toxinas e cujas substituições diminuem a afinidade destas pelos Na_v s.

5.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA To5

Na tentativa de conseguir a melhor estratégia de produção recombinante foram feitos vários testes. As condições que foram modificadas em todas as linhagens são concentração de inóculo a usar e diferentes densidades óticas para indução (OD_{600} 1,0 1,5 e 2,0). Outras condições foram testadas de forma combinada: concentrações de IPTG (1,0, 0,5, 0,1 e 0 mM), o uso ou não de glicose como agente restritor de expressão basal antes da indução, variadas temperaturas de produção (entre 16 - 30 e 37°C) e tempos de produção (até 40 horas). Para determinar se houve expressão do material de interesse e no seu estado estruturado, as amostras foram visualmente avaliadas por meio de géis de poliácridamida e as massas moleculares foram determinadas como indicado na metodologia (Tabela III).

Tabela III. Massas moleculares da To5 nativa e recombinantes.

Componente	Massa molecular (m/z)						
	Teórica		Experimental				
	Oxidada	Reduzida	Peçonha	BL21 (DE3)	Rosetta (DE3)PlysS	SHuffle®T7 (NEB)	Origami (DE3)
Proteína fusão	20,811.3	20,821.3	-	20.818,7	20.819,3	-	-
Tiorredoxina	12826.58	12828.58	-	12.828,54	12.830,0	-	12.828,70
*To5His	8.002,8	8.010,8	-	-	8.009,51	-	8.004,36
To5 nativa	6937.69	6945.69	6.937,35	-	-	-	-

*O aumento da massa molecular média na To5 recombinante é devido à adição de dois resíduos de aminoácido e seis histidinas no extremo C-terminal.

5.6.1. *E. coli* BL21(DE3)

Assim que foi construído o vetor de expressão da To5 com cauda de histidinas, esta toxina foi expressa em bactéria *E. coli* BL 21. A primeira tentativa de expressão foi feita usando 5 L meio de cultura *terrific broth* TB. Desta foram obtidos 104,12 g de biomassa celular da qual foi obtida a proteína de fusão (Tioredoxina-Toxina To5) com aproximadamente 21 kDa como indicado no gel de poliacrilamida nas diferentes etapas de extração (Fig. 38). Seguido este passo de purificação por afinidade, a amostra foi submetida a mais um passo de cromatografia por RP-HPLC seguindo um gradiente linear de 30-35 %B em 35 min a um fluxo de 1 mL/min (Fig. 39). Para cada uma das frações de extração da amostra foram feitas suficientes corridas cromatográficas até finalizar o volume da amostra. A proteína de fusão eluiu a 53,2 %B e sua massa molecular foi de 20.818,7 Da, identificada por *electrospray* (Fig. 40). Esta massa molecular caracterizada das frações cromatográficas indicaria a presença da proteína fusão, já que sua massa teórica reduzida seria de 20,821.3 Da.

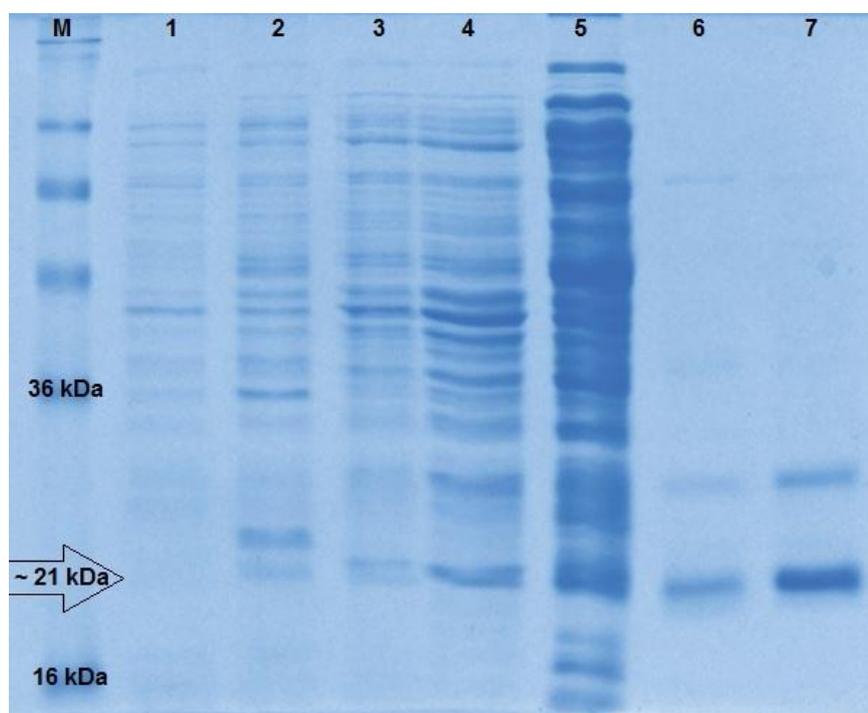


Figura 38. Gel de poliacrilamida mostrando os passos de extração da proteína de fusão heteróloga. **M**, marcador de peso molecular *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard* (Life Technologies). **1**, crescimento celular sem induzir (OD₆₀₀ 1.0). **2**, células após indução com IPTG 1 mM durante 12 horas a 100 rpm e 30°C. **3**, Primeira extração com tampão de extração periplásmica

PPB. **4**, segunda extração com água. **5**, fração obtida após fragmentação por ultrassom. **6**, eluato da coluna Ni-NTA da fração com água. **7**, eluato da coluna Ni-NTA da fração de ultrassom.

Após purificação, usando a lei de Beer-Lambert ($Abs_{280}/\text{Coeficiente de extinção molar}$) a quantificação total da proteína de fusão resultou em 785 μg que foram digeridos com enteroquinase seguindo as especificações do fabricante *New England Biolabs*. Após digestão com enteroquinase, esta amostra foi purificada por HPLC novamente e as massas moleculares de seus componentes foram determinados por electrospray (Fig. 39D). Como indicado anteriormente, houve significativa produção de biomassa (crescimento celular). Apesar disso, a produção da proteína recombinante (Tioredoxina-To5-His) não foi significativa para continuar o processo. Como pode ser observado na figura 39D, a digestão gerou o que seria a Tioredoxina, com 12.828,54 Da de massa molecular, mais um componente de massa molecular menor de 2.233 Da, que não corresponde à toxina To5 dado que sua massa molecular média teórica é de 8.010,8 Da, sem oxidar. Para solucionar a pouca produtividade da To5 recombinante, novos testes preliminares de expressão foram feitos combinando as estratégias de produção. No entanto, nenhuma das estratégias melhorou significativamente a produção desta proteína fusão.

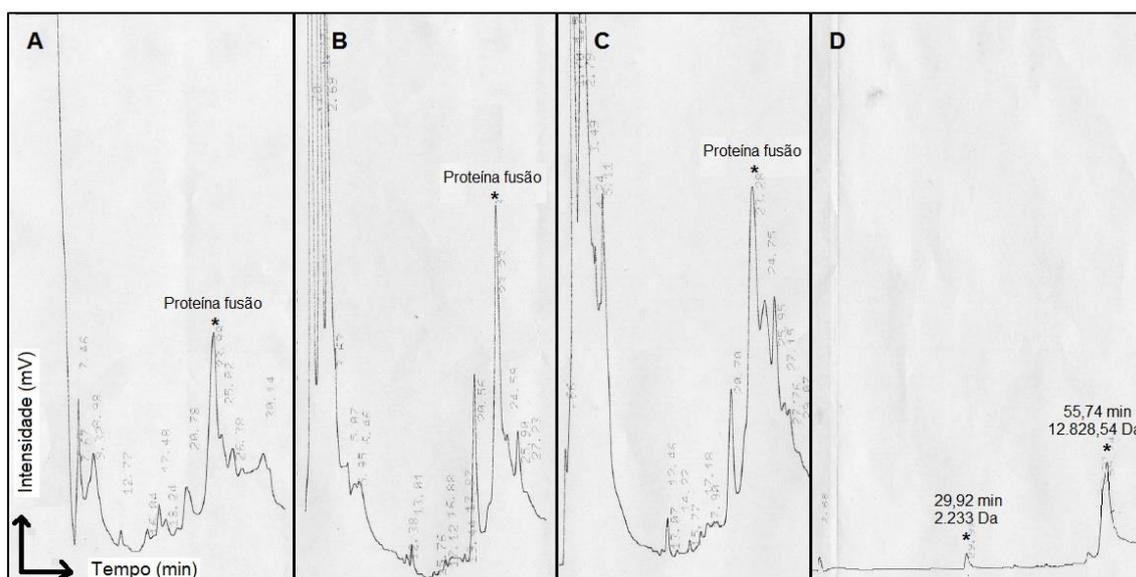


Figura 39. Gel de poliacrilamida mostrando os passos de extração da proteína de fusão heteróloga. **A**, **B** e **C** são as purificações da proteína de fusão eluídas com Ni-NTA, das frações de água, ppb e ultrassom, respectivamente. **D**, Purificação da proteína de fusão após digestão com enteroquinase. Os dois

picos indicados com tempo de retenção e massa molecular determinada por *electrospray*.

Fazendo uso da última tentativa de expressão nesta linhagem bacteriana (300 µg de proteína fusão/L de cultura) e analisando o acontecido com a primeira tentativa foi concluído que: (1) O gene alvo poderia estar sendo tóxico para a bactéria dado que esta não conseguiu aumentar significativamente a produção de proteína solúvel. (2) Esta linhagem bacteriana não estava oxidando a proteína fusão. Mesmo que foram feitas extrações separadas (citoplasma e periplasma) da proteína alvo, dita proteína mostrou massa molecular média perto da massa molecular teórica no estado reduzido. Para confirmar estas informações, na figura 39D se observa a massa molecular da Tioredoxina medida por ESI. Esta massa molecular é muito parecida com a massa molecular no estado reduzido da molécula com uma diferença de 0,04 Da. (3) Dado que a digestão da To5 fusão com enteroquinase resultou em dois característicos componentes de 12.828 (tioredoxina) e 2.233 Da sem achar a massa molecular da To5 recombinante, foi concluído que a enzima estava clivando inespecificamente a toxina alvo. Este evento é conferido quando se calcula a massa molecular do fragmento C-terminal (NIWGSYPNNCLEHHHHH) da toxina. Este fragmento tem uma massa molecular teórica que bate com a experimental obtida.

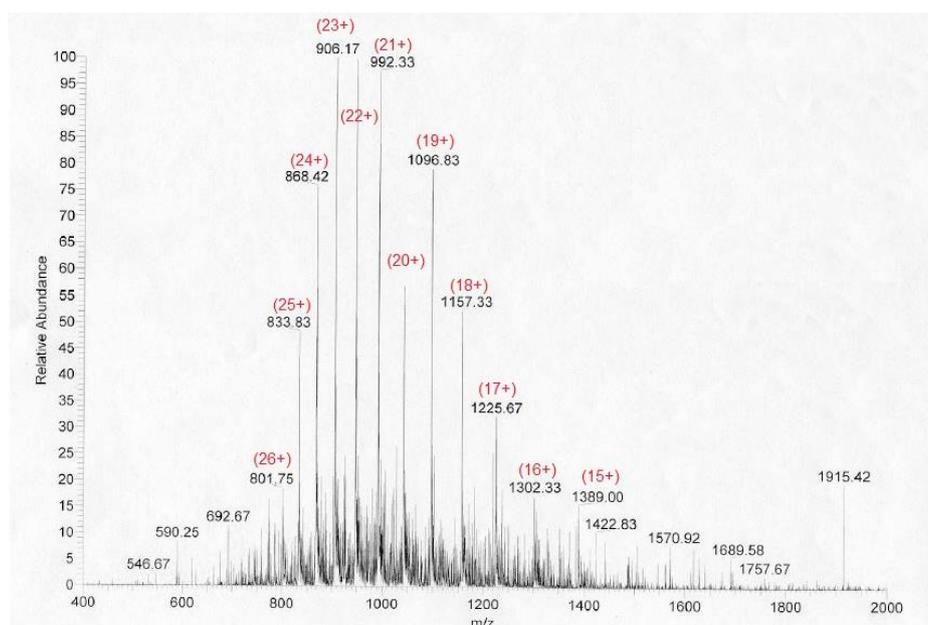


Figura 40. Massa molecular da proteína de fusão expressa. Apresentando a massa molecular ionizada em múltipla carga (em vermelho) de 20.818,7 Da.

