

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS
ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO COLOMBIANO *Tityus pachyurus*,
QUE ATUAM NOS CANAIS PARA Na⁺**

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS

Brasília-Distrito Federal

2012

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS
ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO COLOMBIANO *Tityus pachyurus*,
QUE ATUAM NOS CANAIS PARA Na⁺**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz

Brasília-Distrito Federal

2012



Tese de Doutorado

Jimmy Alexander Guerrero Vargas

Título:

“Identificação e caracterização biológica de peptídeos isolados da peçonha do escorpião colombiano *Tityus pachyurus*, que atuam nos canais para Na⁺”.

Comissão Examinadora:

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

Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz
Presidente/Orientadora
UnB

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

Prof. Dr. Werner Treptow
Membro Titular Interno não Vinculado ao
Programa
UnB

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

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
Membro Suplente
Interno não Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 14 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Nicolás Guerrero Rivas,
fonte de inspiração para cada dia tentar
ser melhor e a María del Pilar Rivas Pava,
que por me apoiar virou mamãe e papai

AGRADECIMENTOS

Expresso meus mais sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas:

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, por me permitir realizar meus estudos de doutorado.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de estudos de pós-graduação.

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

Ao doutor Lourival Possani da Universidade Nacional Autónoma de México (UNAM), por me receber em seu laboratório, onde desenvolvi parte do projeto.

Ao Dr Carlos Bloch Jr, por me acolher e permitir desenvolver parte do projeto nas instalações do Laboratório de Espectrometria de Massa da EMBRAPA-CENARGEN.

Ao Centro de Pesquisas Biomédicas da Universidade do Cauca (CIBUC) em Colômbia, por me permitir manter os escorpiões durante a época da coleta.

Aos pesquisadores do Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A minha orientadora Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz, por todos os conhecimentos transmitidos durante o desenvolvimento da pesquisa, por seu valioso e incondicional apoio, pela confiança e paciência em este tempo de trabalho.

À minha família, em especial a minha mamãe María Elena Vargas e minha avó Cornelia Villaquiran por ser esse carinho ilimitado, aos meus irmãos Hector Andrés e Sara Patricia Guerrero Vargas, pelo apoio e carinho, a meus tios Jesús, Rodrigo e Fernando Vargas por sua valiosa e desinteressada ajuda.

Aos professores do laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília Dra. Márcia Renata Mortari, Dr. Carlos Schwartz e Dr. Osmindo Pires Junior pela amizade e sugestões no decorrer deste projeto de pesquisa.

À professora Dra. Fabiana Pirani do Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela ajuda na análise do material histológico e ao técnico deste Laboratório senhor Bráulio Silva Santos Filho pela ajuda no processamento das lâminas para histologia.

A meus amigos e colegas da Toxinologia em Colômbia Dr. Santiago Ayerbe por seus conselhos, M. Sc Javier Rodríguez pela ajuda em campo na coleta de escorpiões, tramites burocráticos relativos às permissões para coleta de escorpiões.

A minhas boas amigas Thalita Soares Camargos, Caroline Farias Barbosa, Natiela Beatriz de Oliveira e Solange Rego, por sua ajuda, apoio e em especial por ser a minha família brasileira.

Aos meus amigos de Bancada do LTX, Lucianna Couto, Lilian dos Anjos, Jacqueline Coimbra, Priscilla Galante, Luciana Macedo, Rafael Melani e Christiano Gatti por essas conversas e ajuda na bancada.

A meus parceiros e amigos de vários trabalhos com peçonhas de escorpiões Rosa Amalia Dueñas, Fagner Neves e Harry Morales, pelo trabalho em experimentos e pelas boas conversas.

A minhas amigas do Laboratório de Bioquímica da UnB e também toxicologistas Jessika Kele, Andréa Carvalho, à Dra. Mariana de Souza Castro e ao técnico desse laboratório Antônio Rufino por sua grande amizade.

A meus amigos professores e parceiros de bancada no laboratório da UNAM em México Dra Verónica Quintero, Dra Juana María Vargas, Dr Rita Restano-Casullini, M. Sc Timoteo Olamendi Portugal.

Desejo manifestar agradecimentos especiais ao Dr Ernesto Ortiz do laboratório do Dr Possani e ao Eder Barbosa do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa por serem além de parceiros e colaboradores, bons amigos.

Aos meus bons amigos colombianos de ótimos momentos e de ajuda mútua em qualquer ocasião, Adriana Rivera, Carolina Santamaría, Claudia Maricela Gómez, Paola Isaza, Claudia Arenas, Diana Monslave, Paolín Cáserez, Lorena Mendoza, Viviana Trujillo.

A meu grande amigo Dr. Carlos Uribe, por essa grande, valiosa e desinteressada amizade, pela sempre e constante disposição de ajuda e por ser o médico dos alunos colombianos da UnB.

Aos técnicos do laboratório de Toxinologia da UnB Washington José de Oliveira, Pedro Ivo Pelicano e, em especial, à senhora Maria Magalhães Viana pelo carinho e amizade.

A meus amigos de moradia Cesar Prias, colombiano, e Jacques Souza, brasileiro, por compartilhar de bate-papos e piadas.

E, por último, a todas aquelas pessoas que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

Tityus pachyurus é uma das espécies causadoras de escorpionismo grave na Colômbia e pouco se conhece sobre as toxinas que constituem sua peçonha. O presente projeto teve como objetivo principal identificar novas toxinas moduladoras de canais para Na⁺ na peçonha de *T. pachyurus*. Pela construção da biblioteca de cDNA da glândula peçonhenta de um escorpião *T. pachyurus* se identificaram 5 novas toxinas putativas da família dos peptídeos com atividade em canais para Na⁺ e por similaridade na estrutura primária dos peptídeos maduros, 3 foram classificados como alfa-NaScTxs - Tpa4, Tpa5 e Tpa6 - e dois como beta-NaScTxs - Tpa7 e Tpa8 -, sendo que a toxina Tpa8 é o primeiro registro de uma beta toxina anti-inseto excitatória na peçonha de escorpiões do Novo Mundo. Essas NaScTxs foram usadas na construção de uma árvore filogenética incluindo NaScTxs do escorpião *T. obscurus* e de outras identificadas em escorpiões do gênero *Tityus* e depositadas nos bancos de dados públicos de proteínas. A análise filogenética coincide com a distribuição geográfica dos escorpiões do gênero *Tityus* divididos nas espécies que ocorrem ao norte do rio Amazonas e naquelas que habitam ao sul do rio Amazonas.

A peçonha bruta de *T. pachyurus*, submetida a fracionamento por RP-HPLC usando uma coluna C18, resultou em 55 frações cromatográficas. As três frações mais abundantes foram submetidas a recromatografias e os peptídeos puros obtidos foram seqüenciados por espectrometria de massa (MS). Três seqüências parciais que correspondem a três novas NaScTxs foram obtidas: Tpa9 com 7061,87 Da, Tpa10 com 6994,36 Da e Tpa11 com 7167,23 Da. Essas novas toxinas (500 nM) foram testadas em canais de sódio expressos em células HEK. Tpa9 reduziu em 20% as correntes de Na⁺ em hNav1.1, como as β NaScTx. Tpa10 apresentou efeito em hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3 e hNav1.6 como as α NaScTx e a Tpa11 em hNav1.2, hNav1.3 e hNav1.6. A Tpa2, uma β NaScTx previamente identificada na mesma espécie de escorpião, modificou as correntes de sódio em hNav1.2, hNav1.3 e hNav1.6. Essas quatro toxinas foram administradas em camundongos via i.p., indicando que Tpa2 e Tpa10 causam escorpionismo classe II ($\chi^2 = 8,0$; p-valor = 0,005) e degeneração vacuolar e infiltrado inflamatório no fígado ($\chi^2 = 4,4$; p-valor = 0,035).

ABSTRACT

Although *Tityus pachyurus* is the scorpion species which is responsible for the most dangerous cases of scorpionism in Colombia, little is known about its venom toxins. This project aimed to identify new toxins having Na⁺ channels as molecular targets in the venom of *T. pachyurus*. By means of the library construction of the cDNA venomous gland of a scorpion *T. pachyurus*, five new putative toxins from NaScTx peptide family were identified and by the primary structure of the mature peptides, three of them were classified as alpha-NaScTx - Tpa4, Tpa5 and Tpa6 - and two as beta-NaScTx - the Tpa7 and Tpa8. The last one is the first anti-insect excitatory beta-class toxin described for a New World scorpion. These five toxins, together with others NaScTx described for *Tityus* species were used to construct a phylogenetic tree. Phylogenetic analysis indicated a marked geographic separation between toxins presented in scorpions occurring in the North of the Amazon River and those presented in the scorpions inhabiting the South of the Amazon River.

The crude venom of *T. pachyurus* after being fractionated by RP-HPLC, using a C18 column, resulted in 55 chromatographic fractions. The three most abundant fractions were submitted to further fractioning and the purified peptides were sequenced by mass spectrometry (MS). Three NaScTx partial sequences were described: Tpa9 with 7061.87 Da, Tpa10 with 6994.36 Da and Tpa11 with 7167, 23 Da. These new toxins (500 nM) were tested on Na⁺-channels expressed in *HEK* cells. Tpa9 reduced on 20% the Na⁺ currents in hNav1.1, similarly as the β NaScTx; Tpa10 acted on hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3 and hNav1.6 as α NaScTx, and Tpa11 had effect on hNav1.2, hNav1.3, and hNav1.6. The Tpa2, a β -toxin previously identified, modified the currents in hNav1.2, hNav1.3 and hNav1.6. These four toxins were injected into mice showing that Tpa2 and Tpa10 caused class II scorpionism ($\chi^2 = 8.0$, $p = 0.005$) and vacuolar degeneration and inflammatory infiltration in the liver ($\chi^2 = 4.4$, p -value = 0.035).

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO.	20
1.1. OS ESCORPIÕES.....	20
1.2. ESCORPIÃO <i>Tityus pachyurus</i>	22
1.3. ESCORPIONISMO	23
1.4. PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES	25
1.5. ALVOS MOLECULARES DAS NaScTX	26
1.5.1. Canais para sódio em vertebrados	26
1.6. ABORDAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE ESCORPIÕES.....	31
1.7. ANÁLISE TRANSCRITÔMICA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE ESCORPIÕES NEOTROPICAIS.....	32
1.8. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE ESCORPIÕES DO GÊNERO <i>Tityus</i>	33
1.9. PESQUISAS DESENVOLVIDAS COM A PEÇONHA DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Tityus</i> COM DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NA COLÔMBIA. ...	35
1.10. PESQUISAS RELACIONADAS COM O ESCORPIONISMO NA COLÔMBIA.....	36
2. RELEVÂNCIA DA PESQUISA.....	39
3. OBJETIVOS	41
3.1. OBJETIVO GERAL	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. OBTENÇÃO DA PEÇONHA	42

4.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA	42
4.2.1. Extração do RNA total.....	42
4.2.2. Síntese da primeira fita de cDNA	42
4.2.3. Síntese da segunda fita de cDNA	43
4.2.4. Ligação ao vetor <i>pDNR-LIB</i>	43
4.2.5. Transformação bacteriana por eletroporação	44
4.2.6. PCR de colônia	45
4.2.7. Purificação de plasmídeos	45
4.2.8. Sequenciamento automático de DNA	46
4.2.9. Análise bioinformática das sequências nucleotídicas.	46
4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	47
4.4. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA DO ESCORPIÃO <i>T. pachyurus</i>	48
4.5. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQUENCIAMENTO <i>de novo</i>	48
4.6. AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA	50
4.7. DETERMINAÇÃO DO EFEITO HISTOPATOLÓGICO DE QUATRO PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO <i>T. pachyurus</i> E QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NOS CANAIS PARA SÓDIO	51
5. RESULTADOS	53
5.1. BIBLIOTECA DE cDNA.....	53
5.1.1. Toxinas putativas para Na ⁺ de <i>T. pachyurus</i>	53
5.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	56
5.3. FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DO ESCORPIÃO <i>T. pachyurus</i> POR RP-HPLC	58
5.4. RECROMATOGRAFIA, ANÁLISE DE MASSA E SEQUENCIAMENTO <i>de novo</i> DAS FRAÇÕES DE INTERESSE	60
5.4.1 Fração Tpa 36,40.....	60

5.4.1.1. Recromatografia e análise de massa da fração Tpa 36,40-33,38	60
5.4.1.2. Sequenciamento <i>de novo</i> da Tpa9	61
5.4.2. Fração Tpa 36,90.....	65
5.4.2.1. Recromatografia e análise de massa da fração Tpa 36,90-35,20	66
5.4.2.2. Sequenciamento <i>de novo</i> da Tpa 36,90-35,20-35,11	66
5.4.3. Fração Tpa 37,92.....	69
5.4.3.1 Recromatografias e análise de massa das frações Tpa 37,92-36,89 e Tpa 37,92-37,75.....	70
5.4.3.2. Sequenciamento <i>de novo</i> da Tpa 10 e da Tpa 11	70
5.5. AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA	76
5.6. EFEITO HISTOPATOLÓGICO E SINTOMAS DO ESCORPIONISMO, CAUSADOS PELAS NaScTXs DE <i>T. pachyurus</i>	79
5.6.1. Sintomas do escorpionismo causados pelas NaScTx Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2.....	80
5.6.2. Efeitos histopatológicos causados pelas NaScTx Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2.....	81
6. DISCUSSÃO	90
7. CONCLUSÕES.	101
8. PERSPECTIVAS	103
9. BIBLIOGRAFIA.....	104
10. ANEXOS.....	117
10.1. Anexo 1. Artigo científico de parte dos resultados da tese, publicado na revista PloS ONE (http://www.plosone.org/home.action).....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia externa do escorpião. Fonte Flórez, (2007) 21
- Figura 2.** Foto de uma fêmea do escorpião *Tityus pachyurus* com crias e ovos não desenvolvidos nas costas. Espécime coletado no município de Mesitas de la Escuela no estado de Cundinamarca na Colômbia. Foto: Jimmy Alexander Guerrero Vargas 22
- Figura 3.** Representação esquemática do arranjo transmembrânico da subunidade α do canal para sódio dependente de voltagem, indicando os sítios de ligação das NaScTx de escorpião. Fonte Catterall *et al.*, 2007 ... 28
- Figura 4. Alinhamento de algumas α NaScTx. Fonte Bosmans e Tytgat, (2007).** As pontes dissulfeto estão indicadas abaixo da sequência consenso, os resíduos de cisteína são indicados em vermelho com fundo cinza. Os resíduos hidrofóbicos importantes para a estrutura e função das toxinas são indicados por uma caixa verde, as áreas amarelas exibem as superfícies ativas das α NaScTx; o *NC-domain*, o *core domain* e o *loop* que se forma entre a folha $\beta 2$ e a folha $\beta 3$, e na parte acima está indicada a estrutura secundária geral das α NaScTx. 30
- Figura 5. Alinhamento de nove β NaScTx, com modificações. Fote Cohen *et al.*, (2005).** As quatro pontes estão indicadas abaixo das sequências, os resíduos de cisteína são indicados em cinza, e com fundo escuro as cisteínas que formam a quarta ponte, e na parte acima está indicada a estrutura secundária geral das β NaScTx. 31
- Figura 6.** Mapa do vetor de clonagem que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm)..... 44
- Figura 7. Alinhamento múltiplo das NaScTx do escorpião *T. pachyurus*.** A sequência da NaScTx Tpa2 previamente descrita por Barona *et al.*, (2006), e descrita como proteína está em negrito. Nas toxinas putativas Tpa4 até Tpa8 no painel da esquerda são indicadas as sequências dos peptídeos sinal em itálico. No painel da direita as sequências dos peptídeos putativos

maduros, ressaltado em fundo preto o processamento N-terminal da Tpa4, e os resíduos de cisteína ressaltados em fundo cinza..... 55

Figura 8. Alinhamento múltiplo da toxina putativa Tpa8 com outras β NaScTx anti-inseto excitatórias identificadas em escorpiões do velho mundo. Tpa8 de *T. pachyurus*, LqhIT1b de *L. quinquestriatus hebreus*, BjxtrIT de *Buthotus judaicus*, AahIT1 de *Androctonus australis*, LqqIT1 de *L. q. quinquestriatus* LqhxtIT de *L. q. hebraeus* e BmKITAP de *Mesobuthus martensii*. 55

Figura 9. Figura 9. Análise filogenética das putativas NaScTx do escorpião *T. pachyurus* com outras NaScTx de escorpiões do gênero *Tityus*. As toxinas putativas de *T. pachyurus* estão indicadas no quadrado vermelho, assim como também a previamente descrita Tpa2. Os símbolos em preto indicam toxinas de escorpiões com distribuição geográfica ao norte da bacia Amazônica, quadrado para *T. pachyurus*, círculo para *T. obscurus*, triângulo para *T. discrepans* triângulo invertido para *T. zulianu*. Os símbolos transparentes indicam toxinas de escorpiões com distribuição geográfica ao sul da bacia Amazônica, quadrado para *T. bahiensis*, círculo para *T. serrulatus*, triângulo para *T. stigmurus*, triângulo invertido para *T. costatus* e rombo para *T. fasciolatus*. 57

Figura 10. Perfil cromatográfico da peçonha de *T. pachyurus* em coluna de fase reversa C18. Alíquotas de 1 mg da peçonha foram dissolvidas em água com 0,12% de TFA (v/v) (tampão A) e aplicadas em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm) previamente equilibrada com água com 0,12% de TFA (v/v). As frações foram eluídas sob um gradiente linear de acetonitrila com 0,1% de TFA (v/v) (tampão B) com um fluxo constante de 1 mL/min e monitoramento a 230 nm. 59

Figura 11. Perfil cromatográfico da fração Tpa 36,40. A fração Tpa 36,40 foi recromatografada em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), em gradiente linear de 15% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216 nm..... 60

Figura 12. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa9. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro

250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em *MALDI-TOF* em modo linear da Tpa9..... 62

Figura 13. Sequência parcial de aminoácidos da Tpa9, obtida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, usando-se o método *In-Source Decay (ISD)*...... 63

Figura 14. Sequência parcial da Tpa9 obtida por espectrometria de massa. A linha em azul indica o fragmento obtido pelo método de *ISD*. E as linhas vermelhas indicam os fragmentos obtidos após da clivagem enzimática com Tripsina e as sequências *de novo* obtidas pelo método *LIFT*..... 64

Figura 15. Alinhamento múltiplo da Tpa9 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade. Observam-se, dentro das formas retangulares, os resíduos de aminoácidos idênticos e compartilhados entre as toxinas. O alinhamento foi realizado nos programa *CLUSTAL_X 1.83* (Thompson *et al.*, 1997)...... 65

Figura 16. Recromatografia da fração Tpa 36,90. Perfil cromatográfico da fração Tpa 36,90 obtido em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), em gradiente linear de 15% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216 nm..... 65

Figura 17. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa2. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em *MALDI-TOF* em modo linear da Tpa2..... 67

Figura 18. Sequência parcial de aminoácidos da Tpa2, obtida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, usando-se o método *in source decay (ISD)*...... 68

Figura 19. Recromatografia da fração Tpa 37,92. Perfil cromatográfico da fração Tpa 37,92 obtido em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), em gradiente linear de 15% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216 nm..... 69

Figura 20. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa10. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em *MALDI-TOF* em modo linear da Tpa10..... 71

Figura 21. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa11. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em *MALDI-TOF* em modo linear da Tpa11..... 72

Figura 22. Sequência parcial de aminoácidos da Tpa10. A sequência parcial de aminoácidos da Tpa10 foi obtida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, usando-se o método *In-Source Decay (ISD)*..... 73

Figura 23. Alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpa10 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade. As formas retangulares destacam os resíduos de aminoácidos idênticos. O alinhamento foi realizado no programa *CLUSTAL_X 1.83* (Thompson *et al.*, 1997). To9 de *T. obscurus* (HE585232.1), To10 (HE585233.1)..... 74

Figura 24. Sequência parcial de resíduos de aminoácidos da Tpa11. A sequência parcial de resíduos de aminoácidos da Tpa11 foi obtida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, usando-se o método *In-Source Secay (ISD)*..... 75

Figura 25. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpa11 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade. As formas retangulares evidenciam os resíduos de aminoácidos idênticos. O alinhamento foi realizado nos programa *CLUSTAL_X 1.83*. To12 (HE585235.1) de *T. obscurus*..... 76

Figura 26. Alinhamento múltiplo das sequencias completas e parciais das NaScTx da peçonha do escorpião *T. pachyurus*. Tpa2 (Barona *et al.*, 2006) e da Tpa4 até Tpa11 identificadas no presente trabalho. As formas

retangulares evidenciam os resíduos de aminoácidos idênticos. O alinhamento foi realizado nos programa *CLUSTAL_X 1.83*..... 76

- Figura 27. Efeitos das toxinas Tpa2 (500 nM), Tpa9 (500 nM), Tpa10 (500 nM) e Tpa11 (500 nM) sobre as correntes iônicas nos canais para Na⁺.** a. Efeitos tipo β da Tpa9, Tpa2 e Tpa11. b. Correntes provocadas por um pulso de despolarização de -10 mV até -90mV no registro controle (em preto) é normal, e após da aplicação da Tpa10 (500 nM) (em vermelho)..... 78
- Figura 28. Ausência de efeitos histológicos no coração de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*.** A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2..... 82
- Figura 29. Ausência de efeitos histológicos no pâncreas de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*.** A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2..... 83
- Figura 30. Ausência de efeitos histológicos no pulmão de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*.** A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2..... 84
- Figura 31. Ausência de efeitos histológicos no rim de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*.** A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2..... 85
- Figura 32. Infiltrado inflamatório no fígado de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*.** A. Controle (solução salina fisiológica), B. Tpa9, ausência de efeito, C. Tpa11, ausência de efeito, D. Tpa10, infiltrado inflamatório, E. Tpa2, infiltrado inflamatório..... 86
- Figura 33. Degradação vacuolar no fígado de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*.** A. Controle (solução salina fisiológica), B. Tpa9, ausência de efeito, C. Tpa11, ausência de efeito, D. Tpa10, degradação vacuolar, E. Tpa2, degradação vacuolar. 87

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Padronização dos registros dos sintomas apresentados pelos camundongos após da aplicação das toxinas isoladas do escorpião *T. pachyurus*. 52
- Tabela 2. Fragmentos peptídicos da Tpa9 após a clivagem com a enzima tripsina.** As sequências de cada fragmento foram obtidas pelo método *LIFT* usando um equipamento de tipo *MALDI-TOF/TOF* em modo refletido. A massa molecular teórica foi calculada *on-line* utilizando a ferramenta *PeptideMass* (http://web.expasy.org/peptide_mass/)..... 61
- Tabela 3.** Resumo dos efeitos apresentados pelas toxinas Tpa10, Tpa2, Tpa9 e Tpa11, nas concentrações de 500nM, sobre as correntes iônicas de canais para sódio. 79
- Tabela 4.** Escorpionismo causado em camundongos (n=5) após da injeção das toxinas Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 (0,5 µ/g-animal) isoladas da peçonha do escorpião *T. pachyurus*. χ^2 valor de qui-quadrado, **p-valor**, probabilidade ≤ 0,050..... 80
- Tabela 5.** Alterações hepáticas causadas no fígado de camundongos pela toxina Tpa9 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado..... 88
- Tabela 6.** Efeitos histológicos causados no fígado de camundongos da toxina Tpa10 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado..... 88
- Tabela 7.** Efeitos histológicos causados no fígado de camundongos da toxina Tpa11 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado..... 88
- Tabela 8.** Efeitos histológicos causados no fígado de camundongos da toxina Tpa2 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado..... 88

Tabela 9. Resultados da análise estatística dos efeitos histopatológicos sobre fígado de camundongos após da injeção de uma dose de 0,5 μ /g-animal das toxinas Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 isoladas da peçonha do escorpião *T. pachyurus*. **χ^2** valor de Qui-quadrado, **p-valor**, probabilidade $\leq 0,050$ 89

1. INTRODUÇÃO.

1.1. OS ESCORPIÕES.

Os escorpiões pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones. A maioria deles apresenta de 13 a 150 mm de comprimento. Estes animais estão entre os artrópodes mais antigos que se conhecem e seu registro fóssil data do período Siluriano. Os representantes desse período eram aquáticos, possuíam brânquias e careciam de garras tarsais, sendo que as espécies atuais não diferem muito das antigas (Brusca *et al.*, 2003; Ruppert *et al.*, 2003).

As espécies de escorpiões habitam todo o planeta, com exceção das regiões polares e prevalecem em regiões de climas tropicais e subtropicais. Estes artrópodes têm hábitos furtivos e noturnos, ocultam-se embaixo de troncos, assim como em fendas e buracos em zonas áridas ou úmidas. Também é comum encontrá-los perto de residências ou mesmo dentro delas, especialmente quando as condições higiênico-sanitárias são ruins, onde podem acontecer os acidentes com escorpiões (Flórez, 2001; Ruppert *et al.*, 2003).

O corpo dos escorpiões é dividido em prossoma e opistossoma, sendo que este último subdivide-se em mesossoma e metassoma, como ilustrado na Figura 1. A parte anterior do prossoma não apresenta divisões, e neste local estão localizados dois olhos na linha mediana e até cinco olhos de cada lado. Existem seis pares de apêndices ligados a essa região: um par de quelíceras em forma de pinça, um par de palpos, quatro pares de pernas, que apresentam duas garras na extremidade. O mesossoma é formado por sete segmentos e o metassoma por cinco, sendo encontrado na extremidade do metassoma um artigo denominado télson, o qual contém um par de glândulas produtoras de peçonha, que desembocam no ferrão. O orifício anal fica localizado entre o quinto segmento do metassoma e o télson (González-Sponga, 1996; Flórez, 2007).

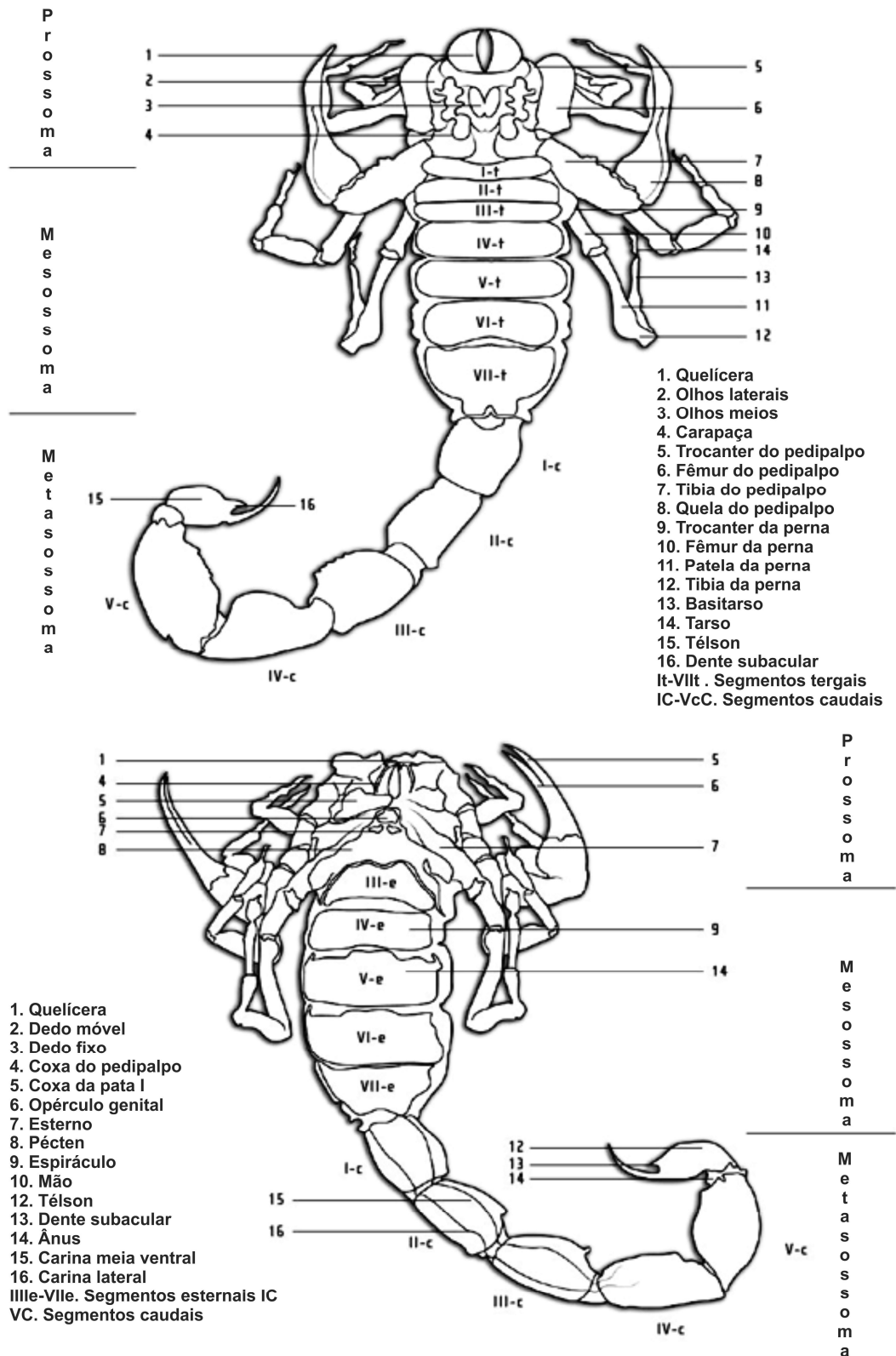


Figura 1. Morfologia externa do escorpião. Fonte Flórez, (2007)

1.2. ESCORPIÃO *Tityus pachyurus*.

Tityus pachyurus é considerada, até o momento, como a espécie causadora do escorpionismo mais severo na Colômbia (Barona *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2004; Rodríguez, 2006), com uma distribuição geográfica restrita a três países, Colômbia, Costa Rica e Panamá (Montoya e Armas, 2002). Na Colômbia, apresenta uma ampla distribuição ao longo do vale do rio Magdalena que percorre vários estados e com uma marcada distribuição altitudinal entre 400 a 1500 m acima do nível do mar (Flórez, 2001; Rodríguez, 2008). É uma espécie de cor escura com as pontas das patas e dos pedipalpos de cor avermelhada, com um comprimento máximo de aproximadamente 7 cm (figura 2), solitária e fortemente adaptada a mudanças ambientais.