5.6.2 Rosetta (DE3)pLysS

Uma alternativa à linhagem BL21 inicialmente escolhida, foi a Rosetta (DE3)pLysS. Mesmo que o desenho do gene alvo tem sido preparado para uso de códons raros em *E. coli*, esta linhagem foi selecionada porque ela tem o plasmídeo de restrição pLysS que favorece a produção de genes potencialmente tóxicos. Ainda com a esperança de obter a proteína fusão em grandes quantidades e em seu estado oxidado, foram feitos todos os testes possíveis combinando as opções de produção como descrito no início. Um teste usando 1 L de meio de cultura foi feito usando as condições ótimas de produção heteróloga.

Um pré-inoculo de Rosetta (DE3)pLysS transformada com o gene alvo foi crescido durante a noite (meio LB adicionado de 150 e 34,4 µg/mL de AMP e cloranfenicol, respectivamente). 10% deste pré-inoculo foi adicionado a 1L de meio LB (adicionado de 0,1% glicose, 100 e 34,4 µg/mL de AMP e cloranfenicol, respectivamente), crescido por 2,5 horas (OD₆₀₀ 1,8) a 37°C e 100 rpm em incubadora. A indução foi com IPTG 0,4 mM com 75 rpm a 26°C durante 14 horas. A solução de extração da To5 fusão foi o tampão de uso para enteroquinase (Tris-base 25 mM, pH 8 ajustado com HCl).

A produção de recombinante nesta linhagem foi de 600 µg/L de cultura aproximadamente. O produto desta expressão não foi extraído da bactéria usando o tampão PPB e água porque uma proteína endógena estava sendo competitiva na hora da expressão (Fig. 41). Dita proteína estava competindo ainda com a proteína alvo pela interação com a coluna de afinidade Ni-IDA e estava eluindo no mesmo tempo de retenção na cromatografia em fase reversa RP-HPLC. Para resolver, foi usado o tampão da enteroquinase com a expectativa de digerir a proteína logo na solução de extração. A proteína alvo foi digerida como se mostra na banda do gel SDS PAGE (Fig. 41A). Prevendo que a To5 fusão esteja sendo digerida inespecificamente pela enteroquinase, primeiro foi feito um teste enzimático usando diferentes concentrações da enzima em dois tempos (10 e 16 horas) de incubação a 22°C. Assim, poderia ser usada a concentração e tempos específicos da enzima com o intuito de diminuir a clivagem inespecífica.

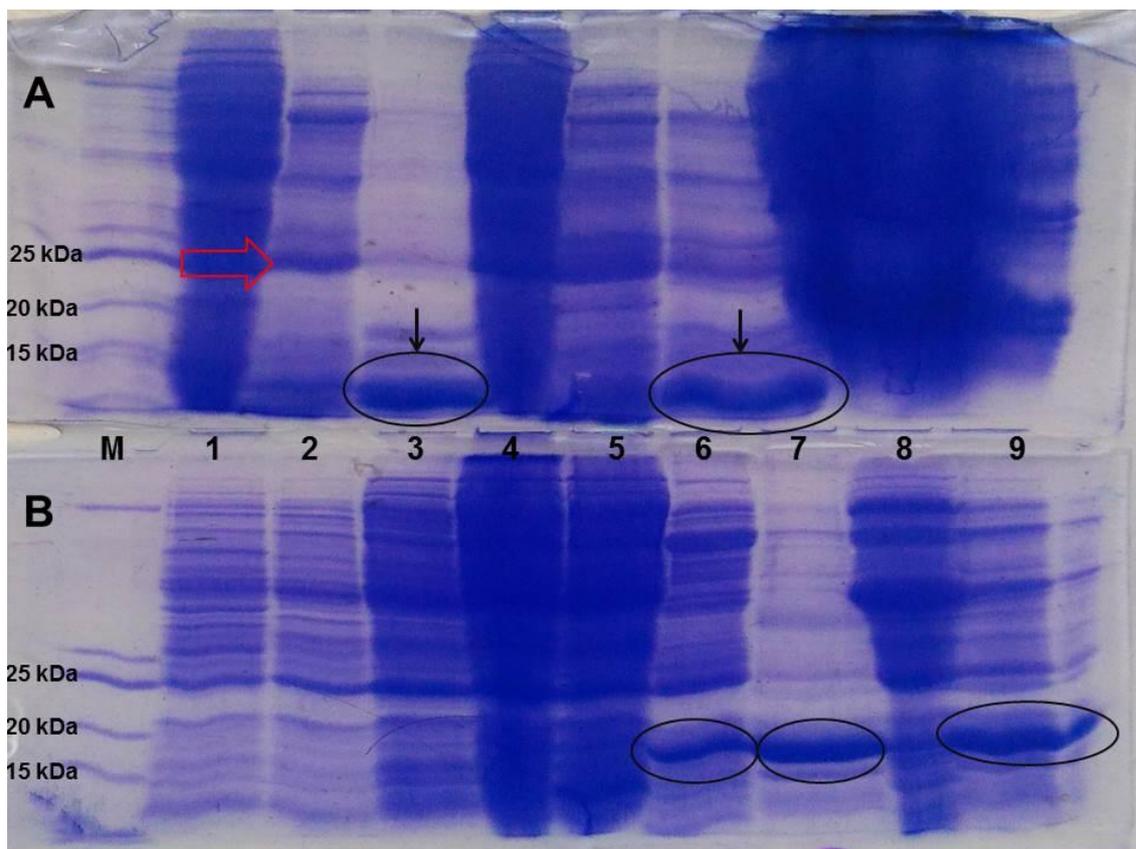


Figura 41. To5 fusão produzida em Rosetta (DE3). Teste de produção da toxina recombinante produzida e digerida com enteroquinase em gel SDS 12% glicina. **A**, poços 3 e 6 com a To5 produzida no periplasma e citoplasma, respectivamente digeridos com enteroquinase. **B**, passos da produção da To5: **M**, marcador 3,4-100 kDa Thermo, **1**. Rosetta sem plasmídeo, **2**. Rosetta com plasmídeo sem induzir, **3**. Rosetta com plasmídeo induzido, **4**. Pellet pós-Ni-IDA, **5**. Extrato periplasmático pós-Ni-IDA, **6**. Extrato periplasmático lavado, **7**. Extrato periplasmático eluato, **8**. Pellet lavado, **9**. Pellet eluato. Em círculo a toxina recombinante e na seta vermelha uma proteína endógena competitiva nas cromatografias com a toxina alvo.

A proteína fusão (~30 µg) foi completamente digerida com 0,1 µL de enzima (EK da NEB) passando 10 horas de incubação (Fig. 42). Após digestão total da amostra foi evidenciado por espectrometria de massa que a proteína estava sendo produzida no seu estado reduzido tanto no periplasma, quanto no citoplasma. Da quantidade total separada por HPLC apenas foi possível achar a massa molecular da To5 recombinante no estado reduzido. Igualmente, foi achada a massa molecular da tiorredoxina. Embora, a To5 recombinante foi clivada inespecificamente como aconteceu no processo feito com a linhagem BL21. A massa molecular do fragmento C-terminal (2.233 Da) foi detectada

com bom sinal de intensidade no espectro e eluindo no mesmo tempo de retenção que nas purificações feitas com BL21.

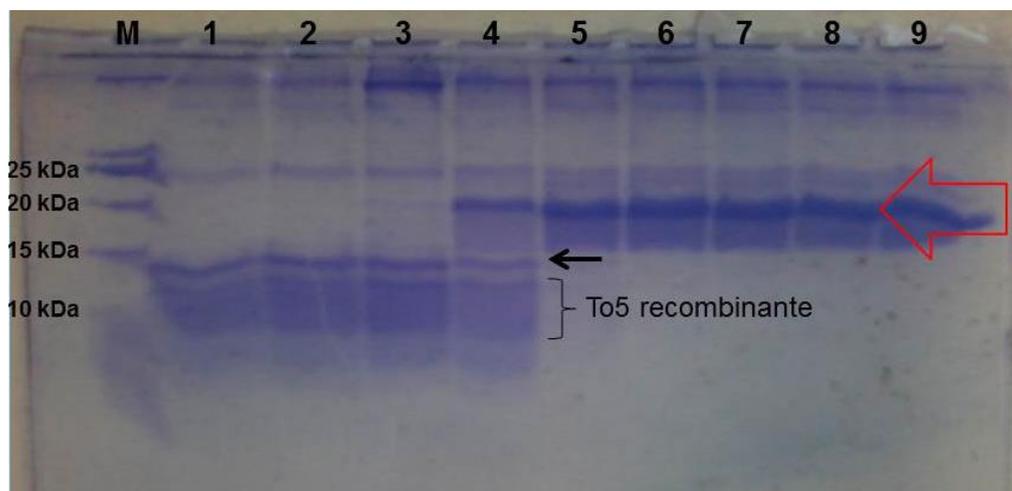


Figura 42. Cinética enzimática da enteroquinase sobre a To5 fusão. Teste feito com gel SDS 18% tris-tricina e corado com azul de coomassie coloidal. A enzima foi avaliada usando concentrações diferentes sobre uma quantidade fixa de To5 fusão: **M.** marcador 3,4-100 kDa Thermo, **1.** 2 μ L de Enzima, **2.** 1 μ L de Enzima, **3.** 0,1 μ L de Enzima, **4.** 0,01 μ L de Enzima, **5.** 0,001 μ L de Enzima, **6.** 0,0001 μ L de Enzima, **7.** 0,00001 μ L de Enzima, **8.** 0,000001 μ L de Enzima, **9.** 0,0000001 μ L de Enzima. Seta vermelha indica a proteína fusão. A seta preta indica a tioredoxina após digestão.

5.6.3 SHuffle®T7(NEB)

Conhecendo que, definitivamente, as duas primeiras linhagens não estavam oxidando a molécula, foi optado por testar novas linhagens que favoreceriam a oxidação da proteína recombinante alvo. A SHuffle®T7 da NEB tem vantagens como garantir um citoplasma oxidante e produção da isomerase DsbC que favorecem, em teoria, a apropriada estruturação da proteína recombinante alvo e produção de genes potencialmente tóxicos às bactérias. Após fazer transformação, estas células cresceram muito bem durante todo o processo de fase inicial de crescimento e indução. Embora nas primeiras tentativas de produção (como indicado inicialmente) esta linhagem não mostrou produção de proteína recombinante aparente. Nos géis não se aprecia mudança de expressão (Fig. 43). Por tanto, esta linhagem foi omitida para continuar testando a produção da To5 fusão e também não foi testada a maior volume de meio de cultura.