Figura 2. Foto de uma fêmea do escorpião *Tityus pachyurus* com crias e ovos não desenvolvidos nas costas. Espécime coletado no município de Mesitas de la Escuela no estado de Cundinamarca na Colômbia. Foto: Jimmy Alexander Guerrero Vargas

1.3. ESCORPIONISMO

O escorpionismo é a doença em seres humanos causada pela picada de escorpiões que, dependendo da gravidade, pode levar à morte. A severidade do acidente escorpiônico depende de vários fatores: a espécie de escorpião, quantidade e concentração da peçonha inoculada, idade e da resposta individual da vítima (Chippaux e Goyffon, 2008).

Quando acontece uma picada de escorpião, a peçonha é inoculada principalmente no espaço subcutâneo obtendo-se uma passagem rápida à circulação central e se distribuindo por tecidos e órgãos tais como: rins, músculos, intestino, fígado, pulmões e coração (Sevcik *et al.*, 2004; D'Suze *et al.*, 2004a). De maneira geral, as peçonhas dos escorpiões são misturas complexas sintetizadas em uma glândula apócrina e caracterizadas por apresentarem componentes farmacologicamente ativos, como peptídeos neurotóxicos (Loret e Hammock, 2001). Tais peptídeos são geralmente tóxicos para um grande número de organismos como mamíferos, insetos e crustáceos. Além disso, a peçonha possui enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas e outros componentes ainda não identificados (Batista *et al.*, 2004).

Estas peçonhas, quando inoculadas em humanos, atuam principalmente em sítios específicos dos canais para sódio, produzindo despolarização das terminações nervosas, desencadeando liberação de acetilcolina, adrenalina e noradrenalina. Dessa forma, esses neurotransmissores liberados anormalmente são responsáveis pela maioria dos sintomas clínicos observados no escorpionismo (Cupo *et al.*, 2003). Segundo as manifestações, que podem ser locais ou sistêmicas, pode-se classificar o escorpionismo como leve, moderado ou grave.

No escorpionismo leve, observam-se os seguintes sintomas: dor de intensidade variável em 100% dos casos, halo eritematoso no ponto da picada, e, em alguns casos, edema discreto, sudorese, piloereção e taquicardia. No escorpionismo moderado, há aumento das manifestações locais e se observam sintomas sistêmicos isolados como: agitação, sonolência, náuseas, vômitos, hipertensão arterial, taquicardia ou taquipnéia. Já no escorpionismo grave, além das manifestações locais, as manifestações sistêmicas são bastante evidentes e

intensas, onde a liberação de acetilcolina causa aumento das secreções glandulares lacrimais, nasais, sudoríparas, da mucosa gástrica e do pâncreas, provocando lacrimejamento, rinorréia, sudorese e vômito freqüente. Pode-se também observar priapismo, hipotensão, bradicardia, tremores e espasmos musculares. Como consequência da liberação de catecolaminas, pode haver midríase, arritmias cardíacas, taquicardia, hipertensão arterial e parada cardio-respiratória. Esta última é causada pela diminuição da fase diastólica e perfusão coronária, comprometimento do fluxo subendocárdico, aumento do tônus simpático e hipóxia, acelerando os processos de glicólise anaeróbica, implicando em disfunção miocárdica (Gueron *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2001; Gwee *et al.*, 2002; Cupo *et al.*, 2003).

O escorpionismo é um problema de saúde pública mundial, com uma alta incidência e diferentes graus de severidade, tendo um tratamento médico complexo e controverso que se baseia na neutralização da peçonha por meio de soro específico antiescorpiônico e o controle dos diferentes sintomas (Chippaux e Goyffon, 2008). Na América latina, o escorpionismo ocorre desde o México até o centro norte da Argentina, com um grande número de acidentes em países como México, Venezuela e Brasil (Otero *et al.*, 2004; Celis *et al.*, 2007; Mejías *et al.*, 2007; de Roodt *et al.*, 2009). É importante salientar que só a partir de 2008 (Chippaux e Goyffon, 2008), a Colômbia passa a ser considerada na lista dos países afetados por escorpionismo grave, causado especialmente pela espécie *Tityus pachyurus*. (Barona *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2004; Rodríguez, 2006).

O escorpionismo é causado por espécies que pertencem principalmente à família Buthidae. Tal família é a mais diversa, com a maior distribuição geográfica sobre o planeta e a única que contém espécies consideradas como potencialmente perigosas para humanos. Está dividida em 73 gêneros, 6 subgêneros, 529 espécies e 165 subespécies. Na América, a família Buthidae tem dois gêneros causadores de escorpionismo grave, o gênero *Tityus*, que é bastante numeroso, com mais ou menos 130 espécies, e *Centruroides* (Flórez, 2001). Na Colômbia são encontrados representantes de quatro gêneros da família Buthidae: *Ananteris*, com 4 espécies, *Centruroides*, com 2 espécies, *Rhopalurus*, com 1 espécie (*R. laticauda*) e *Tityus*, com 29 espécies (Botero-Trujillo e Fagua, 2007; Flórez, 2007).

1.4. PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES

As toxinas de invertebrados, principalmente quelicerados, têm suscitado um interesse investigativo crescente em virtude de seus efeitos nocivos ao homem. Atualmente, conhece-se, com um pouco mais de detalhes, as características estruturais e funcionais de algumas dessas toxinas, o que tem auxiliado enormemente no tratamento das vítimas de envenenamento e tem também permitido importantes avanços nas pesquisas em biotecnologia e farmacologia.

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

Os peptídeos neurotóxicos podem ser agrupados em quatro grandes famílias, segundo alvo molecular: 1. Bloqueadores de canais para K^+ (KTxs) que são peptídeos de cadeia curta (de 22 a 47 resíduos de aminoácidos), com 2 a 4 pontes dissulfeto (Tytgat *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2001; Rodríguez de la Vega e Possani, 2004; Diego-García *et al.*, 2008; Camargos *et al.*, 2011); 2. Peptídeos de cadeia longa (de 58 a 76 resíduos de aminoácidos) estabilizados por 4 pontes dissulfeto que possuem massa molecular entre 6,2- 8,5 KDa, que atuam interferindo com o fluxo do íon sódio através da membrana; 3. Peptídeos que modulam a atividade dos canais para cálcio são menos comuns e podem ser divididos em dois tipos: os inibidores das correntes iônicas nos canais para Ca^{2+} Tipo T, que possuem em média 63 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto (Olamendi-Portugal *et al.*, 2002; López-González *et al.*, 2003), e os peptídeos que especificamente modulam os canais para Ca^{2+} sensíveis a rianodina (Valdivia e

Possani, 1998); 4. Peptídeos moduladores do canal para cloreto, com 3 peptídeos descritos, todos isolados de *Leiurus quinquestriatus*: clorotoxina, que bloqueia levemente a condutância dos canais para cloreto de células epiteliais (DeBin *et al.*, 1993), GaTx1, que inibe os canais seletivos a ânions da proteína CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Fuller *et al.*, 2007) e GaTx2, que inibe os canais ClC-2 (Thompson *et al.*, 2009).

1.5. ALVOS MOLECULARES DAS NaScTX

Todos os escorpiões produzem toxinas, mas, como já se mencionou, são os integrantes da família Buthidae que produzem peçonhas neurotóxicas perigosas para o homem, destacando-se os peptídeos que agem nos canais para Na⁺ (NaScTx), responsáveis pelos efeitos neurotóxicos mais graves durante o envenenamento escorpiônico em humanos (Gwee *et al.*, 2002; Rodríguez de la Vega e Possani, 2005). É importante salientar que uma mesma espécie de escorpião pode produzir toxinas que agem em canais para Na⁺ dependentes de voltagem de mamíferos, e em canais para Na⁺ de insetos (Loret e Hammock, 2001; Catterall *et al.*, 2007; Rodríguez de la Vega e Possani, 2007).

1.5.1. Canais para sódio em vertebrados

Os canais iônicos são grandes proteínas que atravessam toda a estrutura da membrana celular e são encontrados em todas as células do corpo. Esses canais apresentam três propriedades importantes: a primeira é conduzir íons, a segunda é que eles reconhecem e escolhem entre íons específicos e a terceira é que abrem e fecham em resposta a sinais específicos, elétricos, mecânicos ou químicos. Por esta última razão, fica claro que os canais são regulados por três meios: pela voltagem (canais dependentes de voltagem), por transmissores químicos (canais dependentes de ligantes) ou por pressão ou estiramento (canais mecano-dependentes) (Kandel *et al.*, 2000).

Embora a sinalização neuronal dependa, em sua maior parte, dos canais iônicos seletivos para Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻, o canal para Na⁺ dependente de voltagem destaca-se por ser o mais afetado no escorpionismo severo. Por esta razão, serão mencionadas algumas características desse canal. Os canais para Na⁺ dependentes de voltagem são cruciais na iniciação e propagação do potencial

de ação nas células excitáveis, porque eles são os responsáveis pela despolarização inicial da membrana celular (Goldin *et al.*, 2000). O canal para Na⁺ é formado por uma proteína α , com aproximadamente 260 kDa, que tem quatro domínios transmembrânicos homólogos (I-IV) e que, normalmente, está associada a pequenas subunidades β . Cada um destes domínios possui seis regiões em α -hélice (1-6) transmembrânicas, sendo que o sensor de voltagem está localizado na α -hélice de número 4 (Figura 2). As quatro regiões em α -hélice repetidas associam-se umas às outras formando o poro do canal (Catterall *et al.*, 2005, 2007).

Diferentes canais para Na⁺ dependentes de voltagem têm sido identificados por registros eletrofisiológicos, purificação bioquímica e por clonagem molecular (Goldin, 2001). Goldin *et al.*, (2000) e Catterall *et al.*, (2005) sugeriram a seguinte nomenclatura para os canais para Na⁺: o nome é dado pelo símbolo químico do íon permeável (Na⁺) seguido do principal regulador, por exemplo, voltagem (Na_v), seguido por um número que indica o gene da subfamília (Na_v1) e, por último, um número depois do ponto decimal que indica a isoforma específica do canal (Na_v1.1). Com base nessa nomenclatura, estão catalogadas nove isoformas de canais para Na⁺ de mamíferos. Quatro isoformas são expressas no sistema nervoso central Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 e Na_v1.6. Duas isoformas são musculares: Na_v1.4 presente em músculo esquelético maduro e Na_v1.5 em músculo embrionário, músculo esquelético denervado e músculo cardíaco. Três isoformas estão expressas no sistema nervoso periférico Na_v1.7, Na_v1.8 e Na_v1.9 (Goldin *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2005).

O canal para Na⁺ de mamíferos pode ser modulado por neurotoxinas de diferentes venenos e peçonhas de origem animal. As NaScTxS de escorpião podem ser classificadas em 2 tipos: as **α NaScTxS** que se ligam ao sítio três (no domínio IV) da subunidade α , retardando a inativação do canal e as **β NaScTxS** que se ligam ao sítio 4 (no domínio II), diminuindo o limiar de excitabilidade para a abertura do canal de sódio (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005; Catterall *et al.*, 2007; Billen *et al.*, 2008) (Figura 3).

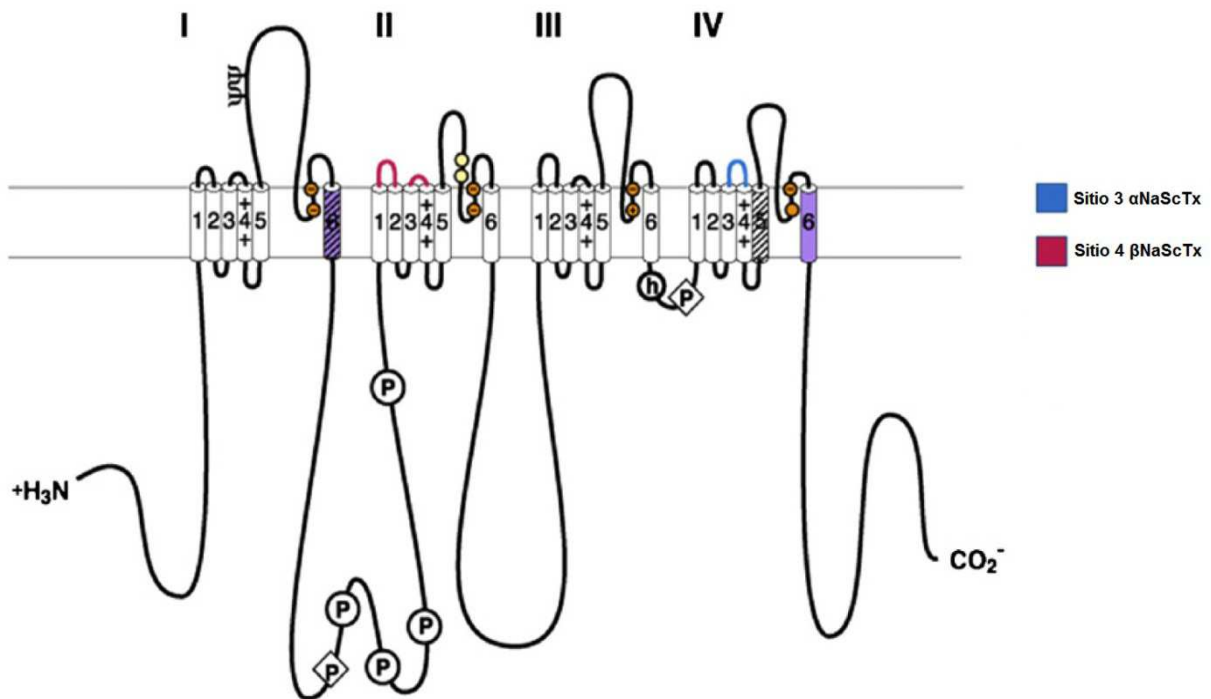


Figura 3. Representação esquemática do arranjo transmembrânico da subunidade α do canal para sódio dependente de voltagem, indicando os sítios de ligação das NaScTxs de escorpião. Fonte Catterall *et al.*, 2007

De acordo com sua característica farmacológica, as α NaScTxs estão classificadas em 3 subgrupos: **α -clássicas** que são muito tóxicas para mamíferos, apresentando uma baixa afinidade pelas membranas neuronais de insetos; **α -toxinas inseticidas** altamente específicas para canais para Na^+ de insetos e que não competem com as α -clássicas e não são tóxicas para mamíferos; **α -like** que atuam em canais para Na^+ de mamíferos e de insetos, e que competem pelo sítio de ligação com as α -toxinas inseticidas, mas não com as α -clássicas (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005; Bosmans e Tytgat, 2007). As α NaScTxs estão presentes principalmente nas espécies de butídeos do Velho Mundo, enquanto as β NaScTxs prevalecem nas espécies do Novo Mundo (Loret e Hammock, 2001). Entretanto, existem exceções, como a peçonha de *Leiurus quinquestriatus* que, embora seja uma espécie típica do Velho Mundo, apresenta β NaScTxs em sua peçonha. Ainda assim, as β NaScTxs de escorpiões do Velho Mundo são estritamente inseto-específicas e não apresentam efeito neurotóxico em mamíferos (Loret e Hammock, 2001; Gurevitz *et al.*, 2007), enquanto que, no caso

de espécies do Novo Mundo, são descritas α NaScTxS nas peçonhas de *Centruroides exilicauda*, *C. sculpturatus*, *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. fasciolatus* e *T. discrepans* (Loret e Hammock, 2001; Kalapothakis *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2003; Cologna *et al.*, 2009; D'Suze *et al.*, 2009).

Na figura 4, é mostrado o alinhamento de algumas α NaScTxS (retirado de Bosmans e Tytgat, 2007). Esses autores ressaltam as principais características estruturais dessa classe de toxinas: como as quatro pontes dissulfeto que dão a estabilidade do peptídeo. O *core-domain* constituído por resíduos que formam o *loop* conector entre a primeira folha β e a α -hélice, e o *NC-domain* contendo os cinco resíduos entre as posições 8 a 12 na região N-terminal e um segmento de resíduos de aminoácidos ocupantes das posições 54-64 na extremidade C-terminal (Karbat *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2007).

As β NaScTxS são formadas por 60-76 resíduos de aminoácidos e estabilizadas por 4 pontes dissulfeto (Catterall *et al.*, 2007). Estão divididas em quatro subgrupos segundo sua afinidade a canais para Na^+ de mamíferos ou de insetos e pelos sintomas causados nos insetos: **Anti-mamíferos ou β NaScTxS clássicas** são altamente tóxicas para mamíferos; **anti-inseto β NaScTxS excitatórias** produzem paralisia espasmódica dos nervos motores em insetos quando os potenciais estão mais negativos; **anti-inseto β NaScTx depressoras** induzem paralisia flácida e uma forte despolarização da membrana axonal; **β NaScTxS β -like** que têm uma alta atividade em canais para Na^+ de mamíferos e de insetos. Com efeitos depressores em larvas, estas toxinas competem com as anti-inseto excitatórias e as anti-inseto depressoras pelos sítios de ligação nos canais para Na^+ inseto-específicos, e também pelo sítio de ligação das β NaScTxS anti-mamífero (Cohen *et al.*, 2005; Rodríguez de la Vega e Possani, 2007; Gordon *et al.*, 2007; Gurevitz *et al.*, 2007).

As β NaScTxS têm duas superfícies ativas, a primeira é o farmacóforo estritamente associado à α -hélice do peptídeo, e a segunda é a região C-terminal e o *loop* conector da estrutura secundária do peptídeo (Gurevitz *et al.*, 2001;2007; Cohen *et al.*, 2005). Na figura 5, é indicado o alinhamento de nove β NaScTxS realizado por Cohen *et al.* (2005).

eficiente na descrição de novas toxinas putativas (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2007), incluindo moléculas atípicas que são dificilmente isoladas pelos métodos convencionais (Ma *et al.*, 2009). A análise transcritômica revela, além de novas toxinas, proteínas que estão envolvidas nos processos celulares da glândula na produção da peçonha, permitindo assim um maior conhecimento sobre a produção de toxinas animais (Quintero-Hernández *et al.*, 2011). É importante salientar que, nos últimos anos, as duas abordagens têm sido utilizadas em conjunto visando conhecer a composição molecular das peçonhas, o que tem levado a um aumento considerável no número de novas toxinas identificadas (Sanz *et al.*, 2008).

1.7. ANÁLISE TRANSCRITÔMICA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE ESCORPIÕES NEOTROPICAIS.

Schwartz *et al* (2007) construíram a biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião mexicano *Hadrurus gertschi* pertencente à família Caraboctonidae, tendo identificado 160 precursores, entre os quais, oito novas toxinas putativas e peptídeos com atividade citolítica.

Da biblioteca de cDNA do escorpião brasileiro *Opisthacanthus cayaporum* (Silva *et al.*, 2009), 36% dos precursores identificados codificam para prováveis toxinas, destacando-se uma sequência similar à escorpina, três peptídeos antimicrobianos, três toxinas putativas de potássio e um peptídeo de 78 resíduos de aminoácidos similar à La1 isolada do escorpião *Liocheles australasiae*.

Pela análise do transcritoma da glândula de peçonha do escorpião venezuelano *Tityus discrepans* foram caracterizadas 14 NaScTxS, 6 KTxS, 1 peptídeo potencializador de bradicinina, uma defensina-like e um peptídeo ácido de função desconhecida (D'Suze *et al.*, 2009).

Borges *et al.* (2006), por avaliação imunológica, comparação proteômica e a construção das bibliotecas de cDNA das glândulas de peçonha dos escorpiões *T. zulianus* e *T. discrepans*, encontraram diferenças estruturais e funcionais nas peçonhas desses escorpiões. Com relação aos dados do cDNA, reportaram 12 precursores de toxinas putativas de canais para Na⁺ (Td1 até Td11) em *T. discrepans* e 2 em *T. zulianus*.(Tz1 e Tz2).

1.8. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE ESCORPIÕES DO GÊNERO *Tityus*

Há três décadas, NaScTxS têm sido isoladas de escorpiões do continente americano, sendo o Brasil o pioneiro nesses estudos, seguido pelo México, Venezuela e Argentina e, nos últimos anos, também pela Colômbia e o Peru.

Uma das peçonhas de escorpiões mais pesquisadas é a de *T. serrulatus*, da qual foram identificadas sete NaScTxS: as β NaScTxS Ts1, tóxica em mamíferos e insetos (Yatani *et al.*, 1988), Ts2, tóxica em mamíferos (Sampaio *et al.*, 1991) e Ts7, tóxica em mamíferos e insetos (Martin-Eauclaire *et al.*, 1992) e as α NaScTxS Ts3, tóxica em mamíferos (Kirsch *et al.*, 1989), Ts5, toxina putativa (Marangoni *et al.*, 1995), Ts6, tóxica em mamíferos (Marangoni *et al.*, 1990) e a TsNTxP, usada em ensaios imunológicos (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1997).

Do escorpião *T. bahiensis*, foram descritas as β NaScTxS Tb1/Tb-gamma e Tb2 (Becerril *et al.*, 1996), tóxicas em mamíferos, TbIT-1, tóxica em insetos e Tb2-II β que afeta mamíferos e insetos (Pimenta *et al.*, 2001a) e as α NaScTxS Tb3, ativa em mamíferos (Becerril *et al.*, 1996) e TbTx5, toxina putativa (Kalapothakis *et al.*, 2001).

T. obscurus, espécie distribuída ao norte do Brasil, tem várias toxinas moduladoras de canais para Na⁺ descritas até o momento. Com relação aos peptídeos, conhece-se a Tc49b com estrutura primária similar às β NaScTxS (Batista *et al.*, 2002), a Tc48b/Tc49a, com atividade similar às α NaScTxS, mas com estrutura de β NaScTx (Murgia *et al.*, 2004) e a Tc48a, com estrutura primária similar às β NaScTxS e ação similar às α NaScTxS (Batista *et al.*, 2004). Pela análise do transcrito da glândula de peçonha de *T. obscurus*, nosso grupo de trabalho descreveu 15 precursores que codificam NaScTxS (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). To1, To2 e To3 são os precursores das já identificadas Tc49b, Tc48a e Tc48b/Tc49a respectivamente. As outras 12 são toxinas putativas novas, sendo que com base na estrutura primária, To6, To7, To9, To10 e To14 são classificadas como α NaScTxS, To4, To5, To8, To12 e To15 são classificadas com β NaScTxS e To11 e To13 são sequências similares a α e β toxinas.

Da peçonha de *T. stigmurus*, foram identificadas três NaScTx: a Tst1/Tst-gamma e Tst2 que são β NaScTx, tóxicas em mamíferos (Becerril *et al.*, 1996) e a Tst3, que é uma α NaScTx (Batista *et al.*, 2007).

Diego-García *et al.* (2005) identificaram duas NaScTx da peçonha do escorpião *T. costatus*, a α NaScTx TcoNTxP1 e a β NaScTx Tco-gamma.

Do escorpião do cerrado brasileiro *T. fasciolatus* é conhecida a Tf4, uma α NaScTx de acordo com a atividade apresentada em preparação de nervo ciático de rã (Wagner *et al.*, 2003).

Outra peçonha amplamente estudada é a do escorpião venezuelano *T. discrepans* da qual já foram descritas 28 NaScTx. TdNa8, TdNa9 e TdNa10 são α NaScTx putativas (D'Suze *et al.*, 2009). TdII-1 até TdII-4 foram descritas como β NaScTx (D'Suze *et al.*, 1996). A ardiscretina, tóxica em artrópodes (D'Suze *et al.*, 2004b), as toxinas putativas Td1 até Td12 (Borges *et al.*, 2006) e as TdNa1, TdNa2, TdNa3, TdNa5, TdNa6 e TdNa 7 (D'Suze *et al.*, 2009) também são β NaScTx. Duas outras toxinas, Bactridin-1 e Bactridin-2, possuem atividade antibiótica e estrutura similar às β NaScTx (Díaz *et al.*, 2009).

Da peçonha do escorpião venezuelano *T. zulianus* há duas β NaScTx descritas: Tz1, tóxica em mamíferos (Borges *et al.*, 2004a), e a toxina putativa Tz2, classificada como β NaScTx por similaridade (Borges *et al.*, 2006).

Com relação à peçonha de *T. pachyrus*, Barona *et al.* (2006), por HPLC e espectrometria de massa, reportaram 104 massas moleculares diferentes e a purificação e determinação da atividade biológica de duas novas toxinas: a Tpa1, bloqueadora de canais para potássio, e uma β NaScTx, a Tpa2 com uma massa molecular de 7.522,5 unidades de massa atômica (u.m.a.), tóxica em mamíferos e que modifica as correntes do íon Na⁺ em células F-11 e TE671.

Estudos de proteômica das peçonhas de escorpiões do gênero *Tityus* têm relatado a ocorrência de, em média, 100 diferentes peptídeos/proteínas em cada espécie (Pimenta *et al.*, 2001b; Batista *et al.*, 2004, 2006, 2007; Diego-García *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2006; Barona *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2006).

A primeira abordagem proteômica aplicada ao estudo das peçonhas de escorpiões foi realizada com a peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* com o

propósito de identificar novos compostos farmacologicamente ativos. A amostra foi previamente fracionada por filtração em gel e as frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF e por LC/ESI-MS, tendo sido identificadas várias toxinas. Aquelas cujas massas moleculares estão compreendidas no intervalo de 6.500-7.500 Da, correspondem às toxinas de cadeia longa, provavelmente moduladoras de canais para Na^+ dependentes de voltagem, enquanto que no intervalo de 2.500-5.000 Da, que correspondem a toxinas de cadeia curta que agem em canais para K^+ (Pimenta *et al.*, 2001b).

Nascimento *et al.* (2006), analisando a peçonha bruta de cinco espécies de escorpiões da família Buthidae, , , encontraram 632 componentes em *Tityus stigmurus*, 383 em *Tityus serrulatus*, 464 em *Tityus bahiensis* *T. bahiensis*, 554 em *Leirus quinquestriatus hebraeus* *L. q. hebraeus* e 380 de *Leirus quinquestriatus quinquestriatus* *L. q. quinquestriatus*.

Batista *et al.* (2006) realizaram o primeiro estudo proteômico com a peçonha do escorpião venezuelano *Tityus discrepans*. Por meio do fracionamento da peçonha bruta por RP-HPLC foram obtidas 58 frações e identificados 205 componentes por meio de análise por nano-ESI/MS e MALDI-TOF/MS. Tal peçonha apresenta componentes cujas massas moleculares estão compreendidas entre 272 e 57.908 u.m.a.