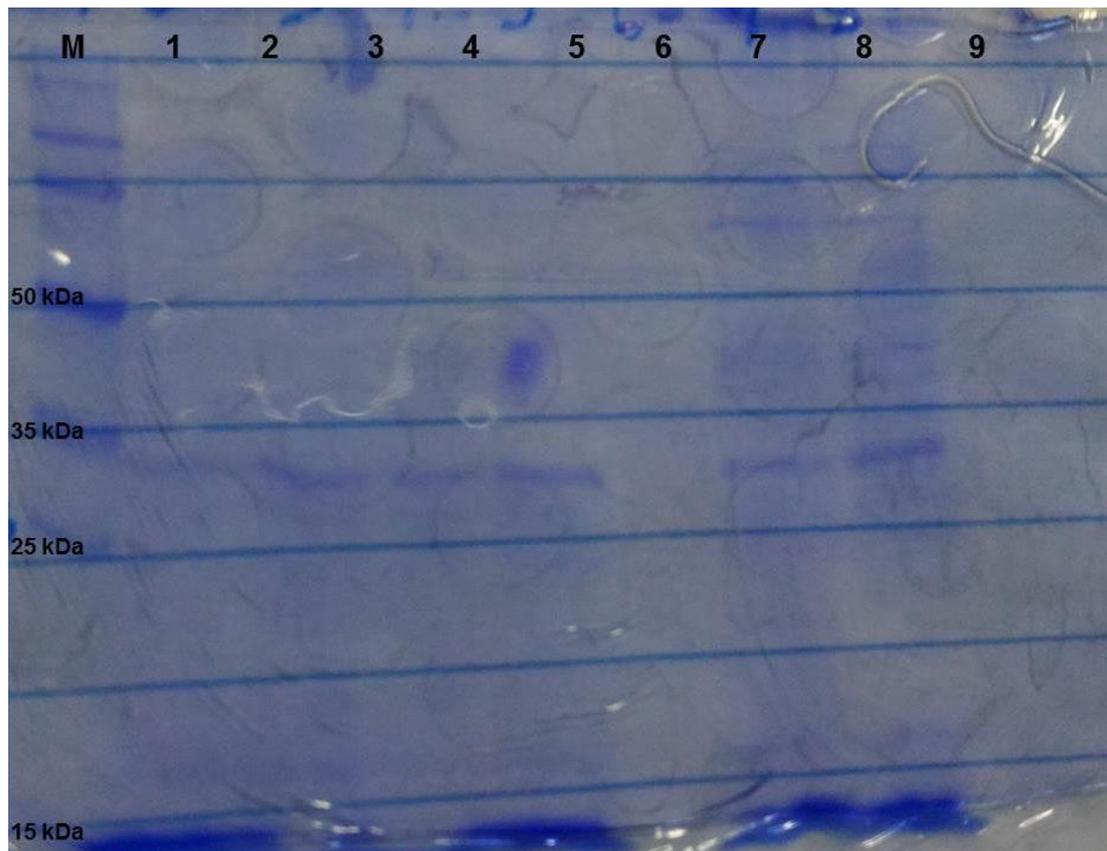


Figura 43. Tentativa de produção da To5 fusão em SHuffle®T7. Gel de SDS 12% glicina mostrando cinética de produção da recombinante ao longo do tempo: **M.** marcador 10-225 kDa Affymetrix, **1.** Após 1 hora de indução, **2.** Após 2 horas de indução, **3.** Após 3 horas de indução, **4.** Após 4 horas de indução, **5.** Após 5 horas de indução, **6.** Após 12 horas de indução, **7.** Após 16 horas de indução, **8.** Após 24 horas de indução, **9.** Controle sem induzir. Notar que nenhuma banda aparece entre os marcadores 15 e 25 kDa onde se espera esteja a To5His fusão.

5.6.4 Origami (DE3)

A seleção desta linhagem ainda é por conta das condições oxidantes que oferece o citoplasma para facilitar a estruturação da To5 fusão. Em princípio, esta linhagem celular é difícil crescer após transformação. A eficiência de transformação foi pouca e só cresceram células após 48 horas de incubação a 37°C. Com esta linhagem foram testadas todas as condições especificadas no início, procurando achar a melhor produção de toxina fusão recombinante. A linhagem Origami (DE3) produz toxina, mas em poucas quantidades. A última condição testada foi: um pré-inoculo de Origami (DE3) transformada com o gene alvo foi crescido durante a noite (meio LB adicionado de 150, 12,5 e 7,5

µg/mL, de AMP, tetraciclina e kanamicina, respectivamente). 10% deste pré-inoculo foi adicionado a 1L de meio LB (adicionado de 0,1% glicose, 100 12,5 e 7,5 µg/mL, de AMP, tetraciclina e kanamicina, respectivamente), crescido por 3 horas (OD₆₀₀ 2,0) a 37°C e 100 rpm em incubadora. A indução foi com IPTG 0,5 mM a 75 rpm a 26°C durante 30 horas. A solução de extração da To5 fusão foi o tampão de uso para enteroquinase (Tris-base 25 mM, pH 8 ajustado com HCl). A proteína recombinante alvo não foi produzida em quantidade relevante. Embora, foi quantidade suficiente para fazer digestão com enteroquinase (Fig. 44), purificação por HPLC (Fig. 45) e análise por espectrometria de massa (Fig. 46). Com estes processos foi observado que a To5 fusão estava sendo transportada para o periplasma e, provavelmente, estava sendo oxidada.

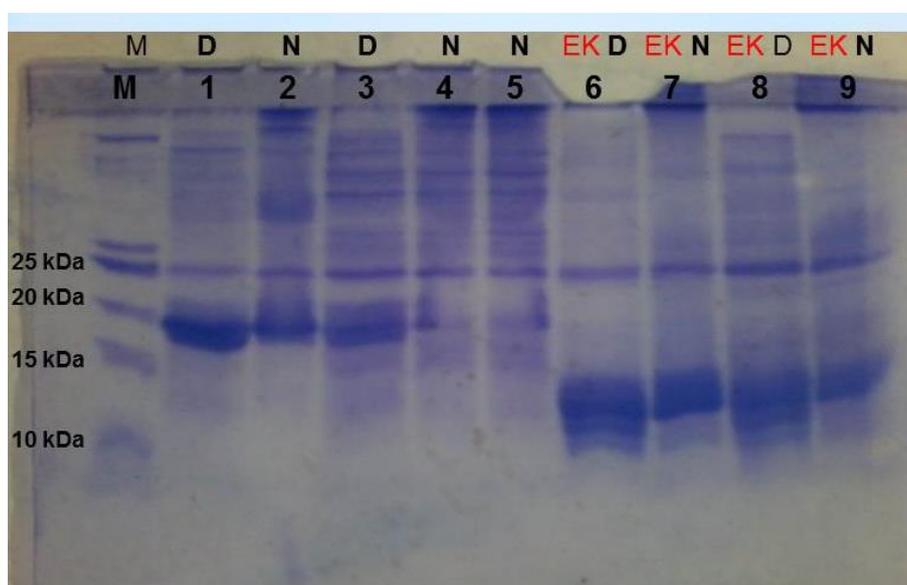


Figura 44. Teste enzimático com enteroquinase sobre a To5 fusão produzida em Origami. Neste teste é usado como controle o produto da Rosetta (DE3)pLysS. Gel SDS PAGE 15% glicina corado com azul de coomassie coloidal. **M**, marcador 3,4-100 kDa Thermo, **1**, Eluato Rosetta Desnaturado, **2**, Eluato Rosetta Nativo, **3**, Eluato Origami Desnaturado, **4**, Eluato Origami Nativo, **5**, Eluato Origami Pellet Nativo, **6**, Poço 1 digerido com enteroquinase, **7**, Poço 2 digerido com enteroquinase, **8**, Poço 3 digerido com enteroquinase, **9**, Poço 4 digerido com enteroquinase. **N**, condições nativas. **D**, condições desnaturantes e **EK**, enteroquinase.

No entanto, foram achadas massas moleculares que batem com o fragmento da To5His digerida inespecificamente (como explicado no processo com a linhagem BL21). A fração de maior intensidade mostrada na cromatografia (Fig. 45) tinha entre outros componentes, massas moleculares correspondentes ao

fragmento C-terminal encontrado nas outras linhagens testadas. Isso indica que nem toda a população de To5His fusão está sendo completamente oxidada. Portanto, apesar de ter as “condições oxidantes” desta linhagem, este processo de pós-tradução não está sendo completamente finalizado. Futuros testes mudando a cinética de produção da recombinante com variação de temperatura e tempo poderia melhorar, pelo menos, este processo pós-tradução. Assim, aumentar a quantidade de To5His oxidada frente ao seu estado reduzido. A massa molecular média tanto da To5 recombinante quanto da tiorredoxina foram achadas, sendo que a massa molecular média da toxina alvo foi semelhante com a massa molecular do estado oxidado desta com diferença apenas de 1,5 Da entre massas moleculares médias teórica e experimental. Este resultado indica que provavelmente esta linhagem bacteriana está oxidando a toxina.

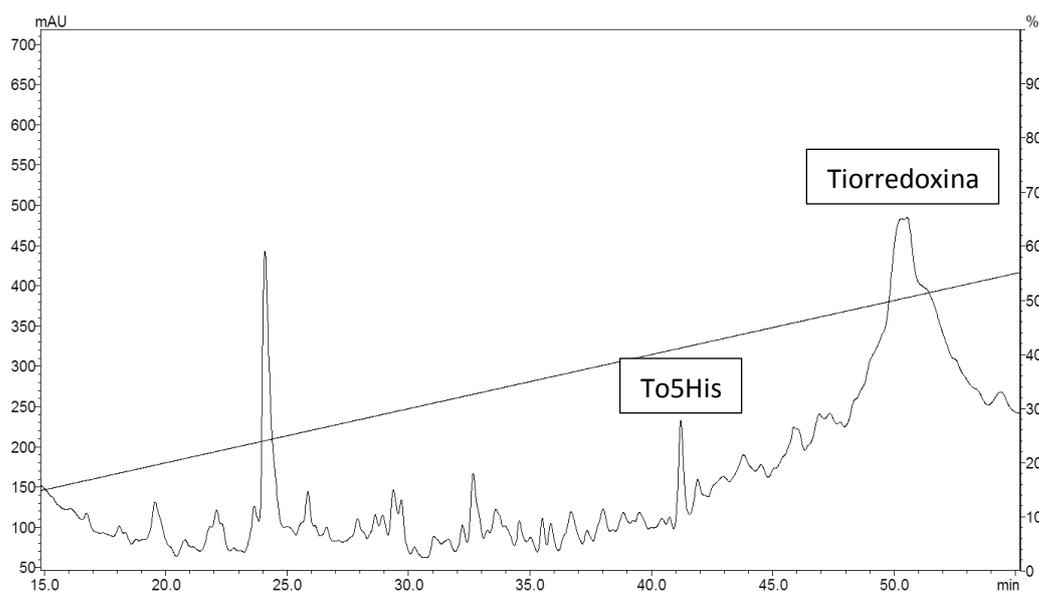


Figura 45. Cromatografia da To5His fusão após digestão com enteroquinase. Esta cromatografia mostra o eluato passado por Ni-IDA da extração bruta da proteína fusão expressa em Origami (DE3). Neste são apresentadas as frações onde eluem a tiorredoxina e a proteína fusão caracterizadas por espectrometria de massa MALDI indicado na seguinte figura. A fração inicial (24 min), de maior tamanho contém entre outras, a massa molecular correspondente ao fragmento de corte inespecífico pela enteroquinase.

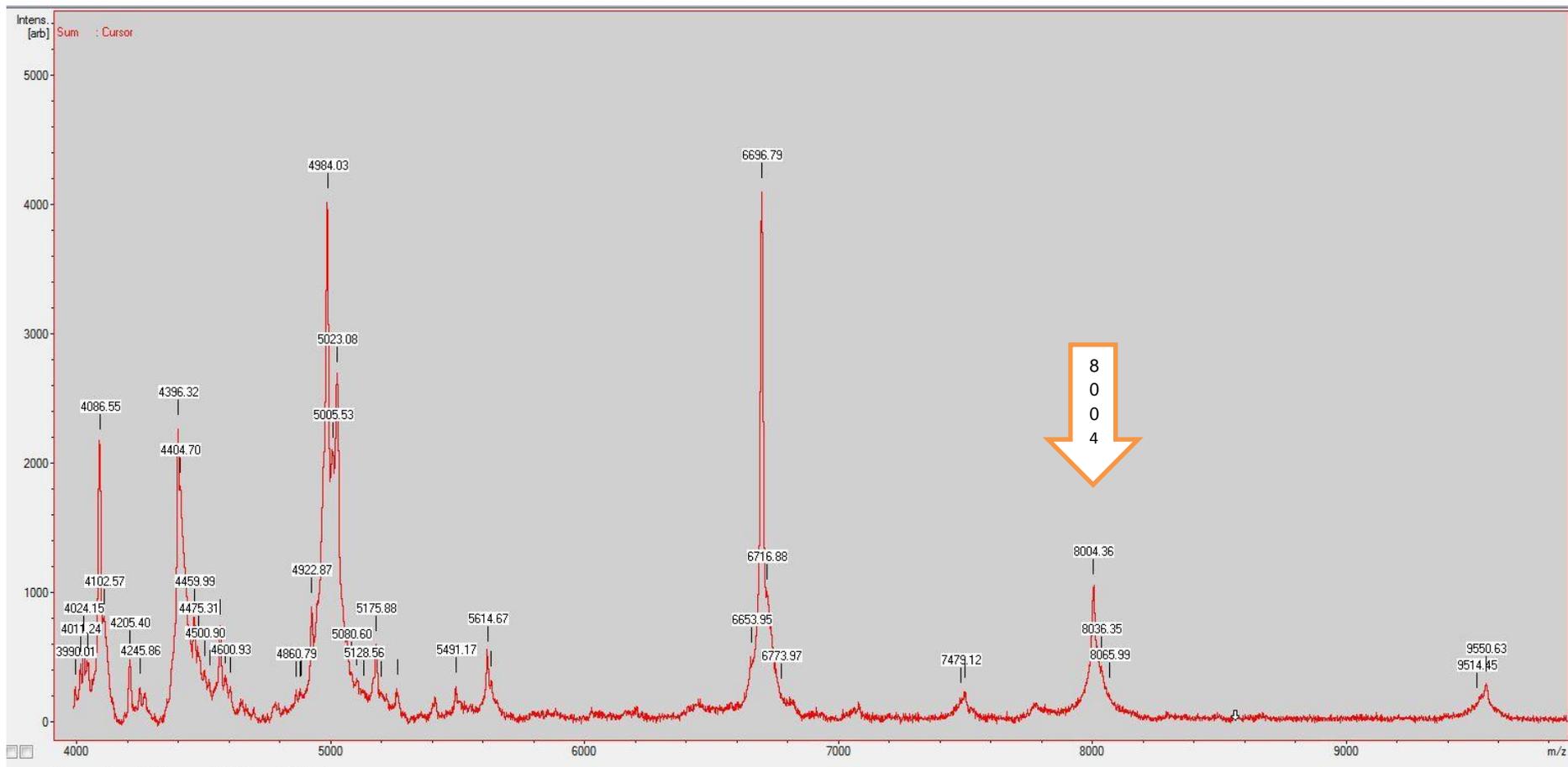


Figura 46. Espectro de massa molecular da fração cromatográfica To5His. A massa molecular média da To5His medida por MALDI está indicada. Neste espectro se destaca que a fração cromatográfica está contaminada com outros componentes e que a massa molecular correspondente à toxina heteróloga alvo não é o íon mais abundante.

6. DISCUSSÃO

6.1 To4 e To5 NATIVAS

As toxinas To4 e To5 foram parcialmente caracterizadas da peçonha do escorpião *T. obscurus* (Batista *et al.*, 2002b; 2004) e suas sequências de aminoácidos completas produto da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha foram determinadas (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Uma análise teórica das massas moleculares destas toxinas comparadas com as achadas experimentalmente indicaram que a toxina To4 com 7.253,2 Da está amidada no seu extremo C-terminal, enquanto que a To5 estaria aparentemente amidada e teria uma massa molecular de 6.937,1 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012).

Destas toxinas, a To4 já tinha mostrado ser tóxica quando aplicada em camundongo (Batista *et al.*, 2002b) enquanto que sobre a To5 ainda se desconhece suas atividades biológicas (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Adicionalmente, por semelhança com outras toxinas de escorpiões, esta toxina poderia ser promíscua agindo sobre canais iônicos para sódio de diversos grupos taxonômicos (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). As toxinas com as que a To5 compartilha identidade e que foram testadas biologicamente são a ardiscretina e as bactridinas. A ardiscretina mostrou ser tóxica em artrópodes e axônio de lula, mas não ativa sobre camundongo (D'Suze *et al.*, 2004); enquanto que as bactridinas, mostraram ser antimicrobianas e tóxicas para caranguejos e baratas, igualmente sem atividade sobre camundongo (Díaz *et al.*, 2009).

Neste trabalho, uma análise feita da massa molecular acurada por modo refletivo positivo mostrou que a To4 possui 7.249,44 Da que quando comparada com a massa molecular teórica, apresenta um erro de 41 ppm. Uma sequência parcial por *in source decay* ISD comprovando fidelidade da toxina purificada com seu precursor teórico também foi feita. Como se observa, esta massa molecular acurada diverge das massas moleculares médias experimentais achadas anteriormente 7.259 Da (Batista *et al.*, 2002b) e 7.253,2 Da (Batista *et al.*, 2004; Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). No entanto, a diferença

desta massa molecular experimental acurada com a teórica confirmou que evidentemente a To4 está amidada dado que houve uma diferença de 1,2 Da.

Já, a To5 neste trabalho mostrou uma massa molecular média de 6.937,35 Da que confere com a massa molecular antes reportada (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). As sequências parciais feitas por ISD e degradação de Edman da To5 nativa mostraram fidelidade com a toxina putativa como predito (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), e evidentemente, a diferença de 1,26 Da determinada por massa molecular acurada mostrou que esta toxina está amidada no C-terminal.

Duas toxinas, a To4 e a To5 como teoricamente predito (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) mostraram ser β -toxinas quando testadas sobre os subtipos de canais iônicos de humano Na_v 1.1-1.7. Isto é, deslocando a ativação por voltagem dos canais iônicos testados para estados mais negativos (Pedraza & Possani, 2013). Uma comparação destas duas toxinas e suas homólogas semelhantes (Fig. 36), já testadas sobre canais iônicos para sódio, mostraram características estruturais que permitiriam deduzir alguns eventos concernentes à interação entre toxina e canal iônico.

Começando pelas atividades biológicas reportadas previamente, a Tz1 (1 μ M), ainda não testada sobre todos os subtipos de Na_v s, mostrou atividade de tipo β -toxina quando testada sobre Na_v 1.4 e Na_v 1.5, com marcada preferência sobre o último subtipo (Borges *et al.*, 2004). A Ts1 significativamente deslocou a ativação de voltagem para a esquerda dos subtipos Na_v 1.3, Na_v 1.4 e Na_v 1.6 com diminuição das correntes apenas sobre o subtipo Na_v 1.5 (Peigneur *et al.*, 2015), e a Tt1g mostrando alteração da ativação dependente de voltagem sobre os subtipos hNa_v 1.2 e hNa_v 1.3, diminuiu as correntes dos subtipos hNa_v 1.4 e hNa_v 1.5 mas sem afetar os subtipos hNa_v 1.1 e hNa_v 1.6 (Coronas *et al.*, 2014). A Ts2 testada sobre os subtipos de mamífero Na_v 1.2 até Na_v 1.8 mostrou tipicamente um efeito de α -toxina, sendo tipo β -toxina apenas sobre o subtipo Na_v 1.3 (Cologna *et al.*, 2012).

No entanto, as toxinas objeto desta pesquisa mostraram ser biologicamente ativas sobre todos os subtipos de hNa_v s testados. Com exceção do efeito de I_{Na} produzido da To5 sobre o subtipo Na_v 1.3, as toxinas To4 e To5 deslocaram o início de ativação para voltagens mais negativos, além de diminuir as I_{Na}

evocadas. Duas categorias de toxinas escorpiônicas que agem sobre os canais iônicos para sódio são bem caracterizadas como α - e β -toxinas agindo na inativação e ativações destes, respectivamente (Jover *et al.*, 1980). Apesar de esta classificação estar sendo revisada devido ao crescente número de toxinas que agem de ambas as maneiras (Peigneur *et al.*, 2015), a To4 estritamente mostrou um efeito tipo β -toxina. No entanto, a To5 aumentando as I_{Na} sobre o subtipo $Na_v1.3$ sai do padrão de diminuição de correntes de sódio das β -toxinas e mostra que esta toxina estaria envolvendo mecanismos moleculares bem diferentes, ainda mais diferente do que quando comparamos as atividades provocadas pela To4 e as outras toxinas homólogas com seus Na_v s alvo.

As β -toxinas subdivididas em quatro subclasses têm apresentado atividade sobre Na_v s próprios de mamífero, inseto ou ambos (Pedraza & Possani, 2013). Tanto a To4 quanto a To5, por homologia, poderiam agir indiferentemente sobre os canais iônicos de inseto e mamífero, mas estas toxinas só foram testadas sobre canais iônicos de humano. No entanto, a Ts1, com 59% e 44% de identidade com as To4 e To5 respectivamente, mostrou ser ativa sobre canais iônicos de ambos os grupos taxonômicos (Cologna *et al.*, 2009; Peigneur *et al.*, 2015).

Como é bem caracterizado, a estrutura (primária, secundária e terciária) das toxinas potencialmente interfere com a interação destas e seus alvos. Neste trabalho não foi feita elucidação da estrutura tridimensional das To4 ou To5, mas analisando a estrutura primária delas conseguiu-se verificar algumas características compartilhadas com outras β -toxinas (Fig. 38): 1) amidação e 2) alguns resíduos de aminoácidos posicionados estrategicamente.

Primeiramente, neste alinhamento é observado que a amidação no C-terminal é parte conservada deste grupo de β -toxinas. A exceção deste grupo é a Tpa2 que casualmente apresentou discreta atividade quando testada sobre células TE671 (Barona *et al.*, 2006). Testes desta toxina sobre os subtipos de Na_v s ainda não foram publicados, no entanto, a Tpa2 mostrou atividade de β -toxina sobre os subtipos $hNa_v1.2 - 1.4$ e 1.6 quando testada a 500 nM (ver tese de Guerrero, 2012). Ainda assim, a atividade desta toxina não se compara com as alterações evocadas por este grupo de toxinas sobre os Na_v s alvo. Já foi

mostrado que dita amidagem faz diferença na atividade biológica quando a Ts1 nativa nos estados amidado e sem amidagem foi testada sobre neurônios do gânglio da raiz dorsal de rato DRG (Coelho *et al.*, 2014).