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus stigmurus* foi fracionada por RP-HPLC e as frações cromatográficas analisadas por espectrometria de massa, resultando na identificação de 100 compostos com massas moleculares de 216,5 a 44.800,0 Da. Quatro peptídeos foram caracterizados: Tst-3, uma NaScTx, Tst-17 que tem efeito nos canais para K^+ , Tst β KTx com seqüência idêntica à TsTx-K β e um peptídeo rico em prolina, mas com função desconhecida (Batista *et al.*, 2007).

1.9. PESQUISAS DESENVOLVIDAS COM A PEÇONHA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Tityus* COM DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NA COLÔMBIA.

A análise histopatológica dos efeitos da peçonha do escorpião *T. pachyurus* em camundongos demonstrou alterações compatíveis com transtornos hemodinâmicos resultantes de lesão tissular. Em geral, os danos sistêmicos estão relacionados às alterações na transmissão sináptica, promovendo alterações

miocárdicas secundárias, disfunção do sistema nervoso autônomo, aumento da resistência vascular e aumento da pós-carga, fatos que levam ao paciente a sofrer uma disfunção generalizada que atinge predominantemente os pulmões e o fígado (Rodríguez, 2008).

A peçonha de *T. pachyurus* também foi avaliada quanto a sua toxicidade, as características imunológicas, bem como, sua neutralização por três soros anti-escorpiônicos produzidos na América Latina. A DL₅₀ em camundongos foi determinada como sendo de 4,8 mg/kg e os sinais do envenenamento incluíram sialorréia, dispnéia, sudorese generalizada, ataxia, alterações de comportamento e hiperglicemia. Os soros produzidos no México e no Brasil apresentaram uma dose efetiva de neutralização de 330 e 292 µg de peçonha por mL de soro, respectivamente. O soro anti-escorpiônico produzido na Venezuela não foi capaz de neutralizar a peçonha de *T. pachyurus* (Barona *et al.*, 2004).

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

Até o momento, somente uma NaScTx foi descrita na peçonha de *T. pachyurus*, a Tpa2, classificada como βNaScTx clássica (Barona *et al.*, 2006).

1.10. PESQUISAS RELACIONADAS COM O ESCORPIONISMO NA COLÔMBIA

Na Colômbia, os escorpiões de importância médica pertencem aos gêneros *Centruroides* e *Tityus* (Otero *et al.*, 2004; Flórez, 2007). Embora existam espécies tóxicas em grande parte do território colombiano, os acidentes com escorpiões não são registrados pelos órgãos de saúde e muitas das pessoas envenenadas utilizam tratamentos caseiros, subestimando a gravidade desse tipo de acidente, só recorrendo aos cuidados médicos quando surgem complicações. O tratamento clínico consiste em administrar medicamentos analgésicos e antialérgicos (Rodríguez, 2008).

As histórias clínicas de 25 casos de escorpionismo atendidos no Hospital San Rafael de Girardot, Cundinamarca, Colômbia, foram estudadas por um

período de seis meses no ano de 1994 (Pineda Rivera e Castellanos, 1998) e observou-se que tais acidentes foram mais frequentes durante o período noturno (73%) e em mulheres (56%). As extremidades são as zonas do corpo mais comumente picadas, com 30% atingindo membros superiores e 35% os inferiores. Sua incidência ao longo do ano aparentemente não sofreu variação, diferentemente do observado nos casos de escorpionismo registrados no México, onde tem sido observada uma estreita relação entre os casos de escorpionismo e as estações do ano. Os medicamentos mais utilizados foram os anti-histamínicos (88%), os glicocorticóides (32%) e adrenalina (32%).

Na Colômbia, existem registros de casos graves de envenenamento por escorpiões na região do Valle do Alto Magdalena e no Departamento de Antioquia. O segmento da população com maior risco de envenenamento sistêmico, com complicação e morte, são as crianças menores de 10 anos (Otero *et al.*, 1998). A título de exemplo, foi registrada a morte de uma criança de quatro anos de idade por escorpionismo em Chigorodó (Antioquia), no qual o envenenamento promoveu parada cardio-respiratória (Otero *et al.*, 1998).

É importante mencionar que o escorpionismo foi o segundo acidente mais frequente provocado por animal peçonhento na Colômbia (logo depois dos acidentes ofídicos), no período compreendido entre junho de 2005 e julho de 2010. Neste mesmo intervalo de tempo, foram registrados os óbitos de 5 crianças, dos quais 4 aconteceram no estado de Tolima provocados pelo escorpião *Tityus pachyurus* (Rodríguez, 2006).

Os registros de casos de escorpionismo na Colômbia são bastante deficientes, no entanto é possível constatar que as espécies *T. pachyurus*, *T. asthenes*, *T. fuehrmanni* e *Centruroides gracilis*, encontrados nos estados de Antioquia e Tolima, são as espécies mais envolvidas em acidentes graves envolvendo humanos (Gómez e Otero, 2007).

Na região de Mutatá, no noroeste da Colômbia, os aspectos epidemiológicos, clínicos e toxicológicos do escorpião *T. asthenes* foram analisados com base em entrevistas com a população (Gómez *et al.*, 2010). Dos 80 casos descritos de escorpionismo por essa espécie, somente 14 pessoas (17,5%) se dirigiram ao hospital regional, resultando em uma perda de notificação

de 82,5% dos casos. O envenenamento sistêmico foi mais frequente em crianças, ocorrendo em 67% dos casos. Os efeitos da peçonha em camundongos foram sialorréia, dispnéia, lacrimejamento e ataxia. A DL_{50} determinada foi de 6,1 mg/kg indicando ser um pouco menos tóxica que a peçonha de *T. pachyurus* (4,8 mg/kg). A peçonha de *T. asthenes* apresentou reatividade imunológica aos antivenenos *Alacramyn*[®] do Instituto Bioclón, do México, e ao soro antiaracnídico do Instituto Butantan, do Brasil.

A complexidade geográfica da Colômbia contribui com a riqueza de espécies do gênero *Tityus* e o escorpionismo apresenta uma marcada distribuição altitudinal. Os acidentes causados por *T. asthenes* ocorrem entre o 0-500 m.s.n.m. (metros sobre o nível do mar) nos estados de Antioquia, Cauca, Chocó, Nariño e Valle del Cauca. *T. columbianus* (2200-3000 m.s.n.m.) provoca acidentes nos estados de Boyacá, Cundinamarca e Santander, assim como também em Bogotá, Distrito Capital. Para *T. cf ecuadorensis* (600-1700 m.s.n.m.), há registros nos estados de Cauca, Putumayo e Nariño. *T. forcipula* (1200-2000 m.s.n.m.) causa acidentes nos estados de Cauca, Quindio e Valle del Cauca e *T. fuhrmanni* (1400-1800 m.s.n.m.) somente no estado de Antioquia. Já *T. pachyurus* (400-1500 m.s.n.m.), que possui uma ampla distribuição na Colômbia, é responsável por escorpionismo grave nos estados de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila e Tolima (Rodríguez, 2006; Guerrero-Vargas e Rodríguez, 2011).

2. RELEVÂNCIA DA PESQUISA

Os casos de escorpionismo são observados em todos os países do mundo, com exceção das regiões polares. Na América Latina, são mais frequentes no México, cujos acidentes são causados por espécies do gênero *Centruroides* e, no Brasil, causados principalmente pelas espécies *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. No entanto, também são registrados casos em outras regiões da América Central e do Sul (Chippaux e Goyffon, 2008). Na Colômbia, o escorpionismo é subestimado e, além disto, não se produz soro antiescorpiônico e as publicações sobre os aspectos clínicos, epidemiológicos e toxicológicos do escorpionismo ainda são escassas (Barona *et al.*, 2004; Gómez e Otero, 2007). A picada de escorpião é uma ocorrência frequente na Colômbia e o tratamento médico não é o mais adequado, o que tem ocasionado graves consequências, como a morte de algumas pessoas afetadas, principalmente crianças (Otero *et al.*, 1998; Pineda e Castellanos, 1998; Gómez *et al.*, 2010).

Os estudos envolvendo as espécies de escorpiões do gênero *Tityus* encontradas na Colômbia são ainda incipientes, sendo de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas envolvendo tais espécies e sua peçonha. Até o momento, poucos estudos foram realizados avaliando os efeitos da peçonha e/ou isolando os componentes que a constituem nos escorpiões encontrados na Colômbia, destacando-se as pesquisas feitas por Barona *et al.* (2004;2006) e Rodriguez (2008) com a peçonha do escorpião *Tityus pachyurus*, *T. fuhrmanni* (Gómez *et al.*, 2002) e *T. asthenes* (Gómez *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que os peptídeos de cadeia longa que atuam nos canais para Na^+ dependentes de voltagem (NaScTxS) são os principais responsáveis pelos sintomas neurotóxicos após o envenenamento escorpiônico em mamíferos, e, portanto, é estrategicamente importante o estudo dessas toxinas, devido à sua grande importância médica e ao interesse crescente na caracterização dos seus efeitos farmacológicos .

As toxinas de escorpiões têm sido utilizadas como ferramentas para conhecer a estrutura e a fisiologia dos canais dependentes de voltagem das membranas celulares. Essas toxinas atuam com grande afinidade e

especificidade em canais iônicos e, muitas delas, são capazes de discriminar entre os canais iônicos de vertebrados e invertebrados fornecendo, por exemplo, as toxinas inseto específicas que podem ter aplicação na elaboração de bioinseticidas. Dada a especificidade das neurotoxinas aos canais para Na^+ , essas são empregadas para conhecer melhor as diferentes patologias que afetam a função dos canais Na^+ dependentes de voltagem (Bosmans e Tytgat, 2007) e na busca de novos fármacos (Zeng *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2007; Guerrero-Vargas *et al.*, 2008).

Desta forma, torna-se importante e relevante a identificação de novas toxinas com atividade sobre canais para Na^+ isoladas da peçonha de *T. pachyurus*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar e caracterizar biologicamente NaScTxS da peçonha do escorpião colombiano *T. pachyurus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar NaScTxSS putativas pela construção de uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *T. pachyurus*.
- Construir uma relação filogenética das NaScTx putativas de *T. pachyurus* com outras NaScTx do gênero *Tityus*, depositadas nas bases de dados públicas.
- Fracionar os componentes peptídicos da peçonha de *T. pachyurus*, mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C18.
- Analisar as frações cromatográficas de interesse por espectrometria de massas (MS) e determinar a estrutura primária dos peptídeos por MS/MS.
- Determinar a atividade eletrofisiológica por meio da técnica de *patch-clamp* em canais para Na⁺ das NaScTxS mais abundantes isoladas da peçonha de *T. pachyurus*.
- Avaliar o efeito histopatológico que as NaScTxS identificadas na peçonha do escorpião *T. pachyurus* induzem sobre o pâncreas, pulmão, coração, rim e o fígado de camundongos .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DA PEÇONHA

A peçonha de 20 exemplares adultos de *T pachyurus*, coletados na Colômbia no estado de Cundinamarca nas proximidades do Valle médio do rio Magdalena, foi obtida por estimulação elétrica. A dosagem de proteínas da peçonha total foi realizada segundo o método de Biuret utilizando-se albumina sérica bovina para a confecção da curva de calibração. A peçonha foi posteriormente liofilizada e armazenada a -20°C.

4.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA

4.2.1. Extração do RNA total

Um escorpião selecionado aleatoriamente teve a peçonha extraída 5 dias antes da remoção do télson, como descrito por Silva *et al.* (2009). A biblioteca de cDNA foi construída a partir do RNA total extraído da maceração do télson empregando-se o *kit* SV Total RNA Isolation System Kit (Promega, Madison, WI) segundo as instruções recomendadas pelo fabricante.

O RNA total purificado foi estocado a -70 °C.

4.2.2. Síntese da primeira fita de cDNA

Na construção da biblioteca de cDNA foi utilizado o *kit* CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction (Clontech, USA). Seguindo o protocolo para LD-PCR (Long-Distance PCR) sugerido pelo fabricante.

Brevemente, uma alíquota do RNA total foi incubada com os oligonucleotídeos SMART IV (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3') e CDS III/3' (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30N-1N-3', sendo N = A, G, C ou T; N-1 = A, G ou C), na presença de tampão apropriado, DTT (20 mM) e dNTP (10 mM), que compõem o kit, e a transcriptase reversa SMARTScribeTM MMLV (Clontech, USA), por 1 hora a 42 °C.

4.2.3. Síntese da segunda fita de cDNA

Uma alíquota da primeira fita de cDNA foi usada como modelo para a síntese da segunda fita em uma reação *LD-PCR* na presença do tampão apropriado, dNTP e dos oligonucleotídeos 5' (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') e CDS III/3' (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGCCGACATG-d(T)30N-1N-3', sendo N = A, G, C ou T; N-1 = A, G ou C) e da polimerase *Advantage 2 Polymerase Mix*, todos incluídos no mesmo kit. A reação de *LD-PCR* para a síntese da segunda fita foi realizada sob os seguintes parâmetros do termociclador: 1 ciclo de 95 °C por 1 minuto seguido de 26 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 68 °C por 6 minutos. Uma alíquota do produto da reação foi visualizada em gel de agarose 1% utilizando-se brometo de etídio (0,1 µg/mL) como corante.

A dupla fita de cDNA obtida foi digerida com proteinase K (20 µg/µL), conforme recomendação do fabricante do *kit* (Clontech), antes de ser digerida com a enzima Sfi1 (também conforme recomendação do fabricante do *kit*). Após a digestão, o cDNA precipitado foi ressuscitado no corante cianol xileno (1% em água) e submetido ao fracionamento em coluna *CHROMA SPIN-400* que também faz parte do *kit*. Os produtos do fracionamento foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As frações de interesse foram combinadas e incubadas na presença de acetato de sódio (3M, pH 4,8), glicogênio (20 mg/mL) e etanol 95% gelado, a 20 °C durante a noite. Após desse período a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado durante 10 minutos. Após secagem, foi ressuscitado água deionizada.

4.2.4. Ligação ao vetor *pDNR-LIB*

O vetor de clonagem *pDNR-LIB* tem 4,2 Kb e é próprio do *kit CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction* (figura 6)

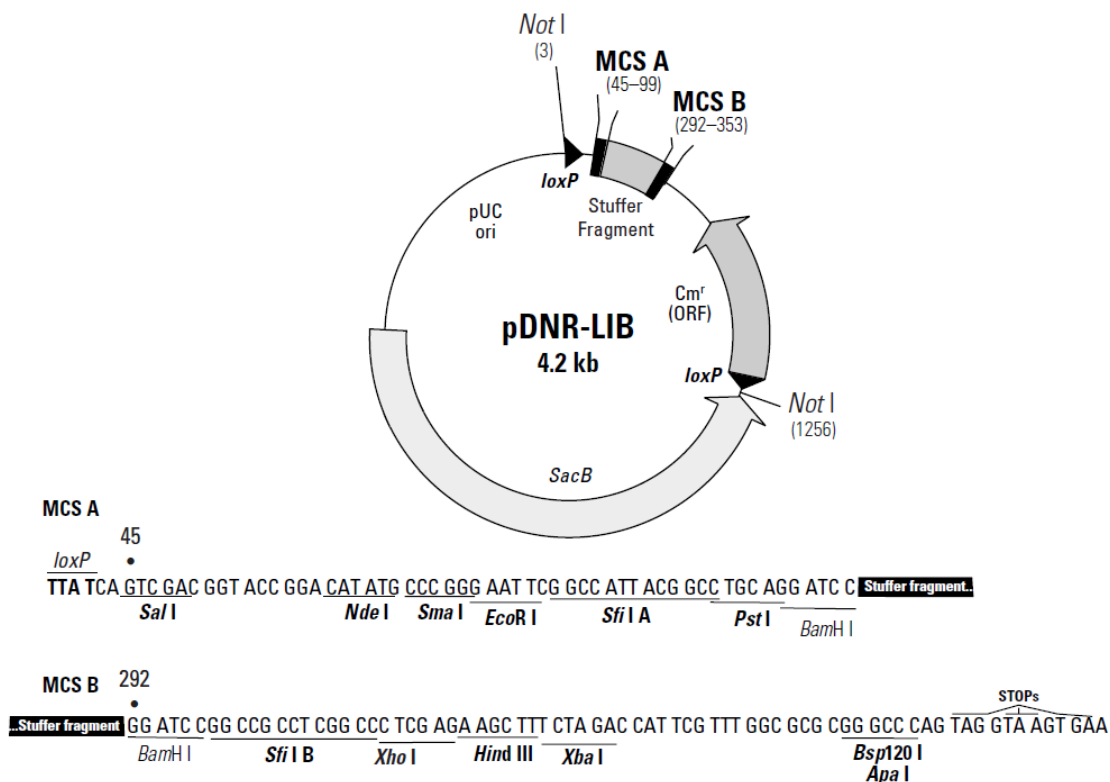


Figura 6. Mapa do vetor de clonagem que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm).

Uma alíquota de 1 μ L do cDNA foi incubada a 16 $^{\circ}$ C durante a noite na presença de 1 μ L do vetor *pDNR-LIB* (0,1 μ g/ μ L), 0,5 μ L do tampão de ligação (10X), 0,5 μ L de ATP (10 mM), 0,5 μ L da enzima ligase T4DNA e 1,5 μ L de água deionizada.

Ao produto da ligação foram acrescentados 95 μ L de água deionizada, 1,5 μ L de glicogênio e 280 μ L de etanol 95% gelado, incubando-se durante 1 hora a -70 $^{\circ}$ C. Após esse período, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 5 μ L de água deionizada e estocado a -20 $^{\circ}$ C.

4.2.5. Transformação bacteriana por eletroporação

Foram realizadas cinco transformações utilizando-se a linhagem *Escherichia coli* DH5 α . O título da biblioteca foi obtido da primeira transformação, enquanto que a porcentagem de recombinação foi obtida dos resultados de todas

as transformações. Na primeira transformação foram utilizados 2 μL da ligação (cDNA + vetor *pDNR-LIB*), enquanto que nas demais foi utilizado 1 μL da ligação. Em uma cubeta de eletroporação, foram misturados 50 μL das células eletrocompetentes e 2 ou 1 μL da reação da ligação. Após um pulso elétrico de 25 μF (2500V), 1 mL de meio SOC foi adicionado às células. O meio foi transferido a um tubo de ensaio estéril e mantido a 37 °C por 1 hora. Após esse período, as bactérias transformadas foram distribuídas em placas de meio de cultura LB ágar contendo cloranfenicol (0,03 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas.

4.2.6. PCR de colônia

As colônias bacterianas transformadas obtidas foram submetidas a PCR de colônia utilizando-se os iniciadores universais T7 (5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3') e M13 (5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-3'). As condições no termociclador para a reação foram: 1 ciclo de 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 55 °C por 40 segundos e 72 °C por 40 segundos e 1 ciclo de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As colônias que apresentaram insertos ≥ 400 pb foram cultivadas em meio líquido LB com cloranfenicol (0,03 mg/mL) por 12h, a 37 °C, sob agitação constante.

4.2.7. Purificação de plasmídeos

As colônias de interesse foram submetidas ao processo de lise alcalina seguindo o protocolo de Sambrook e Russell (2001). Os plasmídeos purificados foram ressuspensos em 100 μL de água tetradestilada contendo 1 μL RNase (4 mg/mL), incubando-se a 37 °C durante 10 minutos e, posteriormente, foram armazenados a -20 °C.

4.2.8. Sequenciamento automático de DNA

O sequenciamento foi realizado em sequenciador de DNA da Applied Biosystems Modelo 3100 (Foster city/CA) seguindo as instruções do fabricante. Usou-se o iniciador T7 (5 pM) e, para as sequências incompletas, o sequenciamento com o iniciador M13 reverso também foi realizado.

4.2.9. Análise bioinformática das sequências nucleotídicas.

Para obter as sequências de boa qualidade, os eletroferogramas obtidos foram submetidos ao algoritmo Phred, utilizando-se a pontuação de ≥ 20 , o que significa que existe 1 tentativa em 100 de encontrar uma base incorreta (Lazo *et al.*, 2001). Em seguida, as sequências de boa qualidade foram submetidas ao CrossMatch para remover as sequências de DNA do vetor. Para identificar as sequências contíguas (*contig*) e os singletos (*singlets*), as sequências foram analisadas no programa CAP3 (Huang, 1999). Todas essas análises bioinformáticas foram processadas simultaneamente no endereço eletrônico <http://www.biomol.unb.br/>.

Todas as sequências de cDNA da glândula da peçonha de *T. pachyurus* foram submetidas aos programas de busca de similaridade usando banco de dados não redundantes de proteínas por meio dos algoritmos *blastx* e *blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) considerando-se valores de expectância (*e-value*) $< 10^{-5}$ para identificação da função putativa dos precursores.

Todas as sequências foram traduzidas utilizando-se o programa BioEdit (Hall, 1999) com a identificação das regiões ORFs (*Open Reading Frame*) que marcam o início da tradução com o códon ATG (Metionina) e os códons de parada TAA, TAG ou TGA. As sequências traduzidas foram submetidas ao *SignalP 3.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), para identificar a região do peptídeo sinal, e a massa molecular teórica dos peptídeos maduros foi calculada usando o serviço *online PeptideMass* (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>). Todas as sequências nucleotídicas que codificam paras as NaScTxS obtidas neste trabalho foram depositadas no *EMBL Nucleotide Sequence Database* sob os números HE585239 até HE585243.

4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA.

A análise filogenética das sequências peptídicas obtidas no presente trabalho e das demais NaScTxS descritas para escorpiões do gênero *Tityus* foi feita usando o método de Máxima Parcimônia reamostrada por *Bootstrap* e complementada pelo algoritmo *Close-Neighbor-Interchange*.

A Máxima Parcimônia (MP) é um método cladístico que busca a relação filogenética que envolve o menor número de mudanças evolutivas (eventos de mutação) para explicar as diferenças entre as sequências analisadas, usando cada posição do alinhamento como informação evolutiva na construção da árvore filogenética (Felsenstein, 1985). O algoritmo *Close-Neighbor-Interchange* é um método heurístico de inferência de topologia, que constrói a árvore após dos resultados de Máxima Parcimônia, a partir de 100 ou mais árvores randômicas (Nei e Kumar, 2000), e o *Bootstrap* é um teste estatístico utilizado para medir o grau de suporte ou robustez dos nós nas árvores filogenéticas pelo alinhamento das sequências. O valor máximo de cada nó é 100, dessa forma, se o valor de um nó é 60, significa que o mesmo agrupamento ou ramo da árvore está repetido 60 vezes em 100 reamostragens (Felsenstein, 1985).

As NaScTxS preditas para o escorpião *T. pachyurus* foram comparadas a outras toxinas de sódio identificadas em escorpiões do gênero *Tityus* disponíveis na base de dados *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>). A toxina AaHIT4, previamente identificada e caracterizada por Loret *et al.*, (1991), foi selecionada como grupo externo (*outgroup*).

Todas as toxinas foram alinhadas usando o programa *CLUSTAL_X 1.83* (Thompson *et al.*, 1997), esses resultados foram posteriormente usados na construção da árvore filogenética. Na matriz de sequências, todos os dados faltantes e os *gaps* foram eliminados. A análise envolvendo 66 sequências de aminoácidos foi realizada com o método de Máxima Parcimônia com 500 *Bootstrap* de replicações (Felsenstein, 1985) e o algoritmo *Close-Neighbor-Interchange* (Nei e Kumar, 2000). A reconstrução da árvore filogenética foi feita por meio do *software MEGA 5* (Tamura *et al.*, 2011).

4.4. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA DO ESCORPIÃO *T. pachyurus*

Um miligrama da peçonha seca foi dissolvido em 250 μ L de TFA 0,12% (v/v) em água Milli-Q e submetido à centrifugação por 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna analítica de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm, *Phenomenex, USA*) previamente equilibrada em TFA 0,12% (v/v) em água Milli-Q (solução A), com fluxo de 1 mL/min e detecção a 230 nm. A eluição e fracionamento das moléculas da peçonha foi realizada aplicando-se um gradiente linear de solução A (TFA 0,12% (v/v) em água Milli-Q) a 60% da solução B (TFA 0,10 % (v/v) em acetonitrila). Todas as frações foram coletadas individualmente, secadas sob vácuo e armazenadas a -20°C.

As frações de maior interesse foram posteriormente recromatografadas usando-se a mesma coluna, às mesmas soluções A e B, sob condições otimizadas quanto ao gradiente linear da solução B. A elaboração dos novos gradientes baseou-se na eluição da fração com relação à porcentagem do solvente B. Todos os processos cromatográficos foram realizados em um equipamento *Shimadzu 20A HPLC* modular com detector *SPDA20* e os dados foram gerados e analisados no *software Shimadzu LC-Solutions* próprio do equipamento.

Na cromatografia da peçonha total a detecção foi a 230 nm com o propósito de comparar o perfil cromatográfico obtido para a peçonha de *T. pachyurus* por Barona *et al.* (2006), e as recromatografias foram feitas com detecção a 216 nm uma vez que não houve necessidade de comparação.

4.5. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQUÊNCIAMENTO *de novo*

A inspeção da pureza e das massas moleculares das frações de interesse foram determinadas por espectrometria de massa usando dois tipos diferentes de ionização, a primeira foi a ionização a laser assistida por matriz, em um sistema *MALDI-TOF/TOF (MS)*. As frações ressuspensas em água foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de *MALDI-TOF* do tipo Anchorchip (600 mm) e cristalizadas a

temperatura ambiente. As análises foram conduzidas em um espectrômetro de massa *MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha)* operando no modo linear positivo e refletido positivo, utilizando-se calibração externa. Para o modo linear usou-se o padrão de proteínas *Bruker* número 5 constituído da mistura de insulina, ubiquitina, citocromo C, mioglobina, citocromo C $[M+2H]^+$ e mioglobina $[M+2H]^+$. A mistura *Bruker* número 4, contendo os peptídeos bradicinina, angiotensinas I e II, substância P, bombesina, substrato renina e ACTH (1-17), foi utilizada para a calibração no modo refletido. Os dados MS obtidos foram controlados e analisados usando os *software FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha)*

Para conhecer a massa exata dos peptídeos, esses foram analisados em um equipamento de ionização por *electrospray (ESI)*. As amostras foram ressuspendidas em uma solução de acetonitrila (50%) contendo ácido fórmico (0,1%). Os espectros foram adquiridos com uma seleção de íons positivos, com um ajuste da voltagem do capilar a 4,5 KV e a detecção dos espectros foi realizada na faixa de massa 300- 3.000 Da, em uma estrita relação massa/carga (m/z). Utilizou-se um equipamento *ESI-Qq-TOF micrOTOF-QII (Bruker Daltonics, Alemanha)* e os dados foram adquiridos com o programa *Compass*.

As sequências de aminoácidos dos peptídeos purificados foram determinadas por espectrometria de massa em *tandem*, também conhecida como *MS/MS*. Os peptídeos de interesse foram ressuspendidos em água Milli-Q e diluídos na matriz redutora 1,5-diaminonaftaleno (Demeure *et al.*, 2010) dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5; v/v/v), na proporção 3:1 (matriz:amostra), aplicadas na placa de *MALDI-TOF* do tipo Anchorchip (600 mm) e cristalizadas a temperatura ambiente. Como calibrante externo empregou-se albumina bovina sérica. Os dados foram adquiridos sob o método *In-Source Decay (ISD)* usando-se o programa *FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha)*.

Também para a determinação da sequência primária, o peptídeo Tpa9 foi submetido a um tratamento enzimático com tripsina imobilizada (*Pierce Chemical, USA*), segundo as instruções do fabricante. Oitenta μg do peptídeo foram ressuspendidos em 60 μL de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) (0,1 M, pH 8), e incubados na presença da enzima, a 37 °C por 3 horas, sob agitação constante. A

reação foi monitorada a cada hora tomando-se alíquotas de 1µL e analisando-se por MALDI-TOF, conforme metodologia já apresentada.

As sequências dos fragmentos gerados na digestão enzimática foram determinadas por *MS/MS* em um equipamento *MALDI-TOF/TOF Autoflex speed* (*Bruker Daltonics*, Alemanha). O modo *MS/MS* identificou os íons parentais os quais foram fragmentados na célula *LIFT* do equipamento com uma aceleração de 19kV. Usou-se o método *LIFT-RP* e a calibração foi realizada com a mistura *Bruker* número 4 citada anteriormente. Os dados e as análises foram adquiridas com os programas *FlexControl 3.0* e *FlexAnalysis 3.0*.