A amidagem confere cargas positivas ao extremo C-terminal deste tipo de moléculas. Interessantemente, a Tz1 além de possuir amidagem no C-terminal, seu resíduo de aminoácido neste extremo é uma arginina (Borges *et al.*, 2004), cuja carga é positiva por natureza, o que incrementa ainda mais sua carga líquida positiva neste ponto. Um teste eletrofisiológico feito comparando a CsslI nativa e suas mutações no C-terminal mostrou que adicionando resíduos de aminoácido de carga positiva, estes permitiram reproduzir as atividades da toxina nativa que é amidada (Estrada *et al.*, 2011). Em decorrência a isto, parece que o estado amidado nestas β -toxinas é fundamental para a interação delas com seus alvos.

2). Como discutido (Duque *et al.*, 2017), foi notada a presença de alguns resíduos de aminoácido posicionados estrategicamente quando alinhadas este grupo de β -toxinas (Fig. 36). Este grupo de toxinas alinhadas possuem resíduos de aminoácidos que mostraram ser parte fundamental na interação de β -toxinas previamente descritas com seus Na_v s alvos. São eles Y5 (Meng *et al.*, 2015), K12 (Chen & Chung, 2012), K1, um resíduo ácido E26 e um número de resíduos aromáticos distribuídos ao longo da estrutura primária (Pedraza & Possani, 2013).

Diferentemente da To4, a To5 tem a menor identidade neste grupo de toxinas. Esta não possui os resíduos de aminoácido K1 e Y44, mas seus substitutos são conservativos. No entanto, A valina na posição da K12 separa esta toxina do padrão (Fig. 36) deixando como base fundamental a probabilidade explícita da atividade evocada pela toxina sobre os Na_v s testados neste trabalho. Um fator determinante para a interação destas β -toxinas com diversos subtipos de Na_v s, além dos resíduos já mencionados, é a distribuição de Cys ao longo da estrutura primária. Consequentemente, todas as toxinas deste grupo (Fig. 36) possuem o padrão similar tanto para toxinas que agem sobre Na_v s de mamífero (Tan *et al.*, 2006) quanto de inseto (Pedraza & Possani, 2013). De fato, Ts1 (Peigneur *et al.*, 2015) e Ts2 (Cologna *et al.*, 2012) mostraram ser

ativas sobre Na_vs destes dois grupos taxonômicos. Portanto, futuros testes com estas duas toxinas To4 e To5 sobre Na_vs próprios de inseto são recomendados.

Assim como as características estruturais da toxina influenciam sua atividade sobre seu alvo, as características intrínsecas dos canais iônicos também influenciam a interação com as toxinas. Há nove subtipos de canais iônicos para sódio de mamífero da subfamília Na_v1 (Catterall, 2012) e todos estes subtipos têm mostrado serem estruturalmente similares entre si (Catterall *et al.*, 2005; Kwong & Carr, 2015). No entanto, dentre eles há pontos específicos que são alvo das toxinas de escorpião (Catterall *et al.*, 2005). As β-toxinas agem sobre os segmentos S1-S2 e S3-S4 localizados no domínio DII no sensor de voltagem dos canais iônicos para sódio (Cestèle & Catterall, 2000; Pedraza & Possani, 2013). Ainda nestes segmentos, pontos chaves no subtipo Na_v1.2 são alvo da CsslV, uma β-toxina bem caracterizada que reconhece os resíduos E779 e P782 no segmento S1-S2, e o resíduo G845 no segmento S3-S4 do DII (Zhang *et al.*, 2011).

Adicionais interações acontecem quando dita toxina reconhece os resíduos E1438 e D1445 do *loop* SS2-S6 no domínio DIII destes canais iônicos (Zhang *et al.*, 2012), ver figura 37 para melhor entender. Estudos sobre interação de β-toxinas e canais iônicos têm demonstrado que tais toxinas não só dependem da interação sobre os segmentos S1-S4 do DII, senão também do SS2 no DIII (Leipold *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2007). Esta interação tem sido destacada com β-toxinas que são específicas para Na_vs próprios de inseto (He *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). Curiosamente, a To4 mostrou ser ativa sobre todos os subtipos de Na_vs. Este fato permitiria inferir que dita toxina possui maior número de pontos de reconhecimento sobre cada subtipo de canal iônico alvo que qualquer outra toxina mais específica.

Não diferentemente foi o resultado da atividade da To5 sobre estes subtipos de Na_vs humano. Como foi discutido, no alinhamento a To5 foi a mais discrepante em termos de identidade (Fig. 36). Mais além, nossos resultados mostraram que esta toxina diminuiu as I_{Na} da maioria dos os Na_vs aqui testados, mas sua tendência foi aumentar I_{Na} do subtipo hNa_v1.3, fenômeno não esperado para

este tipo de toxina. No entanto, a Ts2 testada sobre os subtipos de mamífero Na_v1.2 até Na_v1.8 mostrando tipicamente um efeito de α -toxina, apresentou atividade tipo β -toxina apenas sobre o subtipo Na_v1.3 (Cologna *et al.*, 2012). Este tipo de atividade divergente de uma toxina sobre seus diferentes canais alvo deixa claro que elas têm que ser investigadas a fundo para melhor compreensão da sua atividade molecular.

O mecanismo de ação dos canais iônicos para sódio quando uma β -toxina interage com estes foi denominado “*voltage sensor-trapping model*” (Cestèle *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2012). Neste modelo, após um pré-pulso aplicado ao canal iônico, a toxina que age reconhece resíduos de aminoácidos localizados nos segmentos S1-S4 do DII (Cohen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Adicionalmente, para evitar o livre deslocamento do segmento sensor de voltagem S4, a toxina se ancora sobre específicos pontos dos *loops* SSI (Song *et al.*, 2011) ou SS2 entre os segmentos S5-S6 do DIII (Cohen *et al.*, 2007; Leipold *et al.*, 2006; He *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Assim que a toxina e o canal iônico estão interagindo, a toxina mantém o estado pré-ativado do canal fazendo este mais sensível a voltagens despolarizantes (Zhang *et al.*, 2012). Ainda que as toxinas To4 e To5 foram testadas com e sem pré-pulso, tais toxinas não mostraram diferença entre sua atividade usando estes dois protocolos, enquanto que a Tz1 (Borges *et al.*, 2004), e a BmK IT2 (He *et al.*, 2011), por exemplo, foram dependentes de pré-pulso. As β -toxinas, em princípio, têm a habilidade de interagir com resíduos de aminoácidos que só são expostos pelo canal iônico unicamente quando se aplica um primeiro estímulo despolarizante sobre este (Cestèle *et al.*, 2001). Nossos resultados com as toxinas objeto desta pesquisa mostraram que elas poderiam estar interagindo com resíduos de aminoácidos expostos nos *loops* S3-S4 DII e que são comuns para todos os subtipos de Na_vs testados como, por exemplo, a E837 e a L840 (Fig. 39). Explicando desta maneira o fenômeno de deslocamento para voltagens mais negativas a ativação de cada Na_v testado depois de aplicada cada toxina.

Experimentos feitos com a Tz1 mostraram que dita toxina age sobre dois estados dos Na_vs, ativado e desativado, destacando que o deslocamento do

shift de voltagem e a diminuição de correntes, produto da interação entre toxina e canal iônico, são parte de dois eventos separados (Leipold *et al.*, 2012). Estes dois eventos foram claramente reconhecidos nos nossos experimentos com as toxinas testadas. No entanto, esse fenômeno de aumento de corrente produzido pela To5 sobre o Na_v1.3 mencionado antes, só poderia ser explicado se ao invés que a toxina aprisione o sensor de voltagem, esta toxina consiga puxa-o de dentro da membrana celular.

O aumento de I_{Na} produzido por toxinas de escorpiões é comum das α-toxinas (Gordon *et al.*, 2007). No entanto, uma análise feita nos resultados deste experimento deixou claro que não houve atividade tipo α da To5 sobre esse Na_v. Pode haver várias explicações na tentativa de elucidar este evento molecular. Embora, não serão mais do que hipóteses até aumentar o uso das metodologias moleculares de interação. Com isso, é suportada a ideia proposta por outros autores sobre continuar uma pesquisa aprofundada das toxinas escorpiônicas e suas interações com os alvos para melhor esclarecimento das informações atuais (Peigneur *et al.*, 2015).

Conhecendo os alcances biológicos das toxinas To4 e To5 aqui descritos, cabe enfatizar a importância deste tópico para o conhecimento epidemiológico produzido pelo escorpião *T. obscurus* (Pardal *et al.*, 2003). Esta espécie de escorpião ocorre no norte do Brasil (Norte dos estados de Pará e Amapá) incluindo Suriname e Guiana Francesa (Lourenço & Leguin, 2008). Quando há acidente por picada deste escorpião ocorre no paciente um número eventos locais e consideráveis eventos sistêmicos que colocam em risco a saúde da população (Pardal *et al.*, 2003; 2014). Surpreendentemente, como demonstrado com diferentes populações do escorpião *T. serrulatus* após caracterização dos componentes da peçonha e avaliação farmacológica (Oliveira *et al.*, 2013), foi sugerido para *T. obscurus* que duas populações ocorrendo no estado do Pará poderiam ter variabilidade na peçonha dado à diferença entre sinais/sintomas apresentados pelas respectivas populações de pacientes afetadas (Pardal *et al.*, 2014).

A caracterização de componentes da peçonha desta espécie de escorpião ainda está sendo elucidada. Já foram identificadas três toxinas que agem sobre

canais iônicos para potássio de considerável atividade sobre seus alvos (Batista *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2002a). Também foram caracterizadas atividades biológicas de quatro toxinas para sódio, das quais pela primeira vez, duas foram eletrofisiologicamente testadas sobre subtipos de Na_vs neste trabalho. A To1 (Tc49b) mostrou diminuir I_{Na} de células do cerebelo granular, além de ser muito tóxica para camundongos (Batista *et al.*, 2002b), a To2 (Tc48a) mostrou um efeito de tipo α -toxina com um K_d de 82 (Batista *et al.*, 2004), e para finalizar, as toxinas To4 e To5 deste trabalho mostraram ser promiscuas sobre os canais hNa_v1.1-1.7 mostrando que podem agir quase sobre qualquer tecido, sabendo que cada linhagem celular especializa sua expressão de subtipos de Na_vs dependendo do tecido ao qual pertence (Catterall *et al.*, 2005; Lera & Kraus, 2015).

Resumindo, a peçonha de *T. obscurus* contém toxinas que agem sobre diferentes alvos e de diferentes maneiras: aquelas que bloqueiam as correntes de potássio, e aquelas que agem tanto do tipo α , ou do tipo β sobre os Na_vs. Somando as informações gerais daquelas toxinas e suas atividades biologicamente caracterizadas desta peçonha, até a data é demonstrado, sem contar com muitos componentes ainda não caracterizados, que o acidente causado por picada de *T. obscurus* é potencialmente perigoso.

6.2 To5His RECOMBINANTE

Pelo menos 80 diferentes toxinas de escorpiões têm sido expressas heterologicamente usando diferentes sistemas celulares de expressão como mamífero, fungo e bactérias. No entanto, produzir este tipo de peptídeos nestes sistemas tem representado um desafio. Entre estas toxinas recombinantes são poucas as toxinas próprias de escorpiões do gênero *Tityus* que foram expressas. Com exceção das toxinas TSK4 (Werkman *et al.*, 1993; Juhng *et al.*, 1999) e Ts4 (Guatimosim *et al.*, 2000) do escorpião *T. serrulatus*, nenhuma outra toxina recombinante procedente deste gênero de escorpiões foi reportada. De fato, a To5, indicada neste trabalho, é a primeira toxina do escorpião *T. obscurus* a ser expressa como recombinante.