As sequências obtidas foram submetidas à busca por similaridade por meio da ferramenta *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os alinhamentos foram feitos com o programa *CLUSTAL_X 1.83* (Thompson *et al.*, 1997).

4.6. AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

Células HEK (de rim embrionário humano) expressando canais humanos para sódio hNav1.x (1-6) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado com 4,5% de glicose, 10% de soro fetal bovino, antibiótico Gentamicina (400 µg/mL) (*Gibco BRL Life Technologies, Inc.*). As células foram incubadas em uma atmosfera umidecida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Solução extracelular padrão continha (em mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 D-glicose, a pH 7,40. Solução intracelular padrão continha (em mM): 130 aspartato de potássio, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA-KOH, 10 HEPES, em pH 7,30. Os peptídeos foram dissolvidos nas soluções extracelulares a partir de uma solução estoque em água. As Correntes foram induzidas por pulsos (200 ms) de -120 mV a -10 mV precedidos por um pré-pulso de 5 ms a 50 mV, seguido de uma despolarização (50 ms) a -10 mV. O potencial de manutenção foi de -120 mV e a resistência da pipeta foi de 1-3 MOhm Os dados foram adquiridos *on-line* por meio do amplificador 700B MultiClamp juntamente com Digidata 1440A e o *software* pClamp10 (*Molecular Device, EUA*). Os *software* Origin7 (*OriginLab Corporation, EUA*) e Clampfit10 (*Dispositivo Molecular, EUA*) eram rotineiramente utilizados durante a análise *off-line*.

4.7. DETERMINAÇÃO DO EFEITO HISTOPATOLÓGICO DE QUATRO PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *T. pachyurus* E QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NOS CANAIS PARA SÓDIO

Quatro NaScTxS identificadas na peçonha de *T. pachyurus*, sendo 3 delas novas e a Tpa2 previamente identificada por Barona *et al.* (2006), foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e injetadas pela via intraperitoneal em camundongos (n=5). Um grupo controle (n=4) recebeu solução salina. Todos os sintomas apresentados pelos camundongos foram registrados durante 6 h. Pelo registro desses sintomas foi determinado o tipo de escorpionismo em Classe I e Classe II, adotando a nova classificação desta doença proposta por Khattabi *et al.*, (2011), e o registro dos sintomas foi padronizado segundo a tabela 1.

Após 6 horas, os camundongos foram eutanasiados por meio de injeção de tiopental. Coração, fígado, pâncreas pulmões e rins foram retirados e imediatamente fixados em formaldeído (4%) por um período de tempo não inferior a 48 horas. Após desse período, os órgãos foram cortados em pedaços menores para acondicioná-los nas cápsulas histológicas. Os procedimentos de desidratação, diafanização e impregnação foram realizados em um processador automático digital LUPE[®] de 12 cubas, modelo PT05 (São Carlos/SP, Brasil). A desidratação foi realizada em etanol de 50 a 99,8%, a cada 10%, por 1 hora cada à temperatura ambiente.

A diafanização foi feita em xilol absoluto por 1 hora. Após esse período, os tecidos foram imersos em parafina a 60°C durante 1 hora (impregnação). Os tecidos impregnados foram incluídos individualmente em blocos de parafina a 60°C que, posteriormente, foram esfriados a 4 °C por 15 minutos.

O material foi cortado a 4 µm com um micrótomo *Spencer*[®] modelo 820. Os cortes foram colocados em água a 60°C para eliminar a parafina e colocados nas lâminas de vidro (26 x 76 x 1 mm) e incubados em estufa a 60°C por 10 minutos para garantir a aderência do tecido na lâmina.

Tabela 1. Padronização dos registros dos sintomas apresentados pelos camundongos após da aplicação das toxinas isoladas do escorpião *T. pachyurus*.

Tipo de escorpionimo	Sintomas	Observação no camundongo
Classe I	Dor	Quando os camundongos se lambiam por longo tempo e constantemente no local da injeção
	Prurido	Quando foi observada coceira constante no local da injeção
	Agitação	Aumento excessivo dos movimentos dos camundongos
	Ataxia	Perda do equilíbrio dos camundongos
	Câimbra	Foi registrado quando os camundongos esticavam fortemente as patas traseiras
	Diarreia	Defecação constante e líquida
	Dispneia	Dificuldade dos camundongos ao respirar
	Hipotermia	O sintoma foi considerado quando os camundongos apresentavam tremores
Classe II	Lacrimejamento	Quando foi observada a produção excessiva de lágrimas
	Midríase	Inflamação dos olhos e da pupila
	Mioclonia	Quando foram observadas nos camundongos contrações musculares involuntárias
	Priapismo	Ereção constante do pênis
	Retenção urinária	Foi observado ao longo do experimento que os camundongos não urinavam, e na dissecação observou-se a bexiga cheia
	Rinorréia	Quando foi observado fluxo excessivo de líquido pelo focinho do camundongo
	Sialorréia	Quando foi observada excessiva salivação nos camundongos

Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e, posteriormente, desidratados em etanol absoluto e diafanizados em xilol absoluto, sendo então cobertos por lamínulas (24 x 32 mm) coladas na lâmina com uma solução de *Entellan*.

Os cortes foram avaliados por microscopia de luz. As alterações histopatológicas foram determinadas por meio da qualificação arbitrária (tecido normal, tecido com mínima alteração +, tecido com alteração mediana ++ e tecido com maior alteração +++), ao se comparar os tecidos dos grupos controle com os tecidos dos grupos experimentais.

5. RESULTADOS

5.1. BIBLIOTECA DE cDNA

O título da biblioteca de cDNA não amplificada, da glândula de peçonha do escorpião *T. pachyurus* foi $1,4 \times 10^4$ cfu/mL (unidades formadoras de colônias por mL) com 95% de clones recombinantes. A análise de 135 sequências, resultou em cinco sequências nucleotídicas (3 *contigs* e 2 *singlets*) precursoras de peptídeos da família das NaScTxS.

Essas sequências possuem, em média, 254 nucleotídeos (variando de 243 a 266 nucleotídeos). Esses transcritos codificam para uma sequência de peptídeo sinal de, em média, 20 resíduos de aminoácidos, e uma sequência de peptídeo maduro que inclui oito resíduos de cisteínas, que permitem a formação de quatro pontes dissulfeto, uma característica conservada das NaScTxS. O alinhamento múltiplo das sequências dos precursores que codificam para NaScTxS, juntamente com a toxina Tpa2 previamente reportada por Barona *et al.* (2006), é mostrado na Figura 7. As sequências completas desses precursores foram depositadas no *EMBL Nucleotide Sequence Database* como indicado em Material e Métodos.

5.1.1. Toxinas putativas para Na⁺ de *T. pachyurus*

As cinco sequências das NaScTxS putativas obtidas da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha *T. pachyurus*, foram chamadas de Tpa4, Tpa5, Tpa6, Tpa7 e Tpa8 (Fig. 7). Esses nomes vernáculos são resultado da abreviação do gênero em letra maiúscula (T), seguida as duas primeiras letras, em minúsculo, do epíteto específico ou espécie (pa), e do número que indica a ordem cronológica de descrição da toxina, como sugerido por Becerril *et al.* (1996).

A toxina putativa Tpa4 pode ser classificada como uma α NaScTx, por apresentar 82% de identidade com a α NaScTx TbTx5 do escorpião *T. bahiensis* (UniProtKB POC5K8) e 81% com a α NaScTx clássica Ts3 (UniProtKB PO1496) do escorpião *T. serrulatus*. A putativa Tpa4 tem massa molecular teórica média de 7.405,0 Da. e está constituída por 64 resíduos de aminoácidos com oito cisteínas, e possível sítio de clivagem enzimática no C-terminal, com retirada do tripeptídeo

GKK e amidação da prolina, conforme já demonstrado para várias NaScTxS (Becerril *et al.*, 1997).

Com base na estrutura primária, as toxinas putativas Tpa5 e Tpa6 podem ser classificadas como α NaScTxS. Possuem 66 resíduos de aminoácidos, massas moleculares teóricas médias de 7.342,4 e 7.294,3 Da, respectivamente, e oito resíduos de cisteínas cada. Essas duas NaScTx putativas compartilham identidade com duas toxinas do escorpião *T. discrepans*: 67% com a α NaScTx Na9 (UniProtKB C9X4K7) e 66% com a α NaScTx Na10 (UniProtKB C9X4K8).

A toxina putativa Tpa7 tem uma estrutura primária de 62 resíduos de aminoácidos, massa molecular teórica média de 6.985,0 Da e oito resíduos de cisteínas. Com base na estrutura primária pode ser classificada como uma β NaScTx. Essa toxina apresenta 78% de identidade com a β NaScTx Tz2 (UniProtKB Q1I165) do escorpião *T. zulianus* e 78% com a β NaScTx Na6 (UniProtKB C9X4K4) de *T. discrepans*.

A toxina putativa Tpa8 está constituída por 79 resíduos de aminoácidos, sendo oito resíduos de cisteínas, e possui massa molecular teórica média de 8.481,2 Da. Apresenta 43% de identidade com a β NaScTx anti-inseto excitatória LqhlT1b (UniProtKB P68722) do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Desta forma, a putativa Tpa8 converte-se no primeiro registro de uma β NaScTx anti-inseto excitatória em escorpiões buthideos do novo mundo (Figura 8). Quando comparada às β NaScTxS anti-inseto excitatórias de escorpiões buthideos do velho mundo, observa-se que a Tpa8 apresenta uma importante característica estrutural que consiste do deslocamento da quarta ponte dissulfeto, conferindo às toxinas dessa classe um estrutura secundária $\beta\alpha\beta\beta\alpha$, conforme proposto por Cohen *et al.* (2005).

5.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Todas as NaScTxs completas identificadas em escorpiões do gênero *Tityus* (65 descritas até vv/vv/2011 e as descritas no presente trabalho: Tpa4, Tpa5, Tpa6, Tpa7 e Tpa8), incluindo aquelas descritas como proteínas e as putativas, foram usadas na construção da análise filogenética molecular usando o método de Máxima Parcimônia, cujo resultado está indicado na figura 9. A árvore consenso inferida a partir de 500 réplicas foi tomada para representar a história evolutiva dos táxons analisados, a topologia da árvore de MP foi obtida usando o algoritmo *Close-Neighbor-Interchange*

A figura 9 mostra a árvore filogenética enraizada consenso que apresenta 14 ramos ou agrupamentos, os quais correspondem às 14 subfamílias (NaTx1 a NaTx14) propostas por Guerrero-Vargas *et al.* (2012). Observando a árvore de baixo para cima, pode-se ver que no primeiro ramo estão agrupadas a toxina putativa Tpa7 de *T. pachyurus*, a To15 (NCBI HE585238.1) de *T. obscurus*, Tz2 (UniProtKB Q11165) de *T. zulianus* e a Na6 (UniProtKBC9X4K4) de *T. discrepans*, todas com características estruturais de β NaScTxs. Além disso, as quatro espécies de escorpiões do gênero *Tityus* às quais pertencem essas toxinas estão distribuídas ao Norte do rio Amazonas.

No terceiro agrupamento, ainda de baixo para cima, ficaram incluídas as toxinas Tpa4 de *T. pachyurus*, To9 (NCBI HE585232.1), To10 (NCBI HE58523.1) e To14 (NCBI HE585237.1) de *T. obscurus*, Na8 (UniProtKB C9X4K6) de *T. discrepans*, espécies com distribuição ao Norte do rio Amazonas. As outras cinco toxinas desse ramo, Ts3 (UniProtKB P01496) e Ts5 (UniProtKB P46115) de *T. serrulatus*, Tst3 (UniProtKB P0C8X5) de *T. stigmurus*, Tb3 (UniProtKB P56608) e TbTx5 (UniProtKB P0C5K8) de *T. bahiensis*, são de espécies distribuídas ao Sul do bacia do rio Amazonas. Todas as sequências incluídas nesse terceiro agrupamento têm características estruturais de α NaScTxs.

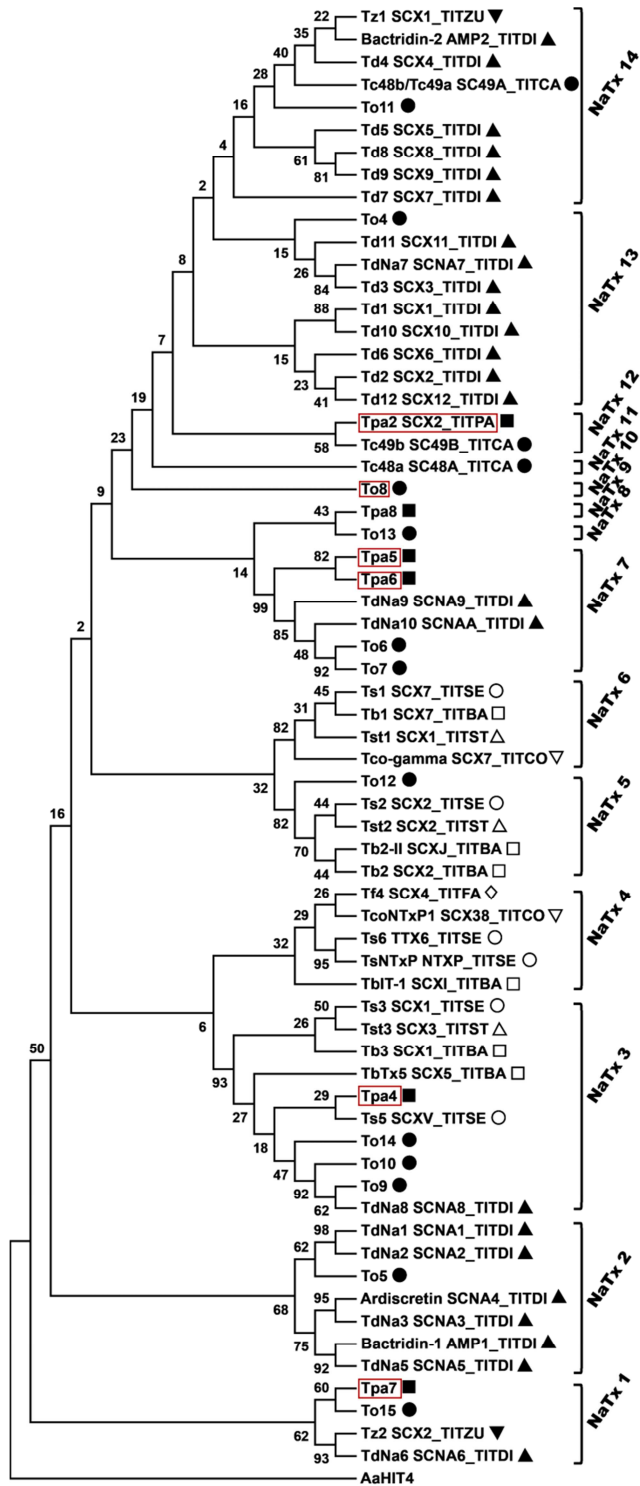


Figura 9. Análise filogenética das putativas NaScTx do escorpião *T. pachyurus* com outras NaScTx de escorpiões do gênero *Tityus*. As toxinas putativas de *T. pachyurus* estão indicadas no quadrado vermelho, assim como também a previamente descrita Tpa2. Os símbolos em preto indicam toxinas de escorpiões com distribuição geográfica ao norte da bacia Amazônica, quadrado para *T. pachyurus*, círculo para *T. obscurus*, triângulo para *T. discrepans*, triângulo invertido para *T. zulianu*. Os símbolos transparentes indicam toxinas de escorpiões com distribuição geográfica ao sul da bacia Amazônica, quadrado para *T. bahiensis*, círculo para *T. serrulatus*, triângulo para *T. stigmurus*, triângulo invertido para *T. costatus* e rombo para *T. fasciolatus*.

As toxinas putativas Tpa5 e Tpa6 de *T. pachyurus* ficaram agrupadas no sétimo ramo da árvore junto às To6 (NCBI HE585229.1) e To7 (NCBI HE585230.1) de *T. obscurus*, Na9 (UniProtKB C9X4K7) e Na10 (C9X4K8) de *T. discrepans*. Todas essas sequências têm características estruturais de α NaScTxs e pertencem a escorpiões do gênero *Tityus* com distribuição geográfica ao Norte da bacia do rio Amazonas.

A toxina putativa Tpa8 forma um único ramo, o nono dessa análise filogenética, isto pode ser explicado em virtude de sua possível estrutura secundária $\beta\alpha\beta\beta\alpha$. A toxina Tpa2 de *T. pachyurus*, previamente identificada por Barona *et al.* (2006), foi incluída na presente análise filogenética e ficou agrupada no décimo segundo agrupamento junto à toxina Tc49b (UniProtKB BP60214) de *T. obscurus*. Essas duas espécies de escorpiões estão distribuídas ao Norte do rio Amazonas e são β NaScTxs.

A árvore filogenética das NaScTxs de escorpiões do gênero *Tityus* sugere que a separação geográfica dessas espécies de escorpiões na América do Sul, causada pela bacia do rio Amazonas, levou a uma variação estrutural desses peptídeos (NaScTxs) e, conseqüentemente, com prováveis alterações em suas funções.

5.3. FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DO ESCORPIÃO *T. pachyurus* POR RP-HPLC

O fracionamento da peçonha bruta de *T. pachyurus* por RP-HPLC resultou na obtenção de 55 frações como indicado na Figura 5. A escolha das frações de interesse foi baseada no trabalho desenvolvido por Barona *et al.* (2006). Três frações eluídas entre 36-38% de acetonitrila e chamadas de Tpa 36,40, Tpa 36,90 e Tpa 37,92 (figura 10) foram selecionadas e submetidas a novas etapas de purificação por RP-HPLC.

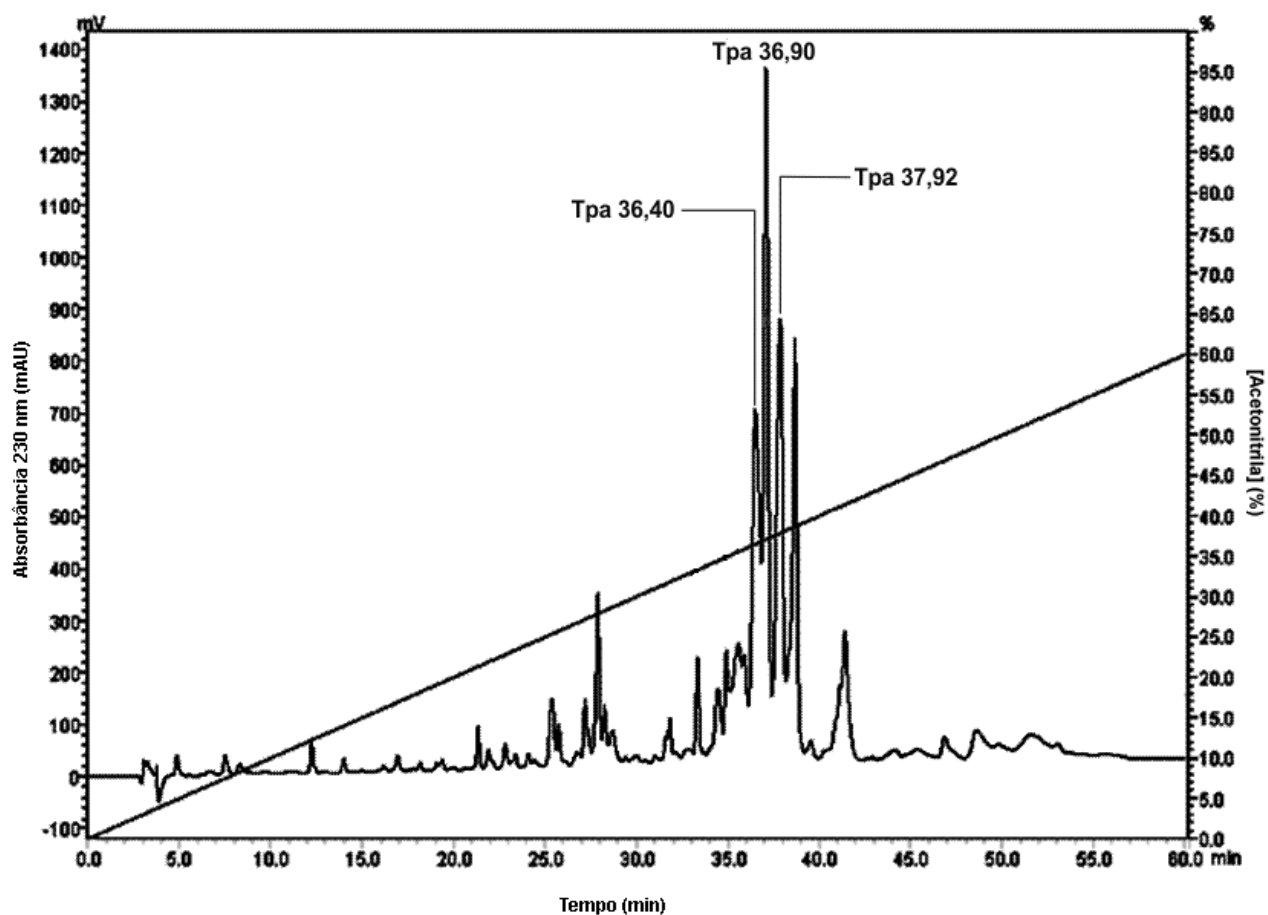


Figura 10. Perfil cromatográfico da peçonha de *T. pachyurus* em coluna de fase reversa C18. Aliquotas de 1 mg da peçonha foram dissolvidas em água com 0,12% de TFA (v/v) (tampão A) e aplicadas em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm) previamente equilibrada com água com 0,12% de TFA (v/v). As frações foram eluídas sob um gradiente linear de acetonitrila com 0,1% de TFA (v/v) (tampão B) com um fluxo constante de 1 mL/min e monitoramento a 230 nm.

5.4. RECROMATOGRAFIA, ANÁLISE DE MASSA E SEQUENCIAMENTO *de novo* DAS FRAÇÕES DE INTERESSE

5.4.1 Fração Tpa 36,40

5.4.1.1. Recromatografia e análise de massa da fração Tpa 36,40-33,38

A fração Tpa 36,40 foi submetida a uma etapa de recromatografia empregando-se coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm) e um gradiente linear de 15% a 45% do solvente B, em 60 minutos. Cinco frações foram obtidas, sendo a fração Tpa 36,40-33,38 a mais abundante (figura 11). Essa fração foi submetida a uma segunda recromatografia em gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos, resultando em uma fração predominante, indicada na figura 12a como Tpa 36,40-33,38-33,37, e que passará a ser denominada no presente trabalho por Tpa9, indicando que é a nona toxina descrita na peçonha do escorpião *T. pachyurus*.

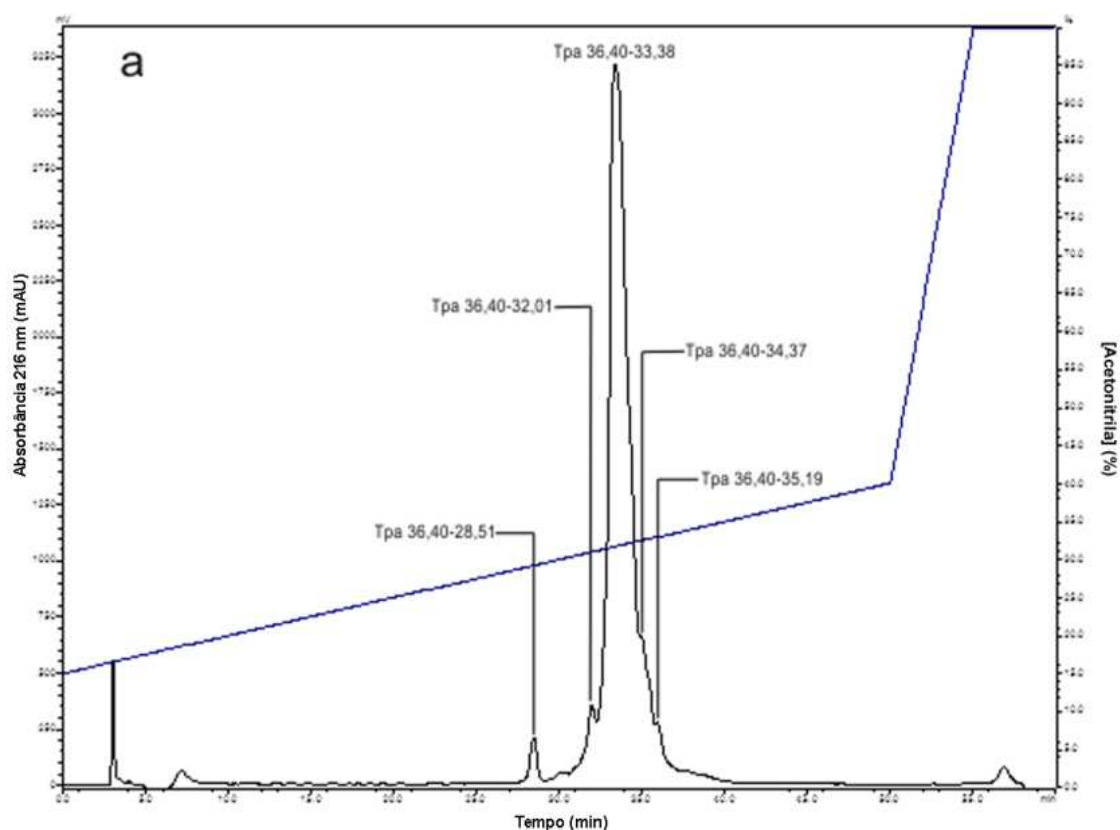


Figura 11. Perfil cromatográfico da fração Tpa 36,40. A fração Tpa 36,40 foi recromatografada em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), em gradiente linear de 15% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216 nm

A pureza da fração Tpa9 foi conferida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF* em modo linear, e observa-se três valores de massa, onde 2.355,723 Da é a carga tripla, 3.530,963 Da é a carga dupla e 7.072,842 Da carga única (figura 12b). A massa molecular exata foi determinada por meio de espectrômetro de massa com ionização por *electrospray* (ESI) em um sistema híbrido de detecção que usa um quadrupólo e o tempo de voo, *ESI-Qq-TOF micrOTOF-QII* (*Bruker Daltonics*, Alemanha). A massa molecular monoisotópica da Tpa9 é 7.061,87 Da.

5.4.1.2. Sequenciamento *de novo* da Tpa9

A sequência parcial da Tpa9 foi determinada por espectrometria de massa, usando-se dois métodos diferentes. Pelo método de *ISD*, conforme descrito em “Material e Métodos”, a sequência parcial de 26 resíduos de aminoácidos obtida foi NGCKSGCFFGTNSWCNTECKQESAKE (Figura 13). Como é característico do método *ISD*, gerou-se, para a Tpa9, íons na série c, que orientam o sequenciamento do N-terminal ao C-terminal.

A Tpa9 foi submetida a uma clivagem enzimática com tripsina, resultando em quatro fragmentos que foram submetidos à redução com DTT e posteriormente fragmentados por espectrometria de massa do tipo *MALDI-TOF-TOF* usando o método *LIFT*. As sequências obtidas podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2. Fragmentos peptídicos da Tpa9 após a clivagem com a enzima tripsina. As sequências de cada fragmento foram obtidas pelo método *LIFT* usando um equipamento de tipo *MALDI-TOF/TOF* em modo refletido. A massa molecular teórica foi calculada *on-line* utilizando a ferramenta *PeptideMass* (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

Posição do fragmento na cadeia primária	Sequência	[M+H] ⁺ Experimental	[M+H] ⁺ Calculada
1-14	KNEGYPLNSSDCGK	1511,85	1511,67
15-30	SGCFFGTNSWCNTECK	1783,97	1783,69
37-54	GYCAWPSCYCYGFTDDSK	2065,78	2065,77
55-59	MWNAK	649,62	649,31

A sequência parcial da Tpa9 obtida pelos dois métodos e pelas análises de similaridade com outras sequências, após de rodar o algoritmo *blastp* está apresentada na Figura 14.

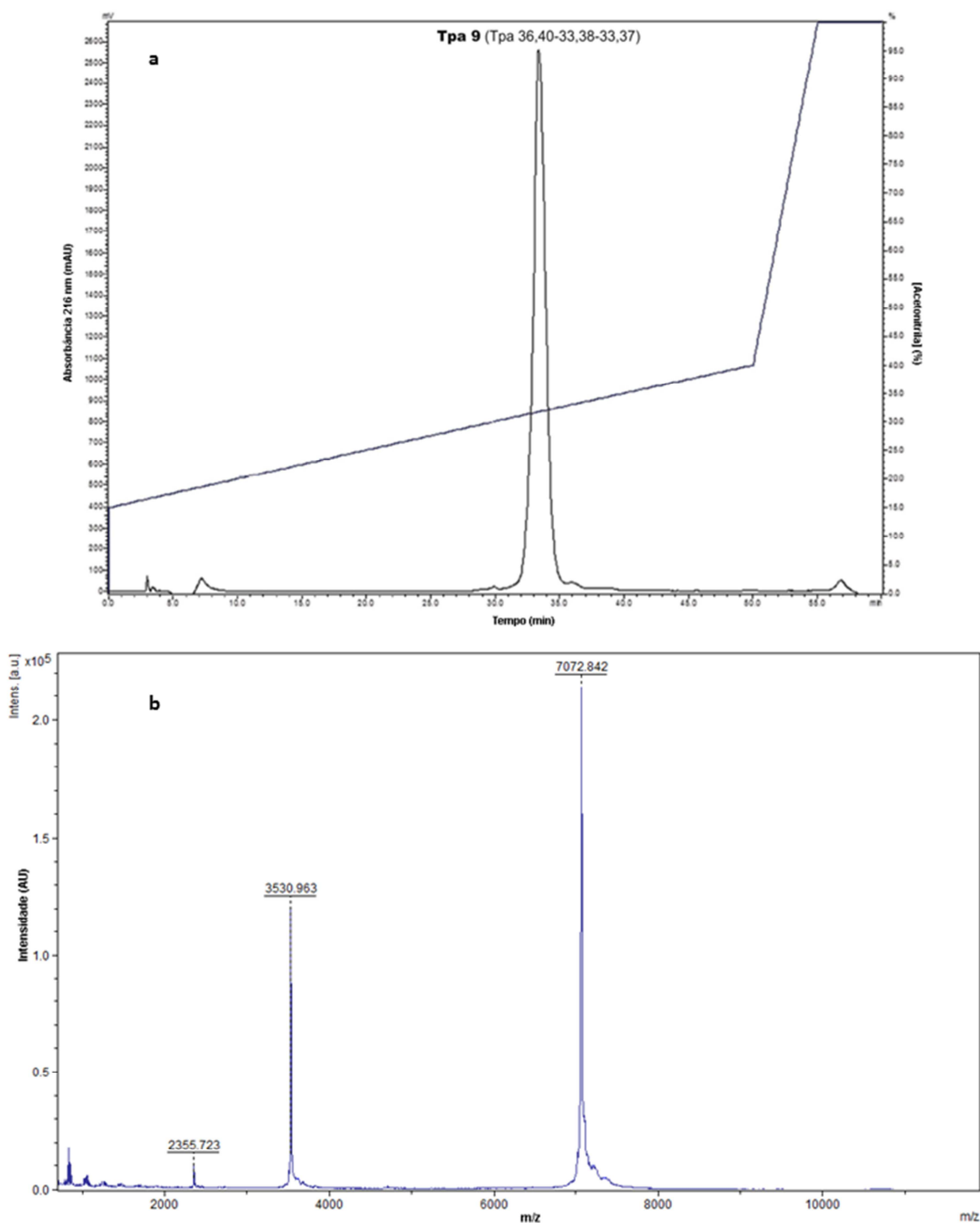


Figura 12. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa9. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em MALDI-TOF em modo linear da Tpa9.

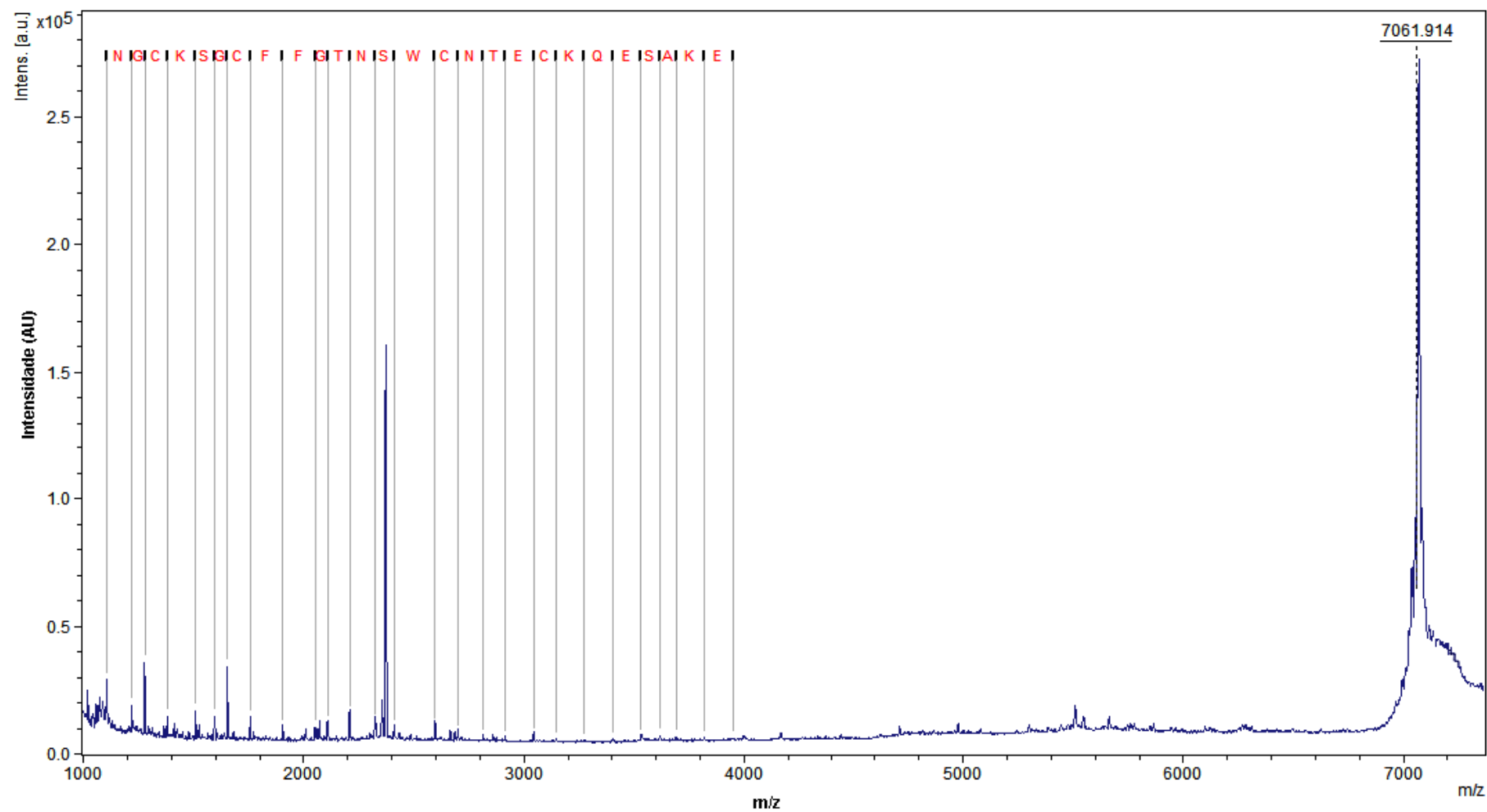


Figura 13. Sequência parcial de aminoácidos da Tpa9, obtida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, usando-se o método *In-Source Decay (ISD)*.



Figura 14. Seqüência parcial da Tpa9 obtida por espectrometria de massa. A linha em azul indica o fragmento obtido pelo método de *ISD*. E as linhas vermelhas indicam os fragmentos obtidos após da clivagem enzimática com Tripsina e as sequências *de novo* obtidas pelo método *LIFT*

A seqüência parcial obtida pelo método de *ISD* inicia no aminoácido número 11 (NGCKSGCFFGTNSWCNTECKQESAKE) e termina no aminoácido número 36 da cadeia primaria do peptídeo Tpa9. Depois da sobreposição com os fragmentos obtidos pela digestão tríptica, vemos que os aminoácidos 11, 12, 13, e 14 são, respectivamente, DCGK (figura 9) e não NGCK.

Comparando-se a massa molecular teórica da seqüência parcial à massa molecular experimental da Tpa9, observa-se que, para obter a seqüência completa estão faltando 464,08 Da que são aproximadamente 4-5 resíduos de aminoácidos. Dentre estes, considerando-se o número de cisteínas da seqüência parcial (7) e a similaridade com outras NaScTxS, está incluída uma cisteína para que a Tpa9 esteja estabilizada por 4 pontes dissulfeto.

A seqüência parcial da nova toxina Tpa9 possui 86% de identidade com a To15 ($9e^{-33}$) do escorpião *T. obscurus* e 74% de identidade com a Tpa7 ($3e^{-29}$) de *T. pachyurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Possui ainda 75% de identidade com a Na6 ($4e^{-29}$) de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009) e 75% de identidade com a Tz2 ($2e^{-28}$) de *T. zulianus* (Borges *et al.*, 2006).

O fato de compartilhar com essas outras toxinas que estão catalogados como sendo do tipo β uma identidade acima dos 70%, permite sugerir que a Tpa9 é uma nova β NaScTx, fazendo parte da subfamília NaTx1 conforme figura 9. A Figura 15 mostra o alinhamento múltiplo da Tpa9 com as demais β NaScTx do gênero *Tityus*.

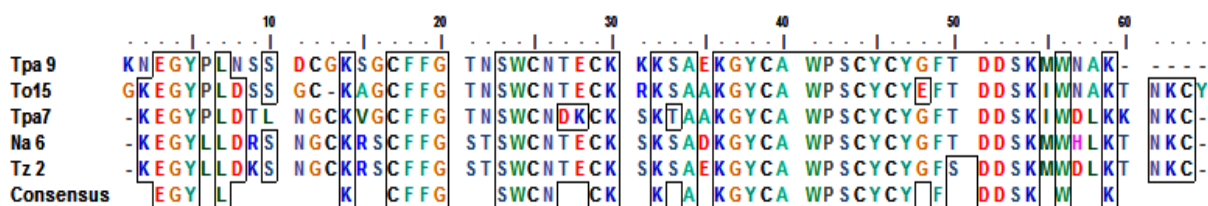


Figura 15. Alinhamento múltiplo da Tpa9 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade. Observam-se, dentro das formas retangulares, os resíduos de aminoácidos idênticos e compartilhados entre as toxinas. O alinhamento foi realizado nos programa *CLUSTAL_X 1.83* (Thompson *et al.*, 1997).

5.4.2. Fração Tpa 36,90.

A fração Tpa 36,90 foi submetida a uma etapa de recromatografia empregando-se um gradiente linear de 15% a 45% do solvente B, em 60 minutos, gerando 2 frações, sendo a fração Tpa 36,90-35,20 a mais abundante (figura 16).

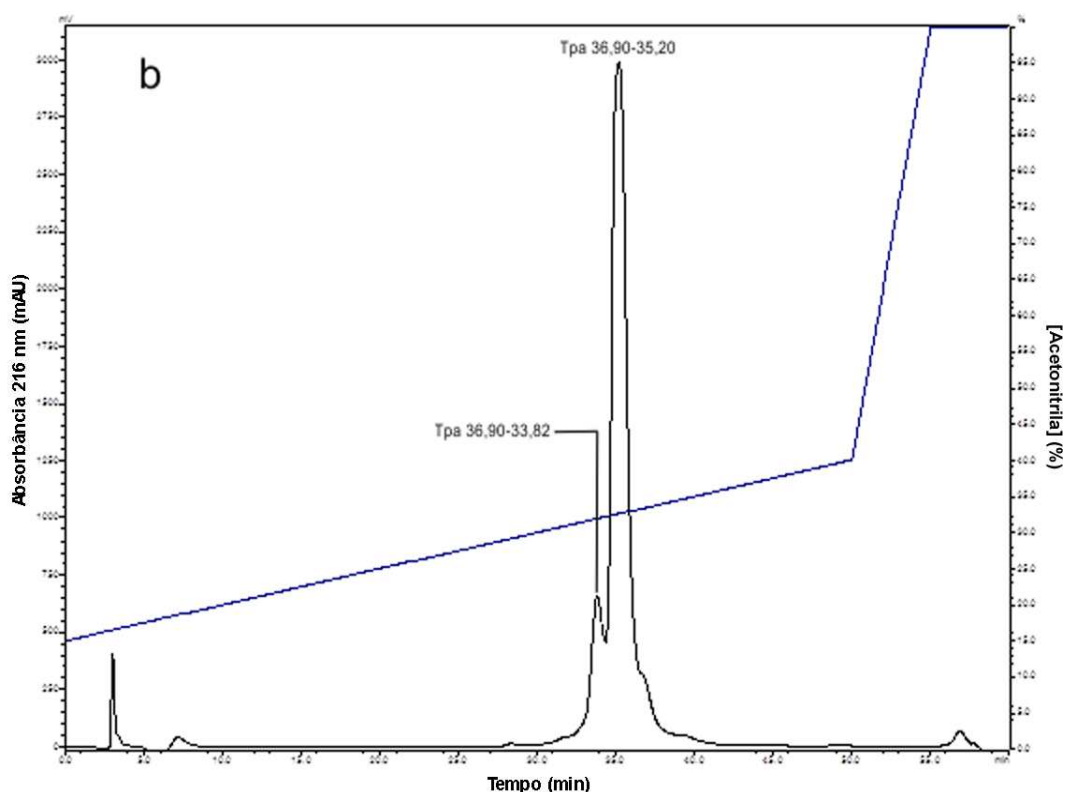


Figura 16. Recromatografia da fração Tpa 36,90. Perfil cromatográfico da fração Tpa 36,90 obtido em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), em gradiente linear de 15% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorvância monitorada a 216 nm

5.4.2.1. Recromatografia e análise de massa da fração Tpa 36,90-35,20

O perfil cromatográfico obtido da recromatografia da fração Tpa 36,90 pode ser visto na Figura 17. A fração mais abundante - Tpa 36,90-35,20 - foi recromatografada, usando-se um gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos (figura 17a), A fração predominante obtida - Tpa 36,90-35,20-35,11 - foi analisada por espectrometria de massa do tipo *MALDI-TOF* em modo linear, onde são observados três valores de massa: 2507,422 Da é a carga tripla, 3759,493 Da é a carga dupla e 7530,354 Da carga única (figura 17b). A massa molecular exata foi determinada por ionização por *electrospray* (ESI) em um sistema híbrido de detecção quadrupolo e tempo de voo (*ESI-Qq-TOF micrOTOF-QII, Bruker Daltonics, Alemanha*). A massa molecular monoisotópica da Tpa 36,90-35,20-35,11 é 7517,29 Da. A análise de massa molecular média realizada no *MALDI-TOF* para a Tpa 36,90-35,20-35,11 resultou em 7530,354 Da, valor que coincide com o valor de massa molecular média reportado para a Tpa2 por Barona *et al.* (2006), embora o valor de massa monoisotópica reportado aqui é 7517, 29 Da, trata-se da mesma Tpa2.

5.4.2.2. Sequenciamento *de novo* da Tpa 36,90-35,20-35,11

O sequenciamento parcial da fração Tpa 36,90-35,20-35,11 e pelas análises de similaridade com outras sequências, após de rodar o algoritmo *blastp*, comprovou que se trata da Tpa2. Essa toxina é classificada como β NaScTx, modificando as correntes iônicas de canais para Na^+ em células F-11 e TE671 (Barona *et al.*, 2006). Dentro da classificação proposta por nosso grupo, a Tpa2 faz parte da subfamília NaTx12 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) e como indicado no décimo segundo agrupamento da análise filogenética (Figura 9). Na Figura 18 é mostrado o sequenciamento parcial obtido pelo método de *ISD*.

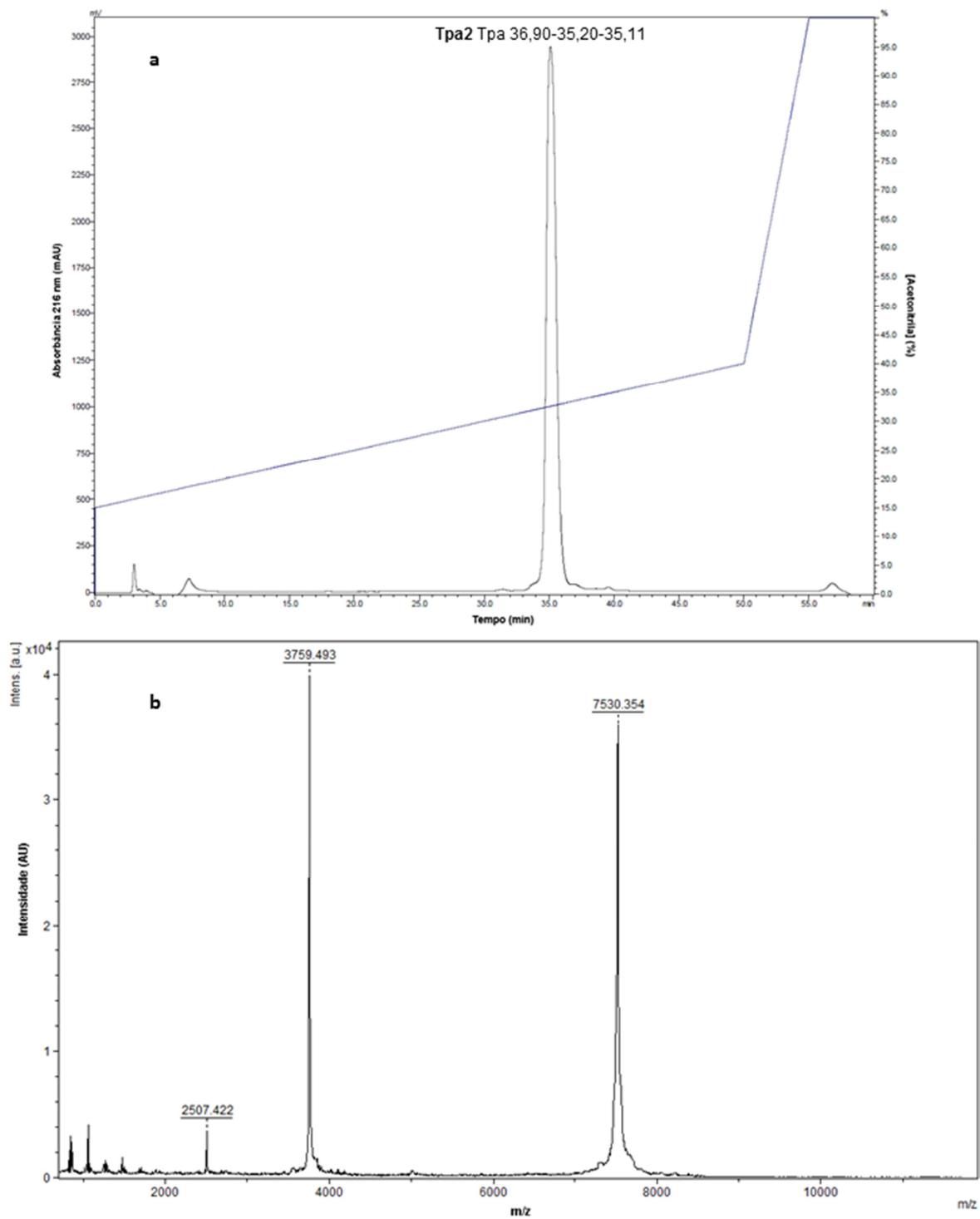


Figura 17. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa2. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em MALDI-TOF em modo linear da Tpa2

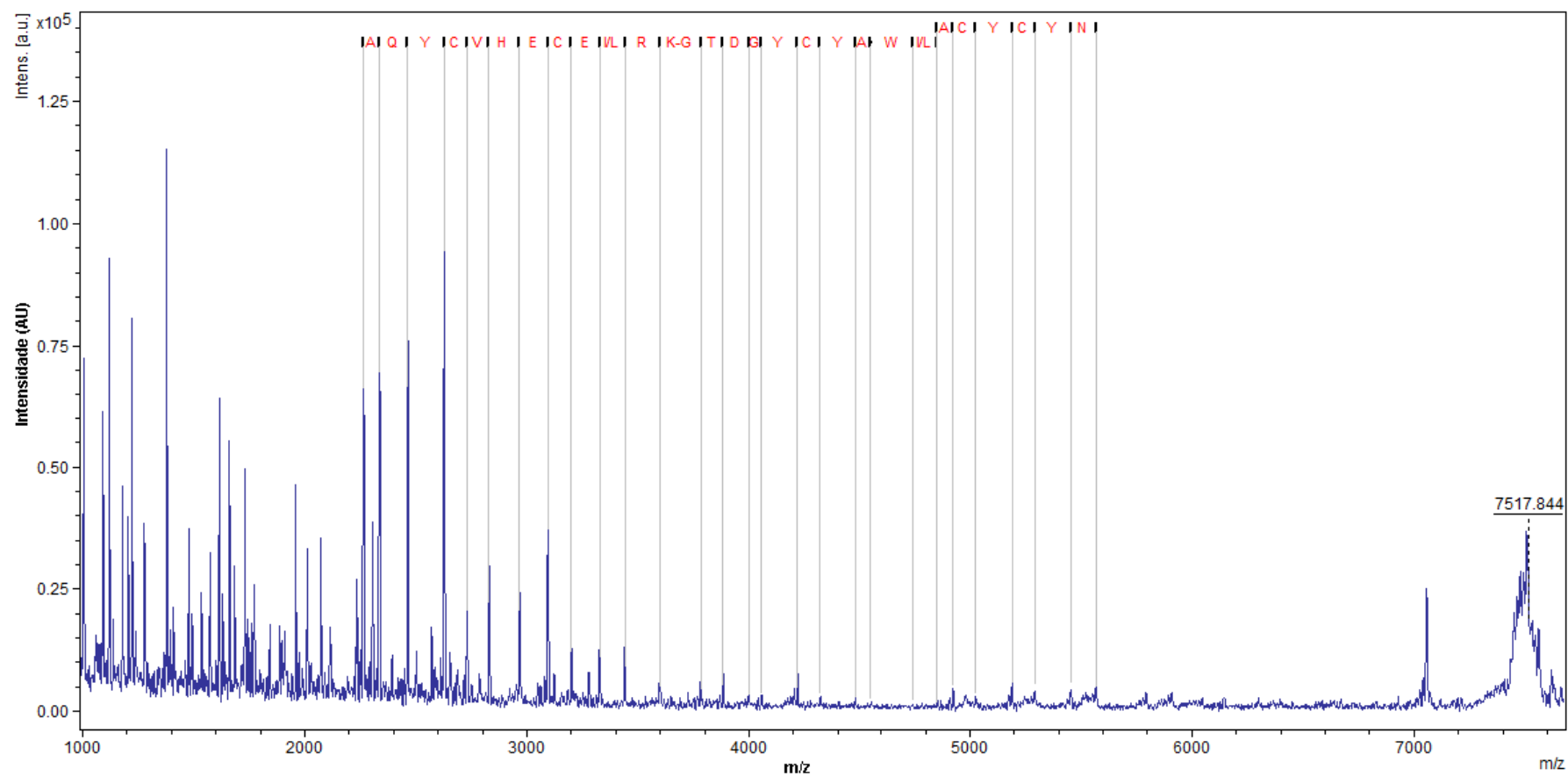


Figura 18. Sequência parcial de aminoácidos da Tpa2, obtida por espectrometria de massa tipo *MALDI-TOF*, usando-se o método *in source decay (ISD)*.

5.4.3. Fração Tpa 37,92

A fração Tpa 37,92, após ser submetida a uma etapa de recromatografia empregando-se um gradiente linear de 15% a 45% do solvente B, em 60 minutos, resultou em 5 frações. As frações Tpa 37,92-36,89 e Tpa 37,92-37,75 foram submetidas a novas recromatografias (figura 19).

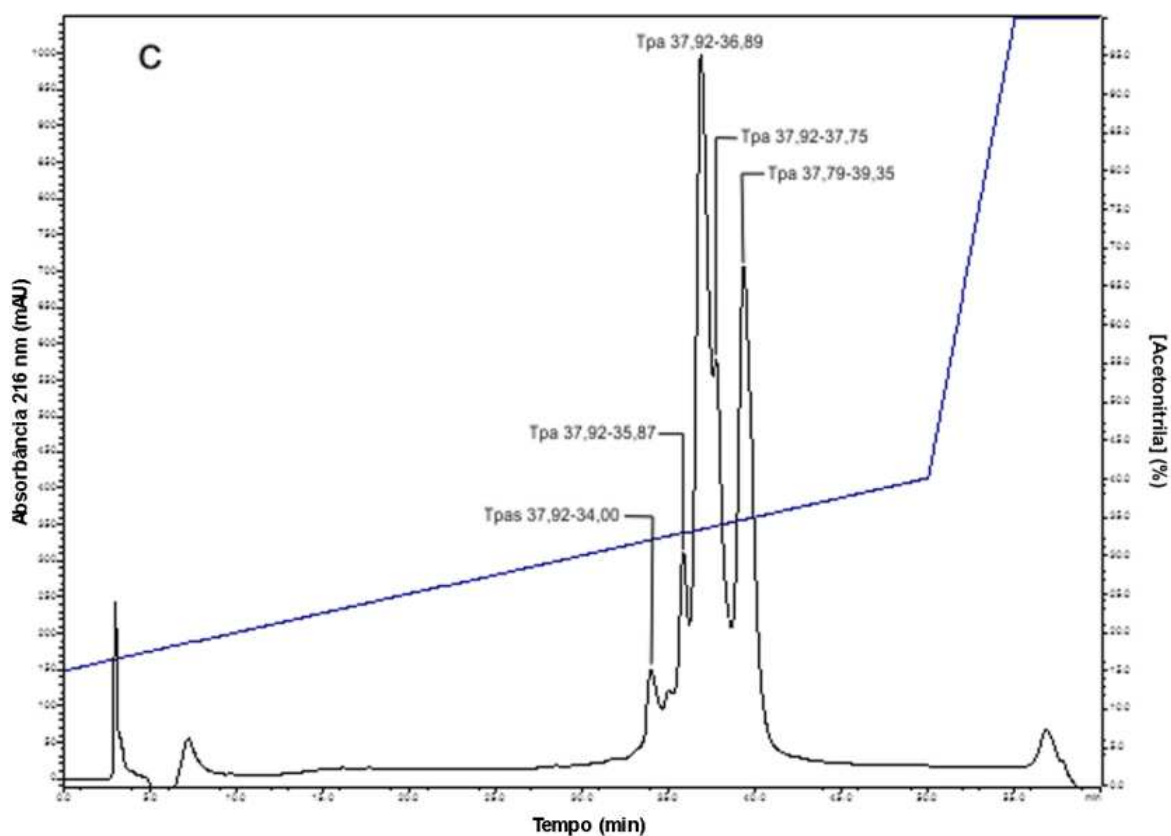


Figura 19. Recromatografia da fração Tpa 37,92. Perfil cromatográfico da fração Tpa 37,92 obtido em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), em gradiente linear de 15% a 45% de B em 60 minutos, fluxo 1mL/min e absorbância monitorada a 216 nm

5.4.3.1 Recromatografias e análise de massa das frações Tpa 37,92-36,89 e Tpa 37,92-37,75

O perfil cromatográfico da Tpa 37,92, indicado na Figura 14, mostra duas frações mais abundantes: a Tpa 37,92-36,89 e a Tpa 37,92-37,75. As duas foram recromatografadas em gradiente linear de 15% a 40% de B, em 50 minutos (Figuras 20 e 21, respectivamente), e o grau de pureza das frações obtidas foi avaliado por espectrometria de massa *MALDI-TOF*. Na Figura 15 b observa-se três valores de massa: 2.333,554 Da corresponde à carga tripla, 3.498,846 Da à carga dupla e 7.003,838 Da à carga única da Tpa10. Na Figura 16b são indicados três valores de massa da Tpa11, onde 2.391,407 Da é a carga tripla, 3.585,125 Da é a carga dupla e 7.177,035 Da é a carga única.