Esta toxina, como muitas outras, também resultou ser desafiante durante a tentativa de expressão. Pela experiência adquirida nas diversas tentativas de expressar a To5 usando diferentes estratégias de produção e linhagens bacterianas foi determinado que este gene estaria agindo toxicamente para as linhagens bacterianas. Este evento foi destacado pela análise de vários fenômenos ocorridos: A discreta produção desta toxina nas diferentes linhagens como proteína solúvel, uma quantidade de proteína fusão insolúvel e observação da inibição de crescimento celular após indução. De fato, a To5, ainda não sendo biologicamente caracterizada, compartilha o grupo NaTx2 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) tendo homologia com a bactridina 1, uma toxina que age sobre bactérias (Díaz *et al.*, 2009).

Para tentar resolver a baixa produção da To5His na primeira linhagem testada *E. coli* BL21 DE3, foram testadas diversas estratégias já mencionadas na metodologia. Em teoria, qualquer uma das condições que sejam alteradas ao longo do processo pode interferir no sucesso da produção recombinante. Em essência, as estratégias genéticas usadas no vetor de expressão (Sørensen & Mortensen, 2005a), a combinação do sistema vetor/linhagem celular usado (Cao *et al.*, 2015), meios de cultura e aditivos (Sørensen & Mortensen, 2005b). Após indução, continuam sendo fatores de mediação da produção: a dose de indutor a usar (Terpe, 2006), a temperatura e aditivos (Sørensen & Mortensen, 2005b; Costa *et al.*, 2014), agitação, tempo de indução, agentes oxidantes (Chaderjian *et al.*, 2005), tipo de sais (Ju *et al.*, 2009), osmolitos (Macchi *et al.*, 2012) e fatores físico-químicos como o pH e a osmolaridade (Franco *et al.*, 1999), pois estes fatores combinados interferem no mecanismo da maquinaria molecular e seu vínculo específico com o gene alvo a expressar. Embora, nossos resultados trás tentar melhorar a produção recombinante em BL21, mostraram que são poucas as possibilidades das quais o gene melhore sua expressão. Adicionalmente, após produzir a toxina fusão alvo (Tiorredoxina-To5His), esta mostrou estar no estado reduzido.

Na tentativa de aumentar o produto recombinante e ainda no estado oxidado, usando o mesmo sistema de vetor foi testada a linhagem Rosetta (DE3) pLysS. Este sistema oferece restrição de expressão do gene alvo devido ao seu plasmídeo pLysS (Baneyx, 1999). Enquanto a célula é crescida até atingir sua

densidade ótica OD₆₀₀ apropriada, a produção basal de proteína alvo é limitada até sua indução (Terpe, 2006). Este evento adicionado de um aditivo restritor como a glicose favorece a pós-expressão do gene alvo quando este representa risco celular (Terpe, 2006). Em efeito, nossos resultados usando estes dois fatores mostraram melhorar em 3,5 vezes a produção da recombinante alvo, obviamente usando as condições apropriadas conforme este sistema específico. No entanto, A To5 fusão ainda continuou sendo expressa no seu estado reduzido.

Uma das possíveis explicações ao fato que a proteína alvo não esteja sendo oxidada poderia ser às suas propriedades intrínsecas. Vale lembrar que, ainda que esta toxina esteja sendo produzida em fusão com uma proteína chaperona como a tioredoxina, as toxinas escorpiônicas são peptídeos saturados de cisteínas (Mouhat *et al.*, 2004), o que lhes confere características pouco comuns para ser processadas na maquinaria molecular de uma bactéria.

Na tentativa de conseguir o estado oxidado da To5His foram selecionadas duas linhagens bacterianas: SHuffle ®T7 e Origami (DE3). Estas duas linhagens basicamente favorecem a oxidação das proteínas dado que seus citoplasmas naturalmente redutores (De Marco, 2009) foram geneticamente modificados permitindo estes ser mais oxidantes (Terpe, 2006). No entanto, apesar da primeira linhagem conter mutação para permitir expressão de genes tóxicos (segundo as especificações do fabricante), esta linhagem não mostrou aparente expressão do gene alvo durante as primeiras fases nos testes preliminares. Nossos experimentos ainda mostraram que esta linhagem cresce muito bem em comparação com a linhagem Origami (DE3). Esta última, por sua parte, foi pouco eficiente na transformação e crescimento. Mesmo assim, a Origami (DE3) mostrou uma leve produção da To5 fusão e provavelmente, no seu estado oxidado como indicado nos resultados.

Ao todo, a toxina recombinante To5His mostrou ser tóxica para bactérias e por suas características intrínsecas, esta toxina resultou um desafio na hora de expressar ela no seu estado estruturado. O estado reduzido da proteína fusão além de ser comprovado pela massa molecular, também foi considerado na hora da digestão com enteroquinase para liberar a To5His da tioredoxina, dado

que, após esta clivagem apareceram massas moleculares próprias da tioredoxina, mas não do peptídeo alvo.

Inesperadamente, foram achadas massas moleculares que batem com os últimos 18 resíduos de aminoácidos do C-terminal To5His. A enteroquinase é uma enzima que teoricamente reconhece a sequência de quatro aminoácidos ácidos seguidos de um aminoácido básico DDDDK↓ (Choi *et al.*, 2001). Não obstante, esta enzima já mostrou ser inespecífica sobre proteínas (Choi *et al.*, 2001; Rosano & Ceccarelli, 2014). Inclusive, outras toxinas recombinantes mostraram ser alvo inespecífico desta enzima (Zhu *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2012; Tekook *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013b). Após entender esta propriedade inespecífica da enzima, foi analisada a estrutura primária C-terminal da To5His e seu ponto de clivagem inespecífico (DNR↓). Nesta sequência, o aminoácido ácido D próprio do sitio de reconhecimento da enzima, seguido de um resíduo neutro N e por último, um resíduo básico R, permitem destacar um novo ponto de reconhecimento da enteroquinase pelo seu alvo, e verificar outras características físico-químicas dos resíduos reconhecidos pela enzima como, por exemplo, sua condição polar, além de serem simplesmente alguns resíduos de aminoácidos ácidos seguidos de um resíduo básico.

7. CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo de toxinas com ações em canais para sódio isolados da peçonha do escorpião *T. obscurus*;
- As toxinas To4 e To5 nativas apresentam efeito do tipo beta, em diferentes graus, em todos os subtipos de Na_vs testados;
- A ação das duas toxinas, ao contrário de outras β-toxinas, não depende de uma pré-ativação, indicando que estas podem reconhecer resíduos de aminoácidos extracelulares nos locais de interação com seu alvo;
- O mecanismo de interação destas duas toxinas com seus alvos aqui estudados ainda devem ser aprofundados;
- O gene da toxina To5 mostrou ser tóxico para as linhagens bacterianas testadas neste trabalho. No entanto, uma análise minuciosa na seleção da linhagem, nos protocolos de crescimento e indução da bactéria e, a produção e purificação da toxina recombinante pode favorecer o sucesso da expressão.

8. PERSPECTIVAS

- Produzir e testar a To5 recombinante e comparar estes resultados com a To5 nativa;
- Testar as toxinas sobre outros subtipos de canais iônicos ainda não testados tanto do grupo mamífero quanto de outros grupos taxonômicos;
- Sugere-se caracterizar estruturalmente as toxinas, usando técnicas espectroscópicas.
- Avaliar modos de interação destas toxinas com seus alvos usando técnicas moleculares e *patch-clamp*.

9. BIBLIOGRAFIA

- Andavan, G. S. B., & Lemmens-Gruber, R. (2011). Voltage-Gated Sodium Channels : Mutations , Channelopathies and Targets. *Current Medicinal Chemistry*, *18*, 377-397.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current opinion in biotechnology*, *10*(5), 411-421.
- 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*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1764*(1), 76-84.
- Batista, C. V., Gómez-Lagunas, F., Lucas, S., & Possani, L. D. (2000). Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺-channels. *Febs Letters*, *486*(2), 117-120.
- Batista, C. V., Gómez-Lagunas, F., de la Vega, R. C. R. g., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., & Possani, L. D. (2002a). Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1. 3 and Shaker BK⁺-channels with distinctly different affinities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1601*(2), 123-131.
- Batista, C. V., Zamudio, F. Z., Lucas, S., Fox, J. W., Frau, A., Prestipino, G., & Possani, L. D. (2002b). Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon*, *40*(5), 557-562.
- 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. *Journal of Chromatography B*, *803*(1), 55-66. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.09.002
- Benkhaddir, K., Kharrat, R., Cestèle, S., Mosbah, A., Rochat, H., El Ayeb, M. & Karoui, H. (2004). Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides*, *25*, 151-61.

- Bergeron, Z. L., & Bingham, J-P. (2012). Scorpion Toxins Specific for Potassium (K+) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. *Toxins*, 4, 1082-1119.
- Borchani, F., Stankiewicz, M., Kopeyan, C., Mansuelle, P., Kharrat, R., Cestèle, S., Karoui, H., Rochat, H., Pelhate, M. & El Ayeb, M. (2007). Purification, structure and activity of three insect toxins from *Buthus occitanus tunetanus* venom. *Toxicon*, 35, 365-82.
- Borges, A., Alfonzo, M. J., García, C. C., Winand, N. J., Leipold, E., & Heinemann, S. H. (2004). Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel β -toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*, 43(6), 671-684.
- Bosmans, F., & Tytgat, J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, 49, 142-158.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., . . . Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327-1333.
- Cao, Q., Lu, W., Cai, X., Hu, C., Wang, C., Ye, J., . . . Huo, J. (2015). In vitro refolding and functional analysis of polyhistidine-tagged *Buthus martensii* Karsch antitumor-analgesic peptide produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, 37(12), 2461-2466.
- Casewell, N. R., Wu, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., & Fry, B. G. (2013). Complex cocktails : the evolutionary novelty of venoms. *Cell Press*, 28(4), 219-229.
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., & Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, 124-141.
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60 : structure , function and pathophysiology. *Journal Physiology*, 11, 2577-2589.
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 1, 35-51.

- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). Voltage sensor–trapping: enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3–S4 loop in domain II. *Neuron*, *21*(4), 919-931.
- Cestèle, S., & Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, *82*, 883-892.
- Cestèle, S., Scheuer, T., Mantegazza, M., Rochat, H., & Catterall, W. A. (2001). Neutralization of Gating Charges in Domain II of the Sodium Channel α Subunit Enhances Voltage-Sensor Trapping by a β -Scorpion Toxin. *The Journal of General Physiology*, *118*(3), 291-302.
- Chen, R., & Chung, S.-H. (2012a). Binding modes and functional surface of anti-mammalian scorpion α -toxins to sodium channels. *Biochemistry*, *51*, 7775-7782.
- Chen, R., & Chung, S.-H. (2012b). Conserved Functional Surface of Antimammalian Scorpion β -Toxins. *The journal of physical chemistry. B*, *116*, 4796-4800.
- Chen, Z.-yun, Zhen, D.-yun, Hu, Y.-T., He, Y.-W., Pan, N., Ding, L.-P., Cao, Z.-J., et al. (2012). Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS ONE*, *7*(4), e35154.
- Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R., . . . Jiang, L. (2013a). Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins. *PLoS One*, *8*(4), e60201.
- Chen, Z., Han, S., Cao, Z., Wu, Y., Zhuo, R., & Li, W. (2013b). Fusion expression and purification of four disulfide-rich peptides reveals enterokinase secondary cleavage sites in animal toxins. *Peptides*, *39*, 145-151.
- Cheng, Y., Zhao, J., Qiao, W., & Chen, K. (2014). Recent advances in diagnosis and treatment of gliomas using chlorotoxin-based bioconjugates. *Journal Medical Molecular*, *4*(5), 385-405.
- Choi, S. I., Song, H. W., Moon, J. W., & Seong, B. L. (2001). Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. *Biotechnology and bioengineering*, *75*(6), 718-724.