As massas moleculares monoisotópicas, determinadas por *ESI-Qq-TOF micrOTOF-QII*, foram de 6.994,36 Da para a Tpa 37,92-36,89-36,55 que passa a ser nomeada como Tpa10, e de 7.167,23 Da para a Tpa 37,92-37,75-37,36, chamada de Tpa11.

5.4.3.2. Sequenciamento *de novo* da Tpa 10 e da Tpa 11

As sequências parciais da Tpa10 e da Tpa11 foram obtidas usando o método de *ISD* por espectrometria de massa em um equipamento *MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha)*, e pela comparação de similaridade com outras sequências, após de rodar o algoritmo *blastp*.

Para a Tpa10, foi determinada a seqüência parcial GYDNAYCDK/QI/LCKERK/QADSGYC, como indicado na Figura 22. Essa seqüência apresentou identidade com α NaScTxS já descritas: 90% com a To10 ($3e^{-17}$) e 86% com a To9 ($4e^{-16}$) de *T. obscurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012); 90% com a Na8 ($3e^{-17}$) de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009); 81% com a TbTx5 ($3e^{-15}$) de *T. bahiensis* (Kalapothakis *et al.*, 2001); 80 % com a Tst3 ($2e^{-14}$) de *T. stigmurus* (Batista *et al.*, 2007) e 80% com a Ts3 ($3e^{-14}$) de *T. serrulatus* (Corona *et al.*, 1996). A seqüência parcial da Tpa10 foi alinhada com as α NaScTxS que apresentaram uma porcentagem de identidade \geq a 80% (Figura 23).

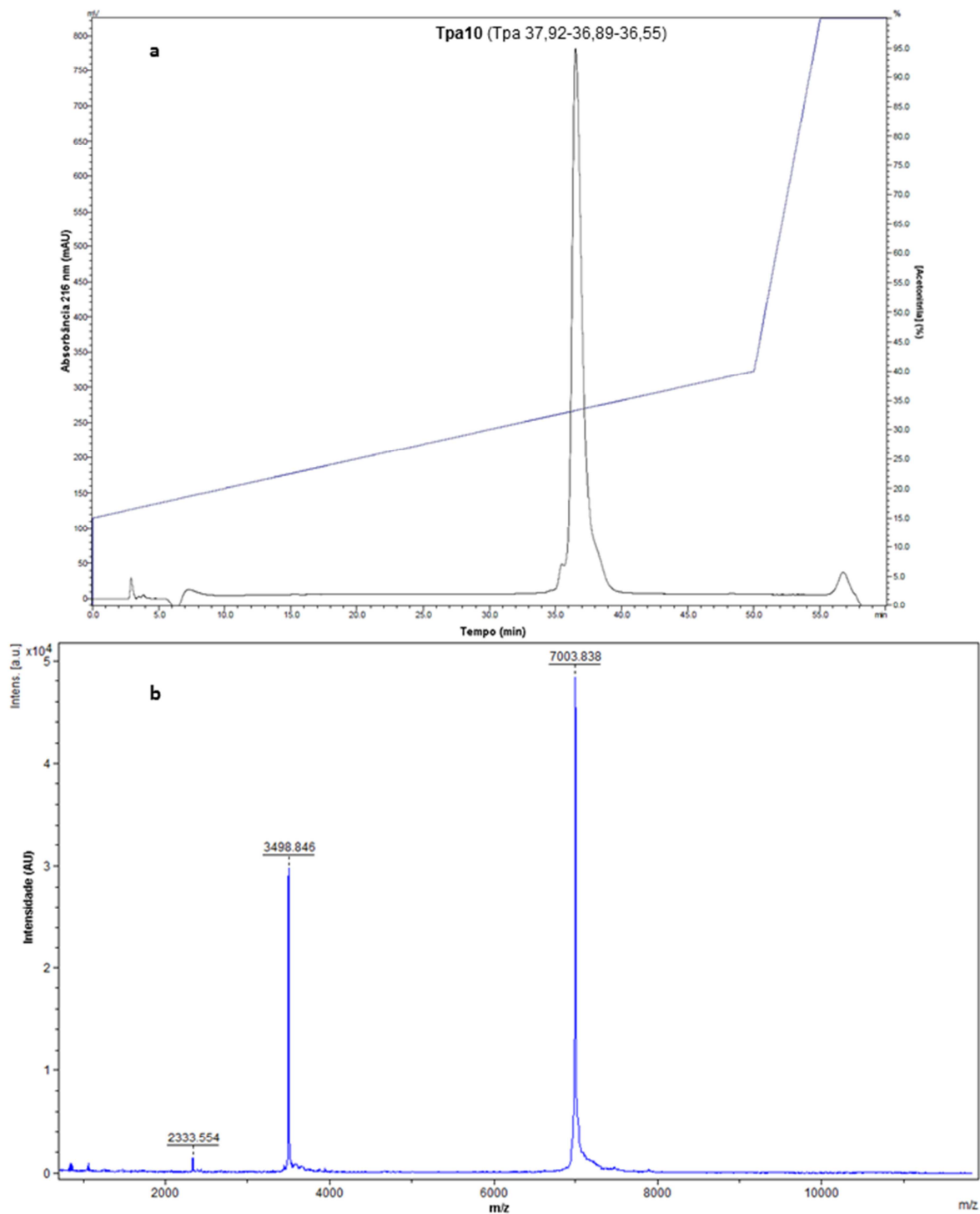


Figura 20. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa10. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em MALDI-TOF em modo linear da Tpa10.

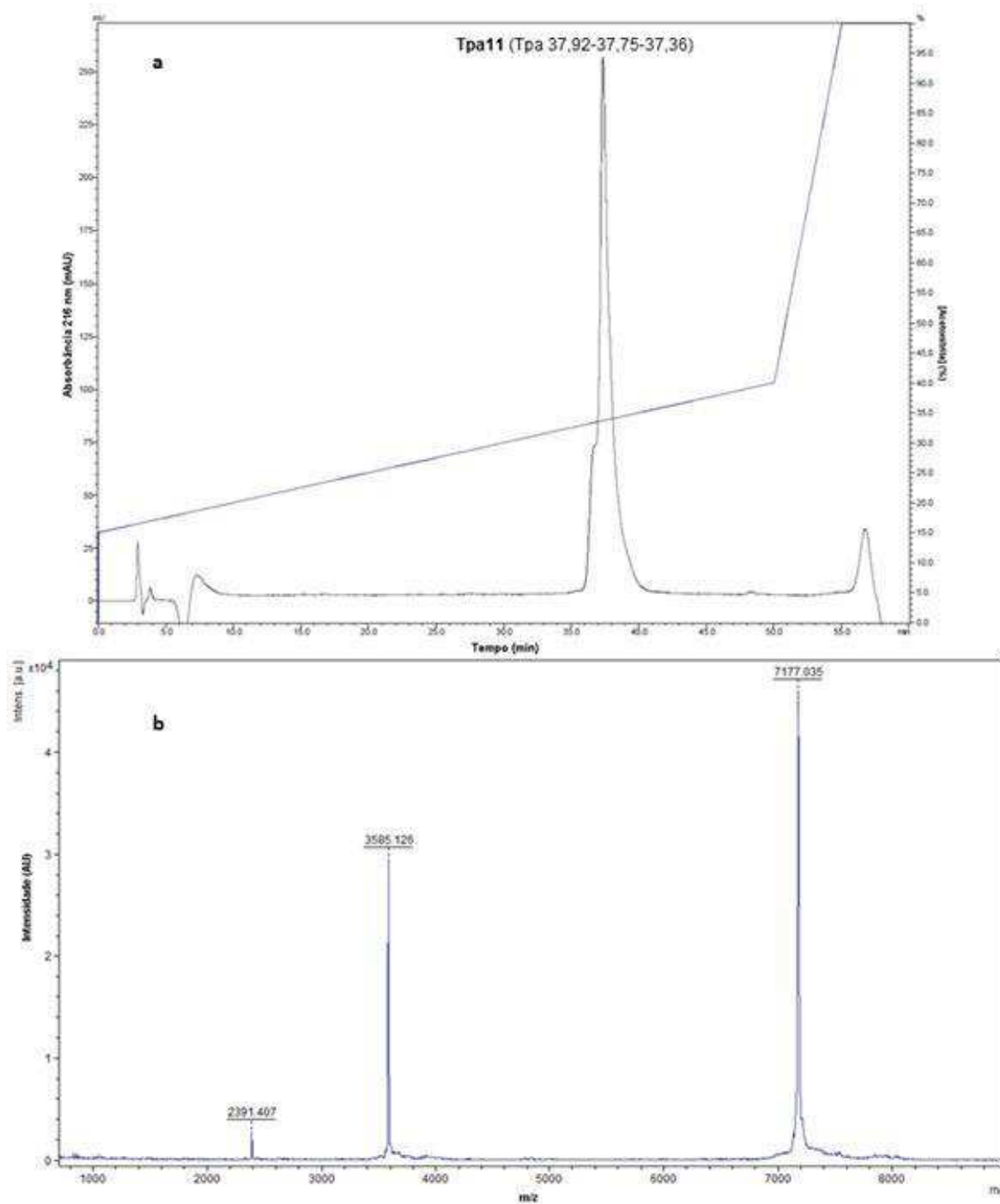


Figura 21. Perfil cromatográfico e análise de massa molecular da Tpa11. a. Recromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 4 micro 250 x 4,60 mm), e gradiente linear de 15% a 40% de B em 50 minutos. b. Espectro de massa molecular obtido em MALDI-TOF em modo linear da Tpa11.

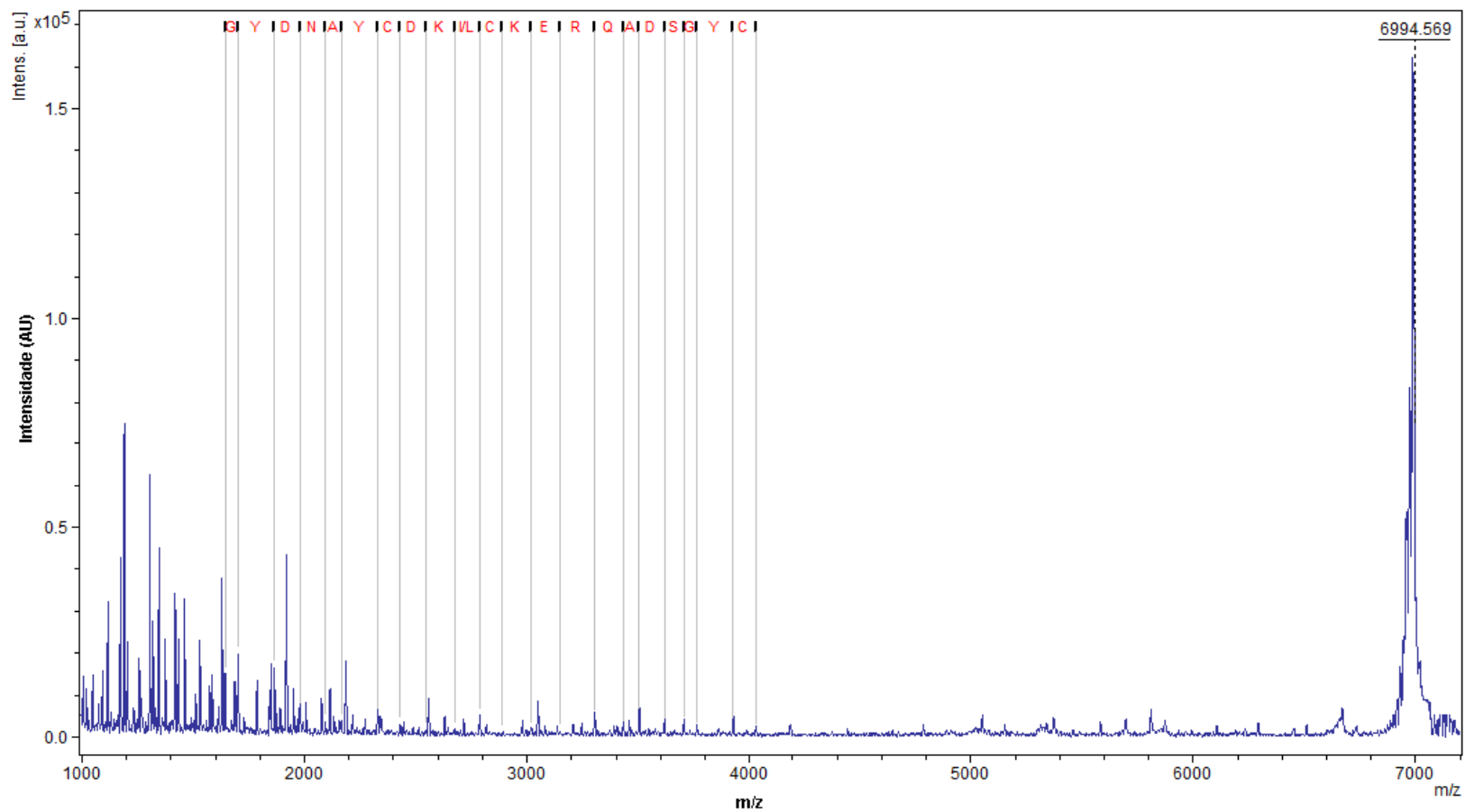


Figura 22. Sequência parcial de aminoácidos da Tpa10. A sequência parcial de aminoácidos da Tpa10 foi obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, usando-se o método *In-Source Decay (ISD)*.



Figura 23. Alinhamento múltiplo da sequência parcial Tpa10 com as toxinas com as quais apresentou maior porcentagem de identidade. As formas retangulares destacam os resíduos de aminoácidos idênticos. O alinhamento foi realizado no programa *CLUSTAL_X* 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). To9 de *T. obscurus* (HE585232.1), To10 (HE585233.1).

Após do sequenciamento por *ISD* da Tpa11 obteve-se a sequência parcial GCK/QFSCFI/LRPSGFCERYCK/QTHI/LSASTGYCAMA (figura 24). Essa sequência possui identidade com β NaScTxs: 97% de identidade com a To12 ($1e^{-18}$) de *T. obscurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), 81% com a Tb2-II ($3e^{-16}$) de *T. bahiensis* (Pimenta *et al.*, 2001a), 77% com a Ts2 ($9e^{-16}$) de *T. serrulatus* (Possani *et al.*, 1991) e 74% com a Tb2 ($7e^{-15}$) de *T. bahiensis* (Becerril *et al.*, 1996). Esses resultados sugerem que a Tpa11 seja, possivelmente, uma toxina do tipo β , podendo ser incluída na subfamília NaTx5. A figura 25 mostra o alinhamento múltiplo da Tpa11 com outras toxinas da mesma família.

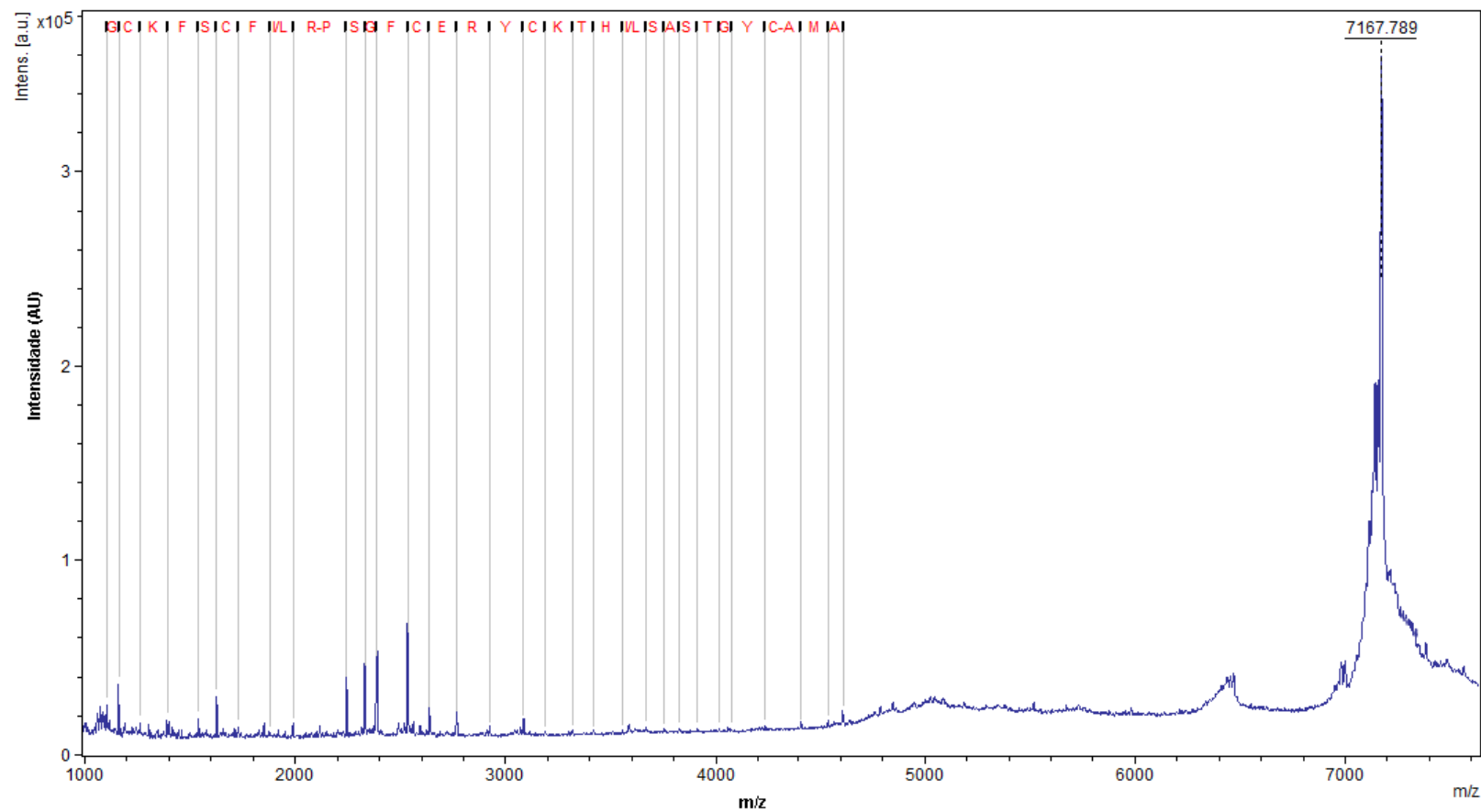


Figura 24. Sequência parcial de resíduos de aminoácidos da Tpa11. A sequência parcial de resíduos de aminoácidos da Tpa11 foi obtida por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, usando-se o método *In-Source Secay (ISD)*.

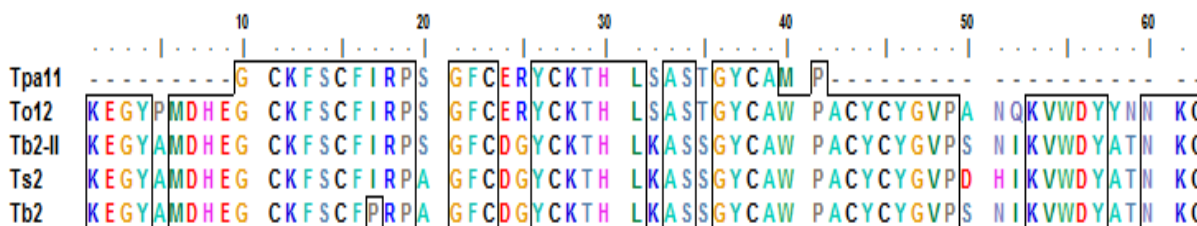


Figura 25. Alinhamento múltiplo da sequência parcial da Tpa11 com as toxinas com as quais apresentou maior percentagem de identidade. As formas retangulares evidenciam os resíduos de aminoácidos idênticos. O alinhamento foi realizado no programa CLUSTAL_X 1.83. To12 (HE585235.1) de *T. obscurus*.

Na Figura 26, observa-se o alinhamento múltiplo das sequências completas e parciais das NaScTx identificadas até o momento na peçonha do escorpião *T. pachyurus*.



Figura 26. Alinhamento múltiplo das sequências completas e parciais das NaScTx da peçonha do escorpião *T. pachyurus*. Tpa2 (Barona *et al.*, 2006) e da Tpa4 até Tpa11 identificadas no presente trabalho. As formas retangulares evidenciam os resíduos de aminoácidos idênticos. O alinhamento foi realizado no programa CLUSTAL_X 1.83

5.5. AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

O efeito das novas NaScTx - Tpa9, Tpa10, Tpa11 - e da previamente descrita Tpa2 sobre as correntes iônicas dos canais para Na⁺ foi avaliado sobre células *HEK* que expressam canais para sódio como descrito na seção Material e Métodos.

A Tpa9 (500 nM) causou uma redução de cerca de 20% da amplitude da corrente em canais hNa_v 1.1, mas não teve efeito, na mesma concentração, nos canais hNa_v 1.2, hNa_v 1.3, hNa_v 1.4, hNa_v 1.5 e hNa_v 1.6 (Figura 27a), podendo indicar uma especificidade para o primeiro canal na concentração

utilizada. Em hNa_v 1.1, Tpa9 reduziu a amplitude da corrente, de maneira semelhante à das βNaScTx. Cabe ressaltar que a análise da sequência primária da Tpa9 já sugeria que esta toxina pertencesse à família das βNaScTx.

A Tpa10, na dose de 500 nM, apresentou um efeito similar ao das αNaScTx, uma vez que produziu um atraso no processo de inativação nos subtipos hNa_v 1.1, hNa_v 1.2, hNa_v 1.3 e hNa_v 1.6, sendo que, neste último, o efeito foi maior na concentração utilizada (Figura 27b). Considerando-se a atividade em canais de sódio e a sequência primária parcial similar às αNaScTx identificadas em escorpiões do gênero *Tityus*, a Tpa10 pode ser classificada como uma nova αNaScTx.

A Tpa11 (500 nM) apresentou um efeito similar às βNaScTx. A figura 27a mostra a relação corrente/voltagem obtida para a Tpa11 nos canais hNa_v1.2, hNa_v1.3 e hNa_v1.6 evidenciando que a toxina altera a ativação dos canais para potenciais mais negativos e reduz a corrente de pico. No subtipo hNa_v1.2, a Tpa11 causa a maior redução da corrente, enquanto que na isoforma hNav 1.3 muda a ativação dos canais para os potenciais mais negativos (\pm -80 mV) e no subtipo hNa_v 1.6 reduz levemente a corrente de pico. Considerando-se estes resultados e a porcentagem de identidade estrutural da Tpa11 com βNaScTx, a Tpa11 é classificada como uma nova βNaScTx.

A Tpa2 apresentou um efeito similar às βNaScTx, levando a ativação dos canais para sódio para potenciais mais negativos e reduzindo a corrente do pico (figura 27a). Um efeito similar já havia sido reportado por Barona *et al.* (2006) utilizando células *F-11* e *TE671*.

Na concentração utilizada, a Tpa2 mostrou ser mais potente que a Tpa9 e a Tpa11 e teve maior atividade no canal hNav1.6.

A tabela 3 mostra um resumo da avaliação da atividade das toxinas Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 em diferentes subtipos de canais para sódio.

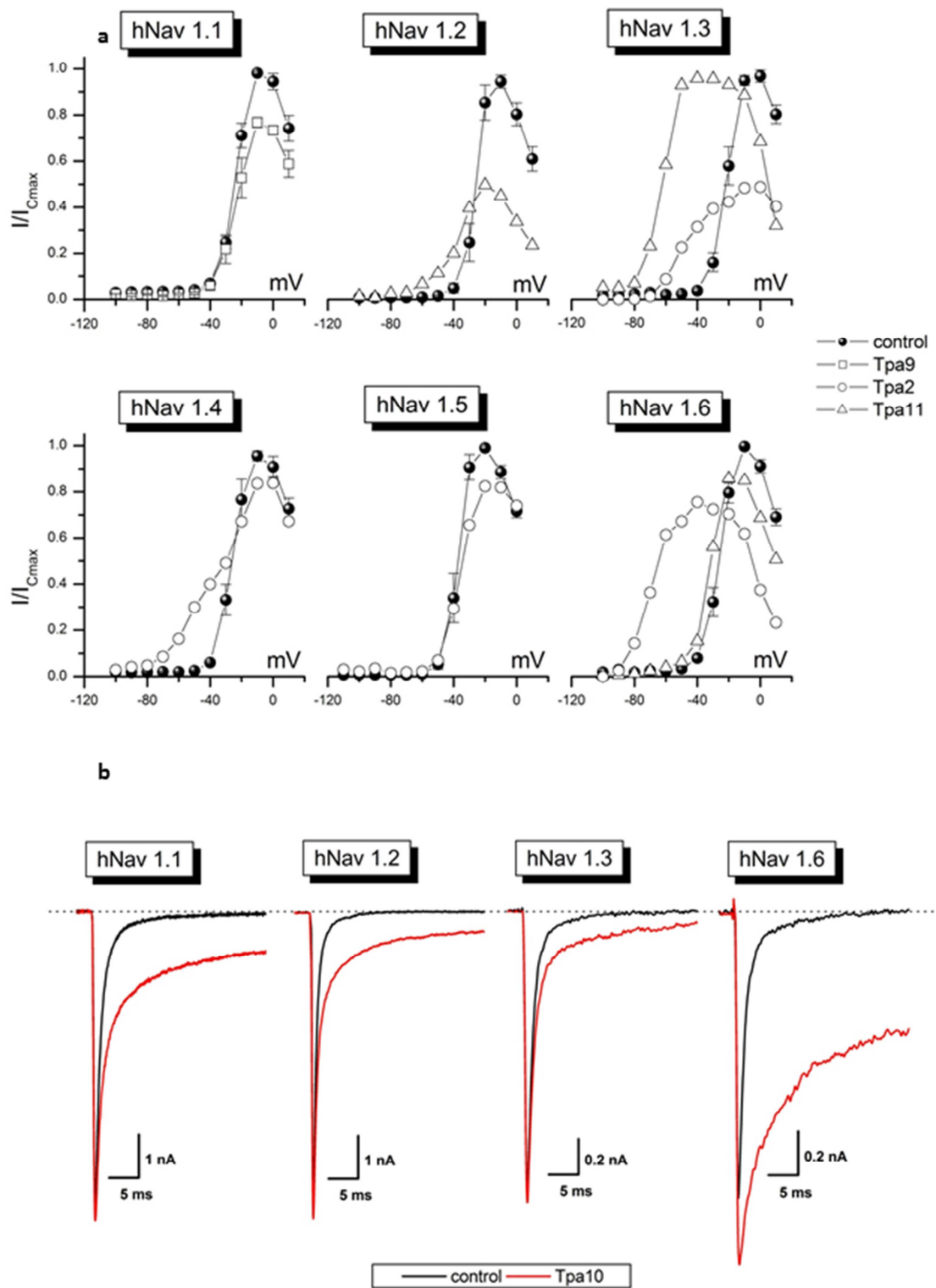


Figura 27. Efeitos das toxinas Tpa2 (500 nM), Tpa9 (500 nM), Tpa10 (500 nM) e Tpa11 (500 nM) sobre as correntes iônicas nos canais para Na^+ . a. Efeitos tipo β da Tpa9, Tpa2 e Tpa11. b. Correntes provocadas por um pulso de despolarização de -10 mV até -90mV no registro controle (em preto) é normal, e após da aplicação da Tpa10 (500 nM) (em vermelho).

Tabela 3. Resumo dos efeitos apresentados pelas toxinas Tpa10, Tpa2, Tpa9 e Tpa11, nas concentrações de 500nM, sobre as correntes iônicas de canais para sódio.

Tipo de efeito	Toxina	hNav 1.1	hNav 1.2	hNav 1.3	hNav 1.4	hNav 1.5	hNav 1.6
α	Tpa10	√	√	√	-	-	√*
	Tpa2	-	√	√	-	-	√*
β	Tpa9	√	-	-	-	-	-
	Tpa11	-	√*	√	-	-	√

- Não apresentou efeito

√ Apresentou efeito

√* Canal de sódio onde a toxina mostrou efeito mais potente.

5.6. EFEITO HISTOPATOLÓGICO E SINTOMAS DO ESCORPIONISMO, CAUSADOS PELAS NaScTXs DE *T. pachyurus*

Com o propósito de verificar se as toxinas Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 apresentam efeitos histopatológicos sobre coração, fígado, pâncreas, pulmões e rins, grupos de cinco camundongos de 18 g (± 2 g) foram injetados com uma dose de 0,5 μ g/g de cada toxina diluída em solução salina 0,9% e os resultados comparados aos obtidos em animais do grupo controle que receberam solução salina. Os efeitos da administração de cada toxina sobre os camundongos, também foram registrados, adotando-se a classificação proposta por Khattabi *et al.* (2011) para a definição do grau de escorpionismo em humanos. Classe I inclui sintomas locais como dor, prurido, eritema, entre outros. Classe II se apresenta por manifestações severas que não colocam a vida do paciente em risco e os principais sintomas são: agitação, anisocoria (diâmetro desigual das pupilas), ataxia (falta de coordenação dos movimentos), confusão, convulsões, diarréia, fasciculações (pequenas contrações involuntárias, localizadas e descoordenadas de músculos, normalmente visíveis sob a pele), hipotermia, câimbras, sialorréia (secreção abundante de saliva), etc. O escorpionismo Classe III inclui manifestações severas que colocam a vida em risco, cujos sintomas estão agrupados em disfunções cardíacas, respiratórias e neurológicas.

5.6.1. Sintomas do escorpionismo causados pelas NaScTx Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2

Dos cinco camundongos que receberam a toxina Tpa9, somente três apresentaram dor e prurido, características do escorpionismo classe I. Nos demais animais (n=2), nenhuma alteração fisiológica ou comportamental foi observada.

Os sintomas mais graves do escorpionismo foram observados no grupo de camundongos injetados com a toxina Tpa10. Em todos os animais, foi registrado escorpionismo classe I (dor e prurido) e classe II com os seguintes sintomas: agitação, ataxia, câimbra, diarreia, dispnéia, hipotermia (tremores), lacrimejamento, midríase, mioclonia, priapismo, rinorréia e sialorréia.

Para a toxina Tpa11, foram observados sinais de escorpionismo classe I, com dor e prurido em todos os camundongos.

Com a Tpa2 também foram observados sintomas graves de escorpionismo em todos os camundongos injetados, incluindo dor e prurido (classe I) e agitação, ataxia, dispnéia, hipotermia, lacrimejamento, midríase e retenção urinária (classe II).

Pela análise estatística, usando o método de qui-quadrado, observa-se que houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis toxina e efeito ($\chi^2=8,000$, gl=1, p=0,005 (Fisher: p=0,018)) para as toxinas Tpa10, Tpa11 e Tpa2 (Tabela 4). Os valores obtidos para a Tpa9 confirmam que essa toxina não provocou efeitos característicos do escorpionismo.

Tabela 4. Escorpionismo causado em camundongos (n=5) após da injeção das toxinas Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 (0,5 μ /g-animal) isoladas da peçonha do escorpião *T. pachyurus*. χ^2 valor de qui-quadrado, **p-valor**, probabilidade $\leq 0,050$.

Toxina	Escorpionismo Classe I		Escorpionismo Classe II	
	χ^2	p-valor	χ^2	p-valor
Tpa9	2,880	0,090	-	-
Tpa10	8,000	0,005	8,000	0,005
Tpa11	8,000	0,005	-	-
Tpa2	8,000	0,005	8,000	0,005

5.6.2. Efeitos histopatológicos causados pelas NaScTx Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2

Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 não induziram alterações nos tecidos cardíaco, pancreático, pulmonar e renal (Figuras 28, 29, 30 e 31). No entanto, todas as toxinas provocaram alterações no tecido hepático, evidenciado pela presença de infiltrado inflamatório (Figura 32) e degeneração vacuolar (Figura 33). A presença e grau dessas alterações hepáticas para cada toxina são apresentados nas tabelas 5 a 8.

Esses resultados se mostraram estatisticamente significativos conforme pode ser observado na Tabela 9 que mostra os valores obtidos do teste de Qui-quadrado. Os valores de qui-quadrado indicam que as toxinas Tpa9 e Tpa11, nas doses de 0,5 µg/g-animal, não causam alteração histológica significativa no fígado de camundongos. As toxinas Tpa10 e Tpa2, por outro lado, nas doses de 0,5 µg/g-animal, causaram alterações histopatológicas significativas no fígado, como degeneração vacuolar e infiltrado inflamatório.

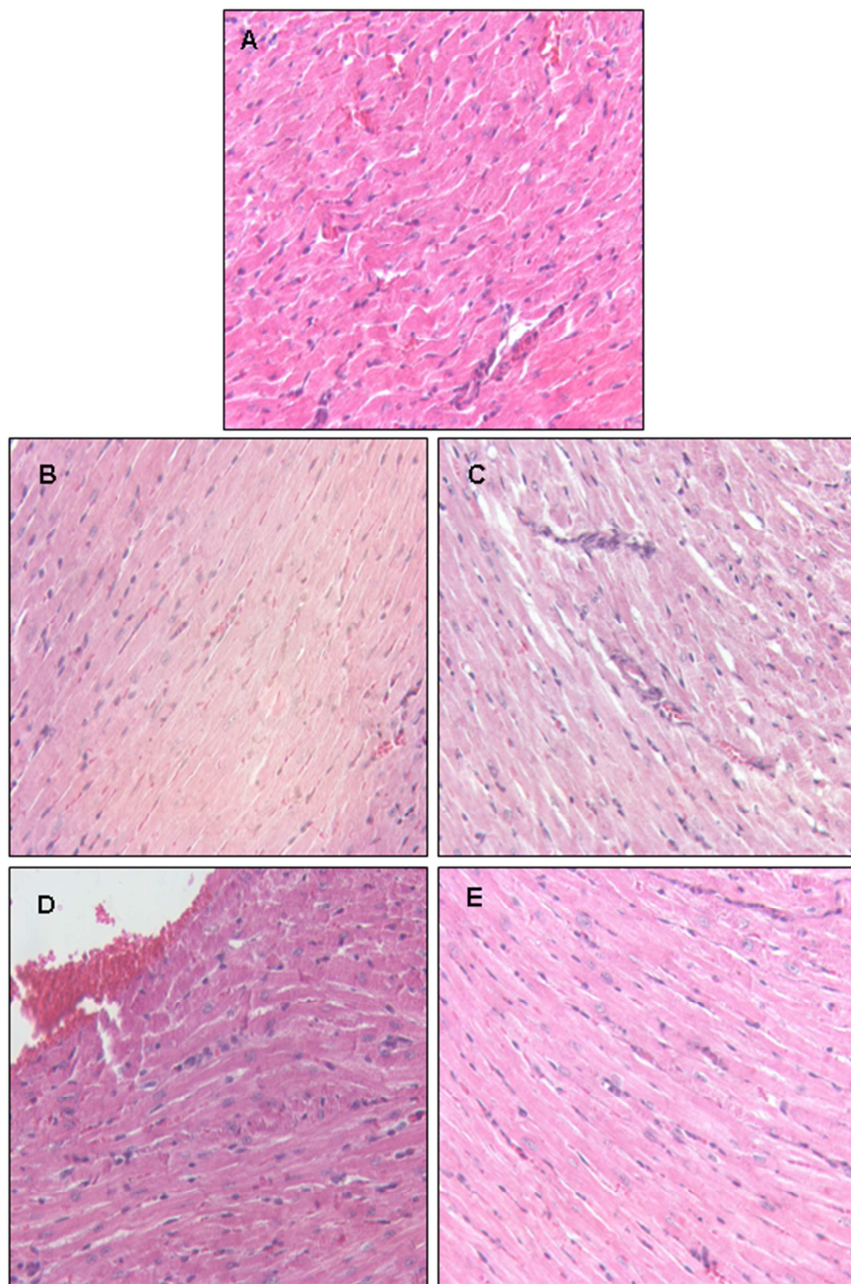


Figura 28. Ausência de efeitos histológicos no coração de camundongos, após injeção de 0,5 μ g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*. A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2

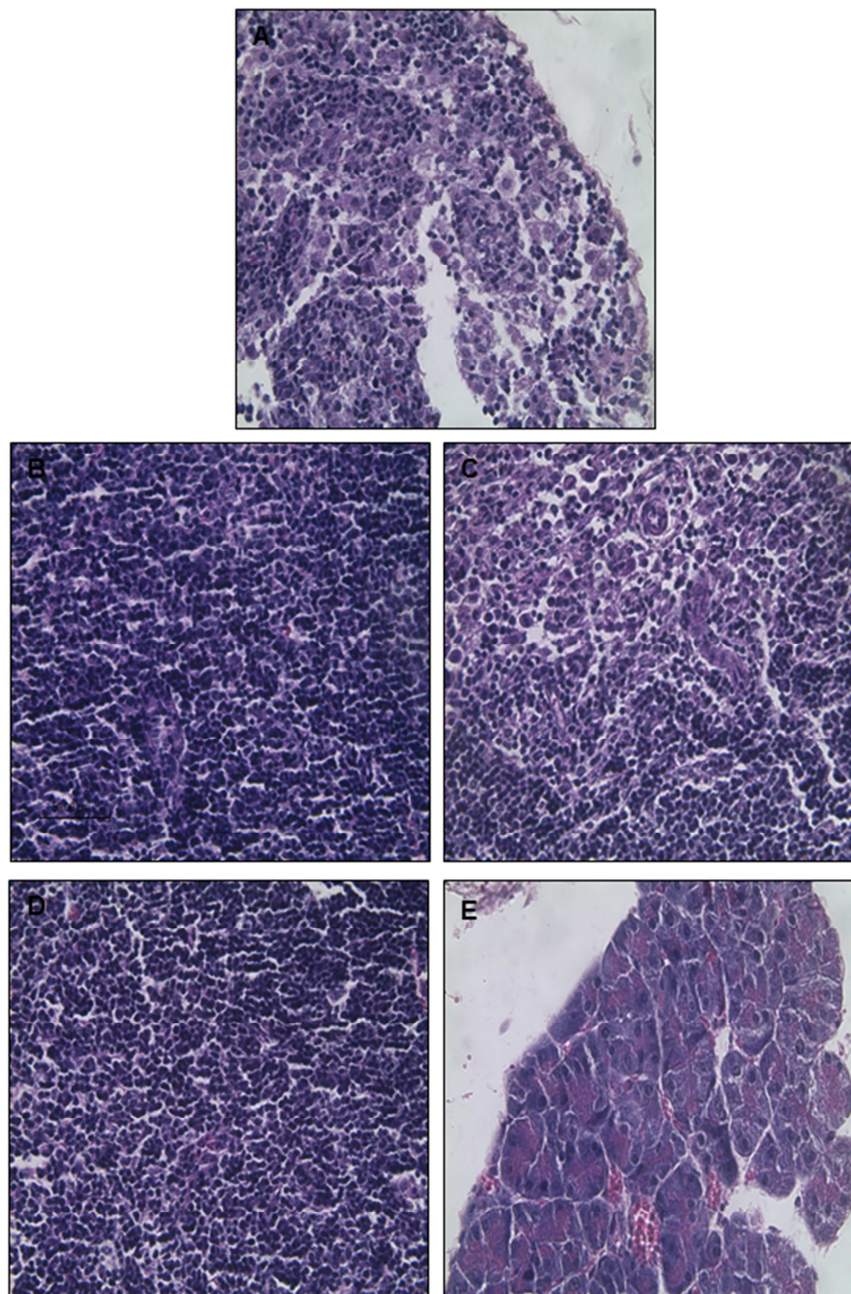


Figura 29. Ausência de efeitos histológicos no pâncreas de camundongos, após injeção de 0,5 µg-anima das NaScTx de *T. pachyurus*. A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2

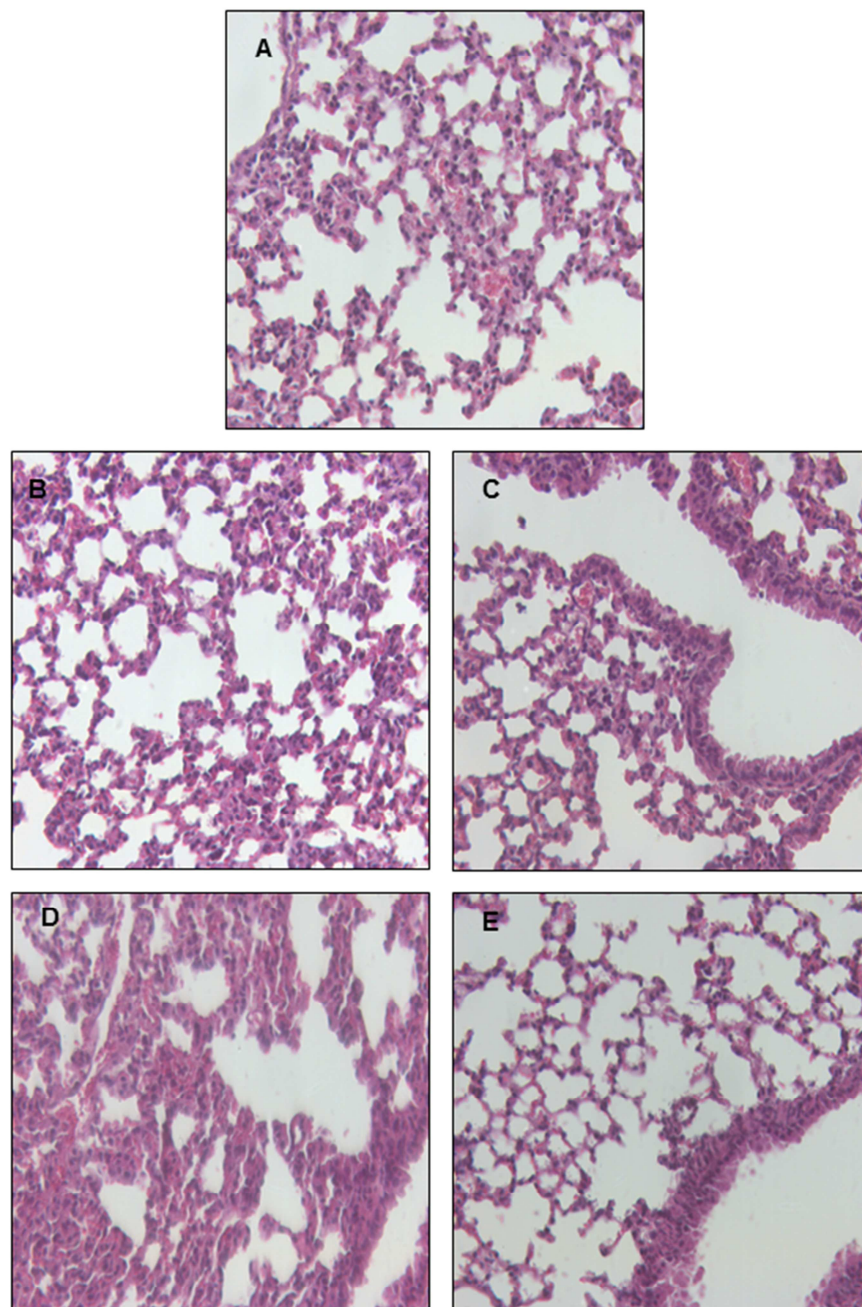


Figura 30. Ausência de efeitos histológicos no pulmão de camundongos, após injeção de 0,5 µg-anima das NaScTx de *T. pachyurus*. A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2

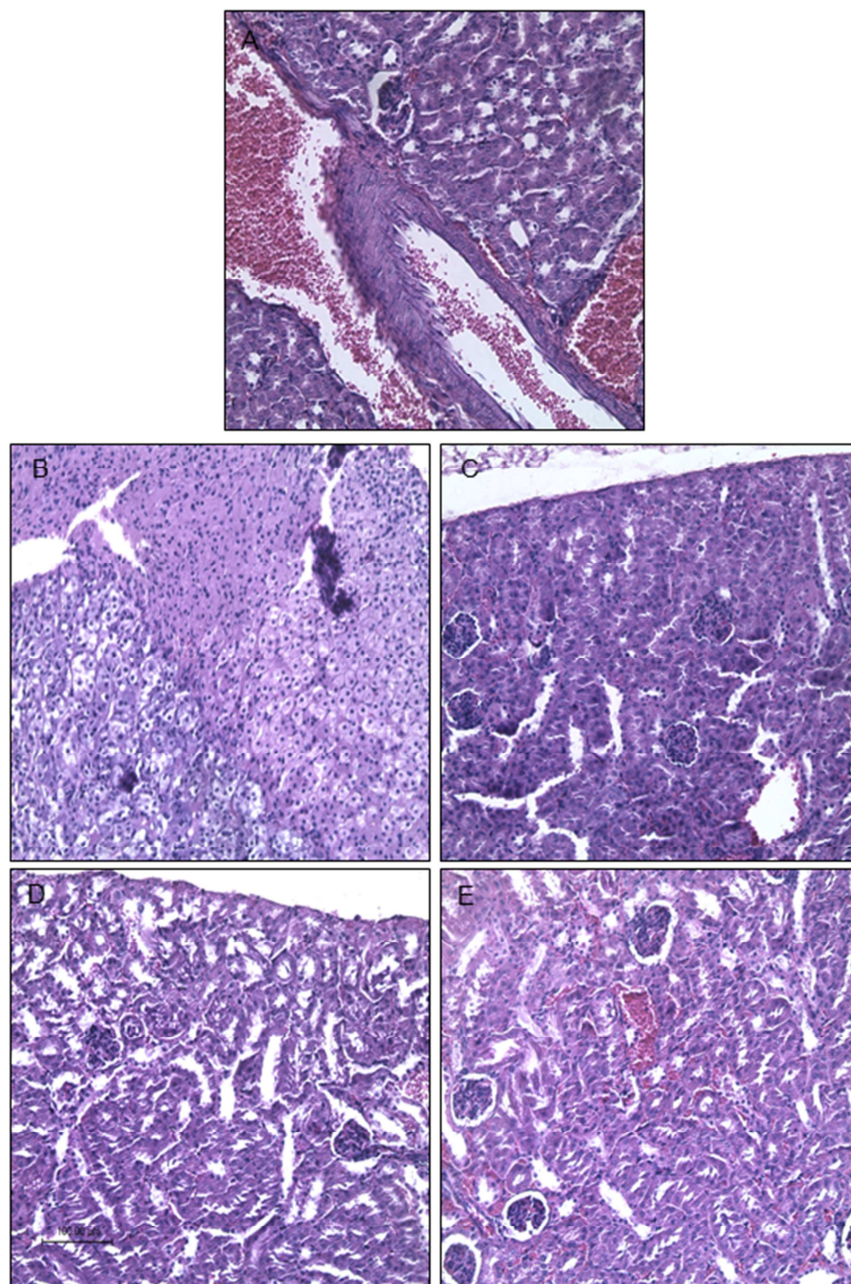


Figura 31. Ausência de efeitos histológicos no rim de camundongos, após injeção de 0,5 µg-anima das NaScTx de *T. pachyurus*. A. Controle (solução salina fisiológica), B .Tpa9, C. Tpa10, D. Tpa11. E. Tpa2

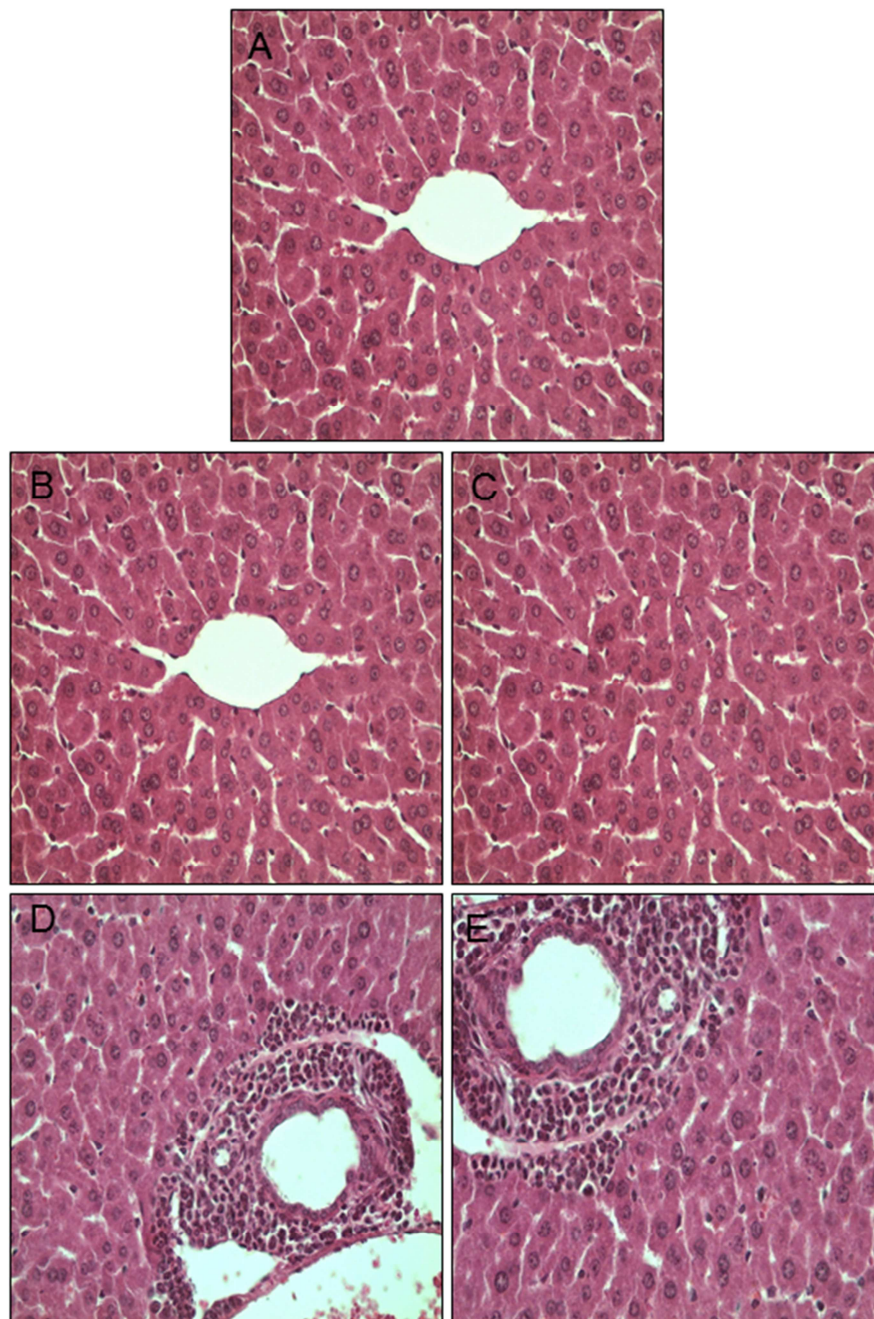


Figura 32. Infiltrado inflamatório no fígado de camundongos, após injeção de 0,5 μ g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*. A. Controle (solução salina fisiológica), B. Tpa9, ausência de efeito, C. Tpa11, ausência de efeito, D. Tpa10, infiltrado inflamatório, E. Tpa2, infiltrado inflamatório.

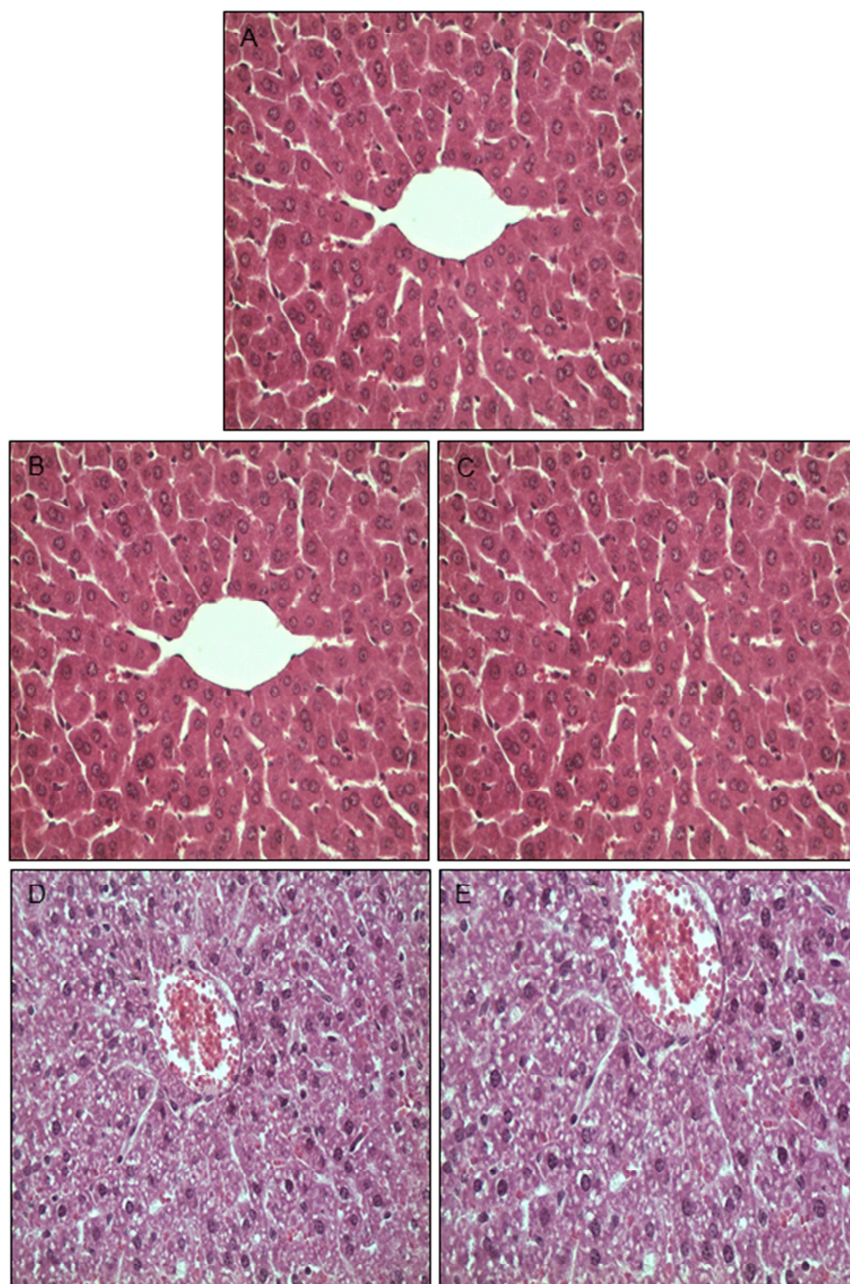


Figura 33. Degradação vacuolar no fígado de camundongos, após injeção de 0,5 μ /g-anima das NaScTx de *T. pachyurus*. A. Controle (solução salina fisiológica), B. Tpa9, ausência de efeito, C. Tpa11, ausência de efeito, D. Tpa10, degradação vacuolar, E. Tpa2, degradação vacuolar.

Tabela 5. Alterações hepáticas causadas no fígado de camundongos pela toxina Tpa9 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado

Camundongo	Efeito histológico no fígado da Tpa9	
	Degradação vacuolar	Infiltrado inflamatório
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	-	+
5	-	-

Tabela 6. Efeitos histológicos causados no fígado de camundongos da toxina Tpa10 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado

Camundongo	Efeito histológico no fígado da Tpa10	
	Degradação vacuolar	Infiltrado inflamatório
1	+	++
2	++	++
3	+	+++
4	+	++
5	-	+++

Tabela 7. Efeitos histológicos causados no fígado de camundongos da toxina Tpa11 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado

Camundongo	Efeito histológico no fígado da Tpa11	
	Degradação vacuolar	Infiltrado inflamatório
1	-	-
2	-	+
3	-	-
4	+	-
5	-	+

Tabela 8. Efeitos histológicos causados no fígado de camundongos da toxina Tpa2 após da injeção da dose 0,5 µ/g-animal. - ausente, + discreto, ++ moderado e +++ acentuado

Camundongo	Efeito histológico no fígado da Tpa2	
	Degradação vacuolar	Infiltrado inflamatório
1	+	+
2	+	++
3	+	++
4	+	+
5	+	++

Tabela 9. Resultados da análise estatística dos efeitos histopatológicos sobre fígado de camundongos após da injeção de uma dose de 0,5 μ /g-animal das toxinas Tpa9, Tpa10, Tpa11 e Tpa2 isoladas da peçonha do escorpião *T. pachyurus*. χ^2 valor de Qui-quadrado, **p-valor**, probabilidade $\leq 0,050$

Toxina	Degradação vacuolar		Infiltrado inflamatório	
	χ^2	p-valor	χ^2	p-valor
Tpa9	0,036	0,850	1,905	0,168
Tpa10	4,440	0,035	4,440	0,035
Tpa11	0,533	0,465	0,178	0,673
Tpa2	4,440	0,035	4,440	0,035

6. DISCUSSÃO

O escorpionismo é um problema de saúde pública mundial que, na América latina, é causado por escorpiões dos gêneros *Tityus* e *Centruroides* pertencentes à família Buthidae (Chippaux e Goyffon, 2008). A sintomatologia mais grave observada no escorpionismo é causada pela ação de toxinas que agem nos canais para Na^+ dependentes de voltagem de células excitáveis e não excitáveis (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005; Khattabi *et al.*, 2011). Este fato motiva a caracterização dessa classe de toxinas nas peçonhas dos escorpiões.