- Chaderjian, W. B., Chin, E. T., Harris, R. J., & Etcheverry, T. M. (2005). Effect of Copper Sulfate on Performance of a Serum-Free CHO Cell Culture Process and the Level of Free Thiol in the Recombinant Antibody Expressed. *Biotechnology progress*, 21(2), 550-553.
- Chugunov, A. O., Koromyslova, A. D., Berkut, A. A., Peigneur, S., Tytgat, J., Polyansky, A. A., Pentkovsky, V., et al. (2013). Modular organization of α -toxins from scorpion venom mirrors domain structure of their targets, sodium channels. *The Journal of biological chemistry*, 288(26), 19014-19027.
- Coelho, V., Cremonese, C., Anjolette, F., Aguiar, J., Varanda, W., & Arantes, E. (2014). Functional and structural study comparing the C-terminal amidated β -neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, 83, 15-21.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Froy, O., Corzo, G., Angelovici, M., Gordon, D., et al. (2004). Dissection of the Functional Surface of an Anti-insect Excitatory Toxin Illuminates a Putative "Hot Spot" Common to All Scorpion β -Toxins Affecting Na⁺ Channels. *The Journal of biological chemistry*, 279(27), 8206-8211.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., & Gurevitz, M. (2005). Common Features in the Functional Surface of Scorpion B-Toxins and Elements That Confer Specificity for Insect and Mammalian Voltage-gated Sodium Channels. *The Journal of biological chemistry*, 280(6), 5045-5053.
- Cohen, L., Ilan, N., Gur, M., Stühmer, W., Gordon, D., & Gurevitz, M. (2007). Design of a specific activator for skeletal muscle sodium channels uncovers channel architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29424-29430.
- Cohen, L., Lipstein, N., Karbat, I., Ilan, N., Gilles, N., Kahn, R., Gordon, D., et al. (2008). Miniaturization of Scorpion B-Toxins Uncovers a Putative Ancestral Surface of Interaction with Voltage-gated Sodium Channels. *The Journal of biological chemistry*, 283(22), 15169-15176.
- 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. *The FEBS journal*, 279(8), 1495-1504.

- Coronas, F. I., Diego-García, E., Restano-Cassulini, R., de Roodt, A. R., & Possani, L. D. (2015). Biochemical and physiological characterization of a new Na⁺-channel specific peptide from the venom of the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Peptides*, *68*, 11-16.
- Costa, E., Piazza, V., Gambardella, Ch. Moresco, R., et al. (2015). Ecotoxicological effects of sediments from Mar Piccolo, South Italy: toxicity testing with organisms from different trophic levels. *Environ Sci Pollut Res*, *1*, 1-17.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Recombinant Protein Expression in Microbial Systems*, *24*.
- Cremones, C. M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J. S., Dutra, A. A., Waelkens, E., . . . Pimenta, A. (2016). Structural and Functional Elucidation of Peptide Ts11 Shows Evidence of a Novel Subfamily of Scorpion Venom Toxins. *Toxins*, *8*(10), 288.
- Dai, H., Yin, S., Li, T., Cao, Z., Ji, Y., Wu, Y., & Li, W. (2012). Recombinant expression, purification, and characterization of scorpion toxin BmαTX14. *Protein expression and purification*, *82*(2), 325-331.
- de Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of medicinal chemistry*, *58*(18), 7093-7118.
- De Marco, A. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, *8*(1), 26.
- Debin J. A., Maggio J. E., Strichartz G. R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology*, *264* (2), 361-369
- Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J. D., Sherman, N. E., & Fox, J. W. (2009). Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *54*(6), 802-17.

- Diego-garcía, E., Caliskan, F., & Tytgat, J. (2014). The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC Genomics*, *15*, 1-16.
- Duque, Harry Morales., Mourao, Caroline Barbosa Farias., Tibery, D. V., Barbosa, Eder A., Campos, L. A., Schwartz, Elisabeth F. (2017). To4, the first *Tityus obscurus* β -toxin fully electrophysiologically characterized on human sodium channel isoforms. *Peptides*, p.1, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.010>
- Dutertre, S. (2014). Venomics in medicinal chemistry. *Medicinal Chemistry*, pp. 1609-1610.
- Estrada, G., Garcia, B. I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L. D., et al. (2007). Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CsslI : Heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochimica et biophysica acta*, *1770*, 1161-1168.
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L. D., & Corzo, G. (2011). Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of CsslI, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1. 6. *Peptides*, *32*(1), 75-79.
- Finney, D. J. (1971). Statistical logic in the monitoring of reactions to therapeutic drugs. *Methods Inf Med*. *10*, 237-45.
- Forsyth, P., Sevcik, C., Martínez, R., Castillo, C., & Suze, G. D. (2012). Bactridine 's effects on DUM cricket neurons under voltage clamp conditions. *Journal of Insect Physiology*, *58*, 1676-1685.
- Franco, R., Daniela, G., Fabrizio, M., Ilaria, G., & Detlev, H. (1999). Influence of osmolarity and pH increase to achieve a reduction of monoclonal antibodies aggregates in a production process. *Cytotechnology*, *29*(1), 11-25.
- Gao, B., Harvey, P. J., Craik, D. J., Ronjat, M., De Waard, M., & Zhu, S. (2013). Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Bioscience reports*, *33*(3), e00047.
- Gati, C. D., Mortari, M. R., Schwartz, E. F. (2012). Towards Therapeutic Applications of Arthropod VenomK⁺-Channel Blockers in CNS Neurologic Diseases Involving Memory Acquisition and Storage. *Journal of Toxicology*, *2012*, 1-21.

- Gómez, J. P., Quintana, J. C., Arbeláez, P., Fernández, J., Silva, J. F., Barona, J., Gutiérrez, J. C., et al. (2010). Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. *Biomédica*, *30*, 126-139.
- Gordon, D., Ilan, N., Zilberberg, N., Gilles, N., Urbach, D., Cohen, L., Karbat, I., et al. (2003). An "Old World" scorpion b-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels: A possible link towards diversification of b-toxins. *European journal of biochemistry / FEBS*, *2670*, 2663-2670.
- Gordon, D., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Kahn, R., Gilles, N., Dong, K., et al. (2007). The differential preference of scorpion a-toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control, *49*, 452-472.
- Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., Zinn-Justin, S., Saclay, C. E., Gif, F., & Al, G. E. T. (1998). Functional Anatomy of Scorpion toxins Affecting Sodium Channels. *Journal Toxicology*, *17*(2), 131-159.
- Guatimosim, S. C., Kalapothakis, E., Diniz, C. R., & Chávez-Olórtegui, C. (2000). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon*, *38*(1), 113-121.
- Gur, M., Kahn, R., Karbat, I., Regev, N., Wang, J., Catterall, W. A., Gordon, D., et al. (2011). Elucidation of the Molecular Basis of Selective Recognition Uncovers the Interaction Site for the Core Domain of Scorpion a-Toxins on Sodium Channels. *The Journal of biological chemistry*, *286*(40), 35209-35217.
- Guerrero V., J. A. (2012). *Identificação e caracterização biológica de peptídeos isolados da peçonha do escorpião Colombiano Tityus pachyurus, que atuam nos canais para Na⁺*. Tese de doutorado, UnB, 117pp
- Guerrero-Vargas, J., 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*(2), 30478.
- Gurevitz, M. (2012). Mapping of scorpion toxin receptor sites at voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, *60*(4), 502-511.

- Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., Stankiewicz, M., et al. (2007). The insecticidal potential of scorpion B-toxins. *Toxicon*, *49*, 473-489.
- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*, 81-91.
- Hamon, A., Martinage, A., Kopeyan, C., Ulens, C., Gilles, N., Sautie, P., Tytgat, J., et al. (2002). Characterization of scorpion α -like toxin group using two new toxins from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *European journal of biochemistry / FEBS*, *269*, 3920-3933.
- He, H., Liu, Z., Dong, B., Zhang, J., Shu, X., Zhou, J., & Ji, Y. (2011). Localization of Receptor Site on Insect Sodium Channel for Depressant β -toxin BmK IT2. *PLoS One*, *6*(1), e14510.
- Harrison, P. L., Abdel-rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, *88*, 115-137. Elsevier Ltd.
- Ji, Y.-H., Mansuelle, P., Terakawa, S., Kopeyan, C., Yanaihara, C., Hsu, K. & Rochat, H. (1996). Two neurotoxins (BmK I and BmK II) from the venom of the scorpion *Buthus martensi* Karsch: purification, amino acid sequences and assessment of specific activity. *Toxicon*, *34*, 987-1001.
- Johnson, T. M., Quick, M. W., Sakai, T. T., & Krishna, N. R. (2000). Expression of functional recombinant scorpion β -neurotoxin Csx II in *E. coli*. *Peptides*, *21*, 767-772.
- Jover, E., Couraud, F., & Rochat, H. (1980). TWO TYPES OF SCORPION NEUROTOXINS CHARACTERIZED BY THEIR BINDING TO TWO SEPARATE RECEPTOR SITES ON RAT BRAIN SYNAPTOSOMES. *Biochemical and biophysical research communications*, *95*(4), 1607-1614.
- Ju, H. K., Hwang, S.-J., Jeon, C.-J., Lee, G. M., & Yoon, S. K. (2009). Use of NaCl prevents aggregation of recombinant COMP–Angiopoietin-1 in Chinese hamster ovary cells. *Journal of biotechnology*, *143*(2), 145-150.
- Juhng, K., Kokate, T., Yamaguchi, S., Kim, B., Rogowski, R., Blaustein, M., & Rogawski, M. A. (1999). Induction of seizures by the potent K⁺ channel-blocking scorpion venom peptide toxins tityustoxin-K α and pandinustoxin-K α . *Epilepsy research*, *34*(2), 177-186.

- Kahn, R., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Sokolov, S., Catterall, W. A., Gordon, D., et al. (2009). Molecular Requirements for Recognition of Brain Voltage-gated Sodium Channels by Scorpion α -Toxins. *The Journal of biological chemistry*, 284(31), 20684-20691.
- Karbat, I., Kahn, R., Cohen, L., Ilan, N., Giles, N., Corzo, G., Froy, O., et al. (2007). The unique pharmacology of the scorpion α -like toxin Lqh3 is associated with its flexible C-tail. *The FEBS Journal*, 274, 1918-1931.
- Kopeyan, H., Martinez, G. & Rochat, H. (1978). Amino acid sequence of neurotoxin V from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *European Journal of Biochemistry*. 89, 54-58.
- Kopeyan, H., Martinez, G. & Rochat, H. (1979). The Amino acid Sequence of Neurotoxin III of *Androctonus australis Hector*. *European Journal of Biochemistry*. 94, 609-15.
- Kopeyan, H., Mansuelle, P., Martin-Euclaire, M. F., Rochat, H. & Miranda, F. (1993). Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*: a new type of alpha-toxin highly toxic both to mammals and insects. *Nat Toxins*. 5, 308-12.
- Kuzmenkov, A. I., Krylov, N. A., Chugunov, A. O., Grishin, E. V., & Vassilevski, A. A. (2016). Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database*, 2016, baw056.
- Kwong, K., & Carr, M. J. (2015). Voltage-gated sodium channels. *Current opinion in pharmacology*, 22, 131-139.
- Landon, C., Cornet, B., Bonmatin, J.-M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F., & Ptak, M. (1996). H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 404, 395-404.
- Lee, C. W., Bae, C., Lee, J., Ryu, J. H., Kim, H. H., Kohno, T., Swartz, K. J., et al. (2012). Solution Structure of Kurtoxin: A Gating Modifier Selective for Cav3 Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Biochemistry*, 51, 1862-1873.

- Leipold, E., Hansel, A., Borges, A., & Heinemann, S. H. (2006). Subtype specificity of scorpion β -toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. *Molecular pharmacology*, *70*(1), 340-347.
- Leipold, E., Borges, A., & Heinemann, S. H. (2012). Scorpion β -toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *The Journal of General Physiology*, *139*(4), 305-319.
- Lippens, G., Najib, J., Wodak, S., & Tartar, A. (1995). NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry*, *34*(1), 13-21.
- Lourenço, W. R., & Leguin, E.-A. (2008). The true identity of Scorpio (Atreus) obscurus Gervais, 1843 (Scorpiones, Buthidae). *Euscorpius*, *2008*(75), 1-9.
- Ma, Z., Kong, J., Gordon, D., Gurevitz, M., & Kallen, R. G. (2013). Direct evidence that scorpion α -toxins (site-3) modulate sodium channel inactivation by hindrance of voltage-sensor movements. *PLoS ONE*, *8*(11), 11.
- Macchi, F., Eisenkolb, M., Kiefer, H., & Otzen, D. E. (2012). The effect of osmolytes on protein fibrillation. *International journal of molecular sciences*, *13*(3), 3801-3819.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiological reviews*, *60*(3), 512-538.
- Mamelak AN and Jacoby DB (2007). Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). *Expert Opin Drug Deliv*, *4*, 175-186.
- Mantegazza, M., & Cestèle, S. (2005). β -Scorpion toxin effects suggest electrostatic interactions in domain II of voltage-dependent sodium channels. *Journal Physiology*, *1*, 13-30.
- Martin-Eauclaire, M.-F., & Bougis, P. E. (2012). Potassium channels blockers from the venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, *J. Toxicol*, *2012*, 1-9.

- Meng, X., Xu, Y., Zhao, M., Wang, F., Ma, Y., Jin, Y., . . . Zhang, J. (2015). The Functional Property Changes of Muscular Nav1. 4 and Cardiac Nav1. 5 Induced by Scorpion Toxin BmK AGP-SYPU1 Mutants Y42F and Y5F. *Biochemistry*, 54(19), 2988-2996.
- Morgenstern, D., & King, G. F. (2013). The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon*, 63, 120-128.
- Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J.-guillaume, Blanc, E., Sabatier, J.-marc, Ayeb, M. E., et al. (2000). A New Fold in the Scorpion Toxin Family , Associated With an Activity on a Ryanodine-Sensitive Calcium Channel. *Proteins: Structure, function and genomics*, 442, 436-442.
- Morales D., H. (2013). *Caracterização de novos peptídeos bloqueadores de canais para K⁺ isolados da peçonha do escorpião Tityus sp.* Dissertação de mestrado, UnB, 103pp
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., & Sabatier, J.-M. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *The Biochemical journal*, 378(Pt 3), 717-26.
- Mouhat, S., Andreotti N., Jouirou, B., & Sabatier, J.-M. (2008). Animal Toxins Acting on Voltage-Gated Potassium Channels. *Current Pharmaceutical Design*, 14(Pt 24), 2503-18.
- Mourão, C. B. F. (2012). *Prospecção de peptídeos neuroativos da peçonha da aranha caranguejeira Acanthoscurria paulensis.* Dissertação de mestrado, UnB, 150pp
- Mourão, C. B., & Schwartz, E. F. (2013). Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. *Marine drugs*, 11(6), 2069-2112.
- Norton, R. S., & Mcdonough, S. I. (2008). Peptides Targeting Voltage-Gated Calcium Channels. *Current pharmaceutical design*, 14, 2480-2491.
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R. % hang, G. (2011). In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. 64(4), 327-31.
- 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.

- Oren DA., Froy O., Amit E., Kleinberger-Doron N., Gurevitz M., Shaanan B. (1998). An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. , 6(9), 1095-1103.
- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Ferroni, E., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93, 125-135.
- Pardal, P. P., Castro, L. C., & Jennings, E. (2003). Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(3), 349-353.
- Pardal, P., IshikaewaE., Vieira, J., Coelho, J., Regina, C., Abati, P., Quiroga, M. & Chalkidis H. (2014). Clinical aspects of envenomation caused by *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) in two distinct regions of Pará state, Brazilian Amazon basin: a prospective case series. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20, 1-7.
- Payandeh, J., El-Din, T. M. G., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, 486, 135-140.
- Pedraza-Escalona, M., & Possani, L. D. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gate sodium channels: interaction and effects. *Frontiers in Biocience*, 18, 572-587.
- Peigneur, S., Cologna, C. T., Cremonez, C. M., Mille, B. G., Pucca, M. B., Cuypers, E., . . . Tytgat, J. (2015). A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na V-type isoforms. *Neuropharmacology*, 95, 269-277.
- 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 Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(3), 405-415.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., & Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *European journal of biochemistry / FEBS*, 264, 287-300.
- Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., & Becerril, B. (2000). Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, 82, 861-868.

- Pringos, E., Vignes, M., Martinez, J., Rolland, V., Mousseron, M., & E, P. (2011). Peptide Neurotoxins That Affect Voltage-Gated Calcium Channels: A Close-Up on ω -Agatoxins. *Toxins*, *3*, 17-42.
- Quintero-hernández, V., Jiménez-vargas, J. M., Gurrola, G. B., & Valdivia, H. H. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*, *76*, 328-342.
- Rochat, H., Rochat, C, Mirada, F. Lissitzky, S. & Edman, P. (1970). The Amino Acid Sequence of Neurotoxin I of *Androctonus australis Hector*. *European Journal of Biochemistry*. *17*, 262–266.
- Rochat, H., Rochat, C, Sampieri, F., Mirada, F. & Lissitzky, S. (1972). The Amino-Acid Sequence of Neurotoxin II of *Androctonus australis Hector*. *European Journal of Biochemistry*. *28*, 381–388.
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *43*, 865-875.
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, *46*(8), 831-44.
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2007). Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon*, *49*, 171-180
- Rodríguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2010). Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon*, *56*, 1155-1161.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Recombinant Protein Expression in Microbial Systems*, *7*.
- Santucci, L., Bruschi, M., Ghiggeri, G. M., & Candiano, G. (2015). The latest advancements in proteomic two-dimensional gel electrophoresis analysis applied to biological samples. *Clinical Proteomics: Methods and Protocols*, 103-125.
- Saucedo, A. L., Rio-portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L. D., Delepierre, M., et al. (2012). Solution structure of native and recombinant expressed toxin Cssl from

- the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 Sodium channels. *Biochimica et biophysica acta*, 1824, 478-487.
- Sautière, P., Cestèle, 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.
- Schagger, H. (2006). tricine-sds-page. *NATURE PROTOCOLS-ELECTRONIC EDITION*-, 1(1), 16.
- Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., & Guroola, G. B. (2012). Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicon*, 59, 283-293.
- Schwartz, E. F., Capes, M. E., Diego-García, E., Zamudio, F., Fuentes, O., Possani, L. D. & Valdivia, H. (2009). Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 157, 392–403.
- Song, W., Du, Y., Liu, Z., Luo, N., Turkov, M., Gordon, D., . . . Dong, K. (2011). Substitutions in the domain III voltage-sensing module enhance the sensitivity of an insect sodium channel to a scorpion β -toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 15781-15788.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005b). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 4(1), 1.
- Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, K. S., Sato, K., et al. (2002). k-Hefutoxin1, a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function. *Biochemistry*, 277(33), 30040 -30047.
- Sunagar, K., Undheim, E. A. B., Chan, A. H. C., Koludarov, I., Muñoz-gómez, S. A., Antunes, A., & Fry, B. G. (2013). Evolution Stings: The Origin and Diversification of Scorpion Toxin Peptide Scaffolds. *Toxins*, 5, 2456-2487.
- Schwartz, E. F., Capes, E. M., Diego-García, E., Zamudio, F. Z., Fuentes, O., Possani, L. D., & Valdivia, H. H. (2009). Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi*

- scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *British journal of pharmacology*, 157(3), 392-403.
- Tan, P., Ranganathan, S., & Brusich, V. (2006). Deduction of functional peptide motifs in scorpion toxins. *Journal of Peptide Science*, 12(6), 420-427.
- Tekook, M., Fabritz, L., Kirchhof, P., König, S., Müller, F., Schmitz, W., . . . Kirchhefer, U. (2012). Gene construction, expression and functional testing of an inotropic peptide from the venom of the black scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon*, 60(8), 1415-1427.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211.
- Tianpei, X., Zhu, Y., & Li, S. (2014). Optimized scorpion polypeptide LMX: a pest control protein effective against rice leaf folder. *PLoS One*, 9(6), e100232.
- Tong, X., Yao, J., He, F., Chen, X., Zheng, X., Xie, C., Wu, G., et al. (2006). NMR solution structure of BmK-βIT, an excitatory scorpion β-toxin without a “hot spot” at the relevant position. *Biochemical and biophysical research communications*, 349, 890-899.
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. a, Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., & Possani, L. D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences*, 20(11), 444-7.
- Turkov, M., Rashi, S., Noam, Z., Gordon, D., Khalifa, R. B., Stankiewicz, M., . . . Gurevitz, M. (1997). In Vitro Folding and Functional Analysis of an Anti-insect Selective Scorpion Depressant Neurotoxin Produced in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 10(1), 123-131.
- Vetter, I., Davis, J. L., Rash, L. D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P. F., Lewis, R. J., et al. (2011). Venomics. a new paradigm for natural products-based.pdf. *Amino Acids*, 40, 15-28.
- Weinberger, H., Moran, Y., Gordon, D., Turkov, M., Kahn, R., & Gurevitz, M. (2010). Positions under Positive Selection — Key for Selectivity and Potency of Scorpion α-Toxins. *Molecular Biology and Evolution*, 27(5), 1025-1034.

- Werkman, T., Gustafson, T., Rogowski, R., Blaustein, M., & Rogawski, M. A. (1993). Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1. 2 K⁺ channel. *Molecular pharmacology*, 44(2), 430-436.
- Wilson, M. J., Min, Z., & Gajewiak, J. (2015). α - and β -Subunit Composition of Voltage-gated Sodium Channels Investigated with μ -Conotoxins and Recently Discovered μ O-Conotoxins GVIIJ. *Journal Neurophysiology*.
- Zhang, J. Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., . . . Catterall, W. A. (2011). Structure-function map of the receptor site for β -scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33641-33651.
- Zhang, J. Z., Yarov-yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., Gurevitz, M., et al. (2012). Mapping the Interaction Site for a β -Scorpion Toxin in the Pore Module of Domain III of Voltage-gated Na⁺ Channels. *The Journal of biological chemistry*, 287, 30719-30728.
- Zhu, S., Bosmans, F., & Tytgat, J. (2004). Adaptive Evolution of Scorpion Sodium Channel Toxins. *Journal of Molecular Evolution*, 58, 145-153.
- Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., Lanz-Mendoza, Maria del Carmen Rodríguez, H., Peigneur, S., Diego-Garcia, E., Martin-Eauclaire, M.-F., et al. (2010). MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 872-883.
- Zhu, S., Peibneurs, S., & Gao, B. (2012). Evolutionary diversification of Mesobuthus α -scorpion toxins affecting sodium channels. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 18.