Na Colômbia, o escorpionismo mais grave é causado pela ação da peçonha do escorpião *T. pachyurus* (Otero *et al.*, 2004; Rodríguez, 2006), da qual se conhecia uma única toxina moduladora de canais para Na^+ , a Tpa2 caracterizada por Barona *et al.* (2006). No presente trabalho, esse número aumentou para oito.

Pela análise do transcrito da glândula de peçonha dessa espécie de escorpião foram descritas quatro novas NaScTxS putativas e, pela abordagem proteômica, outras três. Para evitar confusões, a nomenclatura dessas novas toxinas respeitou a numeração que foi adotada por Barona *et al.* (2006) que descreveram a Tpa1 (α -KTx13.3), a Tpa2 e a Tpa3 (função desconhecida). Assim, adotou-se Tpa para as toxinas de *Tityus pachyurus* e o número indicando a ordem cronológica de identificação da toxina, Tpa4, Tpa5, Tpa6, Tpa7 e Tpa8 obtidas pela abordagem transcritômica e Tpa9, Tpa10 e Tpa11 descritas na abordagem proteômica. Esse aumento no número de novas toxinas identificadas na peçonha do escorpião *T. pachyurus* foi possível pela utilização das abordagens transcritômica e proteômica. Alguns trabalhos ratificam a análise transcritômica como uma eficiente e importante ferramenta na descrição de novas toxinas putativas, moléculas atípicas e outros componentes proteicos (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009; Quintero-Hernández *et al.*, 2011). A abordagem proteômica também permite ampliar o conhecimento das peçonhas escorpiônicas, pela identificação rápida das massas moleculares das frações

obtidas após processos cromatográficos (Favreau *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2007). As duas abordagens usadas em conjunto tem levado ao aumento do número de novas toxinas identificadas (Sanz *et al.*, 2008), como visto no presente trabalho.

Das novas NaScTxS identificadas na peçonha do escorpião *T. pachyurus*, 4 foram classificadas como α NaScTx: as 3 putativas Tpa4, Tpa5 e Tpa6, por apresentarem similaridade na sequência de aminoácidos com toxinas alfa previamente descritas, e a Tpa10 pela similaridade estrutural e pelo efeito causado em canais de sódio. As outras toxinas identificadas foram classificadas como β NaScTx: duas putativas, Tpa7 e Tpa8, por apresentarem similaridade estrutural com outras β NaScTxS previamente descritas, e as Tpa9 e Tpa11, pelo efeito nas correntes de sódio e pela similaridade estrutural. É importante ressaltar que a Tpa8 é o primeiro registro de uma toxina β NaScTx anti-inseto excitatória para escorpiões do novo mundo (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Na Figura 26, observa-se o alinhamento múltiplo das sequências completas e parciais das NaScTx identificadas até o momento na peçonha do escorpião *T. pachyurus*.

As novas NaScTx putativas de *T. pachyurus* apresentam similaridade na sequência de aminoácidos com outras NaScTxS previamente descritas. Segundo essa similaridade estrutural, as toxinas Tpa4, Tpa5 e Tpa6 são classificadas como α NaScTxS, enquanto que as toxinas Tpa7 e Tpa8 como β NaScTx. Cabe ressaltar que dentre estas, a Tpa8 foi classificada como uma β NaScTx anti-inseto excitatória. A confirmação dessa classificação depende da avaliação da atividade dessas novas NaScTxS em canais para sódio.

Estudos de estrutura-função têm proposto para as α NaScTxS, a presença de duas superfícies ativas: o *core-domain* constituído por resíduos que formam o *loop* conector entre a primeira folha β e a α -hélice, e o *NC-domain* contendo os cinco resíduos entre as posições 8/9 a 12/13 na região N-terminal e um segmento de resíduos de aminoácidos ocupantes das posições 54-64 na extremidade C-terminal (Karbat *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2007). Como mencionado anteriormente, os peptídeos Tpa4, Tpa5 e Tpa6 foram classificados como α NaScTxS; sendo que a toxina putativa Tpa4, na análise filogenética, está agrupada no ramo 3 (Fig. 9) que corresponde à subfamília NaTx3

proposta por Guerrero-Vargas *et al.* (2012). Dentro dessa subfamília, estão as α NaScTxs de *T. serrulatus* Ts3 (Corona *et al.*, 1996) e Ts5 (Marangoni *et al.*, 1995), toxinas com efeito sobre mamíferos. Assim, por analogia com essas α NaScTx é possível sugerir os resíduos de aminoácidos que constituem o *NC-domain* da Tpa4, EYDNC (posições 8-12) e PIKTSGRCRP nas posições 55-64.

As toxinas putativas Tpa5 e Tpa6 ficaram agrupadas no ramo 7, correspondente à subfamília NaTx7 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Nesse agrupamento estão as α NaScTxs TdNa9 e TdNa10 (D'Suze *et al.*, 2009) de *T. discrepans*, que compartilham a região N-Terminal do *NC-domain* da α NaScTx inseticida LqhaIT (Eitan *et al.*, 1990). Desta forma, por similaridade estrutural com essas toxinas, pode-se inferir que as regiões N-terminais do *NC-domain* para as toxinas Tpa5 e Tpa6 sejam, respectivamente, KNNYCK e KNNNCK (posições 9-14). Fatos que sugerem que todo esse agrupamento é formado por α NaScTx inseticidas.

No primeiro ramo da análise filogenética, está incluída a toxina putativa Tpa7 junto às toxinas To15 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) de *T. obscurus*, Tz2 (Borges *et al.*, 2006) e TdNa6 (D'Suze *et al.*, 2009) de *T. discrepans*, todas classificadas como β NaScTxs (Fig. 1). Esse ramo corresponde à subfamília NaTx1 da classificação proposta por Guerrero-Vargas *et al.* (2012). As β NaScTxs têm duas superfícies ativas, a primeira é o farmacóforo estritamente associado à α -hélice do peptídeo, e a segunda é a região C-terminal e o *loop* conector da estrutura secundária do peptídeo (Gurevitz *et al.*, 2001;2007; Cohen *et al.*, 2005). O farmacóforo das β NaScTxs é considerado um *hot spot* da interação da toxina com o canal para Na^+ de insetos e mamíferos e que, entre as principais características, inclui a presença de resíduos de aminoácidos ácidos entre as posições 24-27 como a Glu (Cohen *et al.*, 2004; 2005).

Nesse primeiro ramo (Fig. 9), todas essas β NaScTxs têm resíduos de aminoácidos ácidos entre as posições 24-27, destacando-se Asp 26 na Tpa7 e Glu 27 nas toxinas To15, Tz2 e TdNa6. Na região C-terminal das β NaScTxs foi demonstrado que a presença de um Trp entre as posições 54-58 é importante na função da toxina, já que modificações químicas do Trp localizado nesse trecho do C-terminal, reduzem marcadamente a atividade biológica da toxina (Hassani *et al.*, 1999). Esta característica também é apresentada pelas toxinas

desse agrupamento que compartilham o Trp na posição 55, como pode ser visto na sequência consenso desse grupo de toxinas.

As β NaScTx anti-inseto excitatórias são peptídeos longos com 70-76 resíduos de aminoácidos, que compartilham algumas das características estruturais das demais β NaScTx (o arranjo folha β , α -hélice da estrutura secundária e estabilização da molécula por quatro pontes dissulfeto) (Cohen *et al.*, 2005; Gurevitz *et al.*, 2007). No entanto, nas β NaScTx anti-inseto excitatórias, a quarta ponte dissulfeto está deslocada com relação à posição ocupada nas demais β NaScTx, conferindo-lhe um arranjo $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ na estrutura secundária (Froy *et al.*, 1999; Gurevitz *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2004). Por similaridade com a toxina Bj-xtrIT do escorpião asiático *Buthotus judaicus* (Oren *et al.*, 1998), conforme indicado na figura 8, pode-se inferir que o farmacóforo da toxina putativa Tpa8 inclui os resíduos Glu25, Asp26 e Asp36, flanqueados por Phe33 e Val41.

A análise filogenética construída com as NaScTx de escorpiões do gênero *Tityus* sugere que a separação geográfica entre as espécies *T. pachyurus*, *T. obscurus*, *T. discrepans* e *T. zulianus*, distribuídos ao Norte da bacia Amazônica, e as espécies distribuídas ao Sul da bacia como *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. costatus* e *T. fasciolatus* levou a uma especiação desses peptídeos que provavelmente tem como consequência a diferenciação funcional. Essa separação geográfica coincide com a classificação das regiões morfoclimáticas (Amazonas, Guyana, Chocó, Mata Atlântica, Araucária, Chacao, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Savana Grande, Llanos e as regiões de transição entre o Cerrado e o Amazonas e entre o Pacífico e o Amazonas) dividida pela bacia do rio Amazonas (Wilson, 1988; Lourenço, 2001).

Lourenço (1994) postula que América do Sul apresenta um alto grau de endemismo nas espécies de escorpiões, principalmente nas regiões de transição entre o Amazonas e a Mata Atlântica, e entre o Amazonas-Andes-Pacífico ao Norte do rio Amazonas. Endemismo também observado nos marcados agrupamentos da análise filogenética entre as NaScTx de *T. pachyurus*, *T. obscurus*, *T. discrepans* e *T. zulianus*, Todas essas espécies

estão localizadas ao Norte da Bacia Amazônica e especificamente na região de transição Amazonas-Andes-Pacífico.

Essas diferenças ecogeográficas na América do Sul causadas pela bacia do rio Amazonas (Hoorn *et al.*, 2010), além de contribuírem com os processos de especiação do gênero *Tityus* também se refletiram na diversidade de NaScTxS descritas na peçonhas dos escorpiões desse gênero, sugerindo que podem existir diferenças na sintomatologia dos acidentes com escorpiões na América do Sul.

As toxinas Tpa7 e Tpa9 apresentaram homologia com as toxinas To15 de *T. obscurus*, Na6 de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009) e com a Tz2 de *T. zulianus* (Borges *et al.*, 2006) e que são β NaScTxS, agrupadas dentro da família NaTx1 conforme proposto em Guerrero-Vargas *et al.* (2012). Nas β NaScTxS, a superfície ativa está estritamente associada à alfa hélice da toxina (Cohen *et al.*, 2005). Quando se compara a estrutura primária das toxinas agrupadas dentro da subfamília NaTx1 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), se observa que as principais características moleculares que são essenciais para a atividade dessas toxinas nos canais para sódio (o farmacóforo) são similares às apresentadas pelas β NaScTxS anti-inseto depressoras. Uma vez que a Tpa9 provocou apenas uma pequena redução na corrente de sódio em hNav1.1 e não induziu alterações histopatológicas nos tecidos de camundongos, sugere-se que a Tpa9 possa ser uma β NaScTx com atividade em insetos.

A sequência parcial de aminoácidos da Tpa10 apresenta identidade com as α NaScTxS To9 e To10 de *T. obscurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), Na8 de *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2009), TbTx5 de *T. bahiensis* (Kalapothakis *et al.*, 2001), Tst3 de *T. stigmurus* (Batista *et al.*, 2007) e com a Ts3 de *T. serrulatus* (Corona *et al.*, 1996), como visto na Figura 16. A Tpa10 apresenta um efeito similar às α NaScTxS sobre canais para Na⁺ expressos em células HEK (figura 19b), logo, foi classificada como uma nova α NaScTx e que, por semelhança estrutural, passa a fazer parte da subfamília NaTx3 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Nas α NaScTxS, as superfícies ativas compreendem resíduos de aminoácidos do domínio central (*core domain*), da porção N e C-terminal (*NC-domain*) e da região entre as folhas β 2 e β 3 (Gordon *et al.*,

2007). Por meio da comparação das estruturas primárias dos peptídeos que constituem a subfamília NaTx3 e as α NaScTxS de escorpiões do velho mundo, pode-se inferir que o *core domain* das α NaScTxS de escorpiões do gênero *Tityus* é composto por aminoácidos ácidos e hidrofóbicos, e que a região que corresponde ao *NC-domain* é mais variável porém, com um C-terminal de características básicas. Esta característica estrutural coincide com o postulado por Gurevitz *et al.* (2001) de que as α NaScTxS têm uma superfície hidrofóbica conservada e uma pequena região do C-terminal variável nas características dos aminoácidos.

Como anteriormente mencionado, a Tpa10 causou retardamento da fase de inativação dos canais de Na⁺, um efeito característico das α NaScTxS, nos subtipos hNa_v1.1, hNa_v1.2, hNa_v1.3 e hNa_v1.6 (Figura 19b e tabela 2). Mutações na região que corresponde ao *core domain* da α NaScTx Lqh2, do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, reduziram os efeitos da toxina nos canais para Na⁺ (hNa_v1.1, rNa_v1.2, rNa_v1.3 e rNa_v1.6), confirmando a importância dos aminoácidos que constituem essa superfície ativa das α NaScTxS (Kahn *et al.* (2009) e Weinberger *et al.* (2010)

A Tpa10, após de ser injetada em camundongos, causou sintomas severos característicos de escorpionismo Classe II (Khatabi *et al.*, 2011) ($\chi^2= 8,0$; p-valor= 0,005) de maneira similar à sintomatologia reportada para a peçonha total de *T. pachyurus* que inclui ataxia, siarlorrêia, dispnéia, diarréia, priapismo, agitação e óbito (Barona *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2004; Rodríguez, 2008).

A Tpa10 também provocou alterações histopatológicas no fígado de camundongos, causando degeneração vacuolar e infiltrado inflamatório ($\chi^2= 4,440$; p-valor= 0,035). Em um estudo prévio, foram avaliados os efeitos histopatológicos da administração da peçonha total de *T. pachyurus* em camundongos, detectando-se congestão pulmonar, congestão hepática, degeneração vacuolar hepática e congestão renal (Rodríguez, 2008). Assim, a degeneração vacuolar e o infiltrado inflamatório hepático, causados pela Tpa10, podem ser o início das alterações apresentadas pela peçonha total sobre o fígado. Outros estudos confirmam os efeitos sobre o fígado, dado que a peçonha de escorpiões, uma vez inoculada em mamíferos, se distribui

rapidamente no corpo, atingindo órgãos como o fígado, rim, músculos, pulmões e coração (Sevcik *et al.*, 2004; D'Suze *et al.*, 2004a). As alterações sobre esses órgãos podem ser consequência dos efeitos secundários causados pela excessiva liberação de acetilcolina, adrenalina e noradrenalina. A liberação desses neurotransmissores ocorre após a despolarização das terminações nervosas quando as NaScTxs afetam diretamente os canais para Na⁺ de membranas excitáveis e, por isso, essas toxinas de escorpiões são classificadas como neurotoxinas (Teixeira *et al.*, 2001; Gwee *et al.*, 2002; Cecchini *et al.*, 2006; Petricevich *et al.*, 2007; Rodríguez, 2008; Guimarães *et al.*, 2011; Khattabi *et al.*, 2011).

A injeção da Tpa10 provocou dor nos camundongos, assim como mostrado para a peçonha total (Barona *et al.*, 2004; Rodríguez, 2008). Pouco se sabe sobre os componentes da peçonha que causam esse efeito e o mecanismo de ação. A α NaScTx CvIV4 de *Centruroides vittatus*, quando testada em canais Nav1.7 (relacionados ao mecanismo de nocicepção), causou uma rápida desativação do canal, o que leva à sensação de dor. No mesmo estudo, verificou-se que a CvIV4 também afeta os subtipos Na_v1.2, Na_v1.3 e Na_v1.4 (Rowe *et al.*, 2011).

Outro efeito causado pela Tpa10 foi o infiltrado inflamatório no fígado. Rodríguez (2008) descreveu infiltrados inflamatórios no fígado, rins e pulmões causados pela peçonha total de *T. pachyurus*. A peçonha total de *Androctonus australis* e sua α NaScTx Aah II causaram infiltrados inflamatórios em ratos, envolvendo a liberação de neutrófilos no sangue e acúmulo de neutrófilos nos tecidos. Essa infiltração celular também foi associada a uma excessiva liberação de histamina e citocinas, sugerindo-se que a Aah II se liga aos canais para Na⁺ ativando a cascata de eventos que causam a inflamação (Raouraoua-Boukari *et al.*, 2012).

A toxina Tpa11 isolada neste trabalho é classificada como uma nova β NaScTx, e a sequência parcial de aminoácidos apresenta uma alta identidade com outras β toxinas (Figura 18): 97% com a To12 de *T. obscurus* (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), 81% com a Tb2-II de *T. bahiensis* (Pimenta *et al.*, 2001a), 77% com a Ts2 de *T. serrulatus* (Possani *et al.*, 1991) e 74% com a Tb2 de *T. bahiensis* (Becerril *et al.*, 1996). Sua classificação como β NaScTx é reforçada

pelo efeito causado em canais para Na⁺ expressos em células *HEK* (Figura 19a e tabela 2). A Tpa11 está agrupada na subfamília NaTx5 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). A subfamília NaTx1, onde foi incluída a Tpa9, compartilha as mesmas características estruturais do farmacóforo da subfamília NaTx5 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012), sugerindo que a Tpa11, embora cause efeito de uma β NaScTx em canais para sódio de mamíferos (Figura 19a e tabela 2), pode, também, ter efeito em canais para sódio de insetos.

A Tpa2 é uma β NaScTx previamente descrita por Barona *et al.* (2006). No presente trabalho, sua classificação como β NaScTx foi corroborada pelos efeitos causados nos subtipos de canais para Na⁺ hNav 1.2, hNav 1.3 e hNav 1.6 (figura 19a, tabela2). Na classificação proposta por nosso grupo de trabalho, a Tpa2 é agrupada com a Tc49 de *T. obscurus* na subfamília NaTx12 (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Após a injeção em camundongos, observou-se a manifestação de efeitos que foram considerados causadores de escorpionismo Classe II ($\chi^2= 8,0$; p-valor= 0,005), além das alterações histopatológicas (degradação vacuolar e infiltrado inflamatório), que podem ser explicadas pelos efeitos secundários gerados como consequência do efeito neurotóxico das NaScTxs (Teixeira *et al.*, 2001; Gwee *et al.*, 2002; Cupo *et al.*, 2003; Chippaux e Goyffon, 2008; Guimaraes *et al.*, 2011).

As toxinas Tpa10 e Tpa2, como mencionado anteriormente, são responsáveis por manifestações graves do escorpionismo (Classe I e Classe II) e por alterações histopatológicas no fígado de camundongos. Esses sintomas do escorpionismo e as alterações no fígado são comparáveis com os dados de Rodríguez (2008) ao avaliar a peçonha total de *T. pachyurus*. Embora este autor reporte alterações hepáticas, foram descritas, também, outras alterações histopatológicas em órgãos como pulmão (congestão pulmonar, edema pulmonar e microtromboses pulmonar), rim (congestão renal e congestão suprarrenal), baço (congestão esplênica), e pâncreas (congestão pancreática). A maioria desses sintomas e alterações histológicas são apresentados também pelos efeitos das peçonhas dos escorpiões *T. discrepans* (D'Suze *et al.*, 2010) e *T. zulianus* (Trejo *et al.*, 2011), *T. serrulatus* (Teixeira *et al.*, 2001) e *T. fasciolatus* (Guimarães *et al.*, 2011), e *Androctonus australis* (Adi-Bessalem *et al.*, 2008). Os efeitos sistêmicos da peçonha e das toxinas isoladas de

escorpiões devem-se, em grande parte, à descarga massiva de catecolaminas, acetilcolina, adrenalina e noradrenalina, como resultado da despolarização dos terminais pré e pós-sinápticos do sistema nervoso (Gwee *et al.*, 2002; Mazzei de Dávila *et al.*, 2002; Cupo *et al.*, 2003; Chippaux e Goyffon, 2008). De modo geral, essa despolarização é causada pela entrada excessiva do íon Na⁺ nas células excitáveis e não excitáveis alterando a transmissão dos impulsos nervosos (Randall *et al.*, 2001).

Já no caso da peçonha de escorpiões, essa entrada irregular de Na⁺ nas células é causada pela ação das α NaScTxs e β NaScTxs. As primeiras produzem esse efeito prolongando a etapa de inativação do canal e se ligando ao sítio três do domínio IV do canal para sódio (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005; Bosmans e Tytgat, 2007) e as β NaScTxs também retardam a inativação do canal, porém levando os potenciais de membrana a serem mais negativos, produzindo uma hiperpolarização ao ligar-se ao sítio 4 no domínio II do canal (Cohen *et al.*, 2005; Rodríguez de la Vega e Possani, 2007). A presença de α NaScTxs e β NaScTxs na peçonha de *T. pachyurus* pode explicar os efeitos mostrados pela peçonha total sobre camundongos (Rodríguez, 2008).

Entre os tecidos estudados no presente trabalho, a Tpa10 e Tpa2 causaram, nos camundongos, apenas alterações no fígado enquanto que a peçonha total de *T. pachyurus*, como mencionado acima, afeta pulmão, baço, fígado, rim e pâncreas. Essas múltiplas alterações sistêmicas provocadas pela peçonha total devem-se, provavelmente, à ação sinérgica das NaScTxs e/ou destas com as demais moléculas presentes na peçonha. Vários trabalhos mostram efeitos diferentes quando são avaliadas as atividades biológicas de peçonhas totais de escorpiões, das frações das peçonhas ou das toxinas isoladas (Dehesa-Dávila *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2004b; Brazón *et al.*, 2008; D'Suze *et al.*, 2010). Uma característica das peçonhas de escorpiões do gênero *Tityus* é ter, dentre seus constituintes, enzimas (Pessini *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2004). Essas enzimas têm, entre suas funções, ação em células e tecidos facilitando a dispersão e propagação das toxinas. Quando a toxina Ts1 foi injetada em ratos na presença da enzima hialuronidase,

ambas isoladas de *T. serrulatus*, os efeitos da Ts1 apareceram mais cedo que quando a toxina foi administrada sozinha (Pessini *et al.*, 2001).

A análise dos trabalhos de Barona *et al.* (2004, 2006) sugere a presença de enzimas na peçonha de *T. pachyurus*, pois relatam bandas em eletroforese (PAGE) e compostos com massas moleculares equivalentes a enzimas.

As alterações no fígado causadas pelas toxinas Tpa10 e Tap2, assim como aquelas produzidas pela peçonha total (Rodríguez, 2008), podem ser explicadas pela rápida liberação de mediadores de inflamação como IL1- α , IL6 e TNF- α e outros produtos de ativação de macrófagos, conforme já foi demonstrado para peçonhas de outros Buthidae (Borges *et al.*, 2004b; D'Suze *et al.*, 2004a, 2007; Adi-Bessalem *et al.*, 2008; Petricevich, 2010; Trejo *et al.*, 2011) e para toxinas escorpiônicas purificadas (Corrêa *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2001; Bertazzi *et al.*, 2003; Petricevich *et al.*, 2007; Raouraoua-Boukari *et al.*, 2012).

A peçonha de *T. pachyurus* provoca congestão hepática, degeneração vacuolar e necrose de hepatócitos de maneira dose-dependente (Rodríguez, 2008). Inferindo-se um decurso temporal, as toxinas Tpa10 e Tpa2, injetadas em dose única de 500 nM, tiveram seus efeitos tipo α e β -NaScTx, respectivamente, causando efeitos adrenérgicos e colinérgicos, levando os camundongos a manifestarem agitação, sialorréia, rinorréia, ataxia, priapismo, mioclonia e diarreia, resultando em mal-estar geral e estresse, estimulando ainda mais o sistema nervoso simpático, que por sua vez liberaria os neurotransmissores relacionados como o estresse (adrenalina, noradrenalina e dopamina) (Randall *et al.*, 2001).

A sialorréia, dispnéia e agitação produzem uma situação de hipóxia, da qual, aparentemente, o fígado é o órgão mais afetado, sofrendo as alterações que iniciam com o infiltrado inflamatório seguido da degeneração vacuolar. Essas alterações são o efeito colateral causado pelos mediadores inflamatórios, demonstrado em experimentos realizados com a peçonha total de *T. discrepans*, em carneiros (D'Suze *et al.*, 2004a), e com toxinas purificadas, β NaScTx toxina gamma de *T. serrulatus* (Petricevich *et al.*, 2007) e o toxina α Aahl de *A. australis* (Raouraoua-Boukari *et al.*, 2012). Este

raciocínio ratifica que após os efeitos neurotóxicos das toxinas e peçonhas há uma liberação de mediadores inflamatórios que causam alterações histológicas em vários órgãos como fígado, pâncreas, rins e pulmões.

7. CONCLUSÕES.

Como previamente reportado por Barona *et al.* (2004, 2006) e Rodríguez (2008), a peçonha do escorpião *T. pachyurus* causa problemas graves de escorpionismo na Colômbia. O presente trabalho contribui para o melhor entendimento da sintomatologia desses acidentes uma vez que descreve novas NaScTxs na peçonha dessa espécie. Oito novas NaScTxs foram, sendo 4 determinadas pelo transcrito da glândula de peçonha (Tpa4, Tpa5, Tpa6, Tpa7 e Tpa8), e 3 identificadas pela abordagem proteômica (Tpa9, Tpa10 e Tpa11).

É reportada pela primeira vez, para escorpiões butídeos do novo mundo, uma toxina putativa β NaScTx anti-inseto excitatória, a Tpa8.

A análise filogenética das NaScTxs mostra uma separação entre as NaScTxs que coincide com a separação geográfica das espécies de escorpiões do gênero *Tityus*, favorecida pela bacia do rio Amazonas.

Os efeitos eletrofisiológicos confirmam a classificação da Tpa10 como uma α NaScTx, tóxica em mamíferos, o que contribui para o esclarecimento e entendimento do escorpionismo severo, em humanos, causado pela peçonha de *T. pachyurus*.

A Tpa11 é classificada como uma β NaScTx moduladora de canais para Na^+ de mamíferos.

Demonstra-se que a Tpa2, previamente identificada por Barona *et al.* (2006) e classificada como β NaScTx, tem atividade sobre 3 subtipos diferentes de canais para Na^+ de mamíferos.

A α NaScTx Tpa10 e a β NaScTx Tpa11 causam, em camundongos, escorpionismo Classe I e Classe II.

Os resultados sugerem que as alterações histopatológicas sobre o fígado são efeitos secundários, como consequência dos efeitos neurotóxicos causados pela Tpa2, Tpa9, Tpa10 e Tpa11.

É ratificado que a peçonha de *T. pachyurus* é tóxica em mamíferos e que o escorpionismo Classe I, II, e III em humanos provavelmente é resultado da ação sinérgica de suas toxinas.

8. PERSPECTIVAS

Conclusão das sequências das toxinas Tpa9, Tpa10 e Tpa11 por sequenciamento automático de Edman.

Aprofundar na avaliação eletrofisiológica das toxinas Tpa2, Tpa9, Tpa10 e Tpa11. Testando-as em diferentes doses e usando além de isoformas de canais para Na⁺ de mamíferos, também canais para Na⁺ de insetos.

Identificar os mediadores da cascata inflamatória produzidos ao injetar as toxinas Tpa2, Tpa9, Tpa10 e Tpa11, em ratos.

Isolar e caracterizar o peptídeo correspondente à toxina putativa Tpa8, classificada como a primeira β NaScTx anti-inseto excitatória para o gênero *Tityus*.

Buscar e caracterizar biologicamente os peptídeos correspondentes às toxinas putativas Tpa4, Tpa5, Tpa6 e Tpa7.

9. BIBLIOGRAFIA

- Adi-Bessalem, S., D. Hammoudi-Triki, and F. Laraba-Djebari. 2008. Pathophysiological effects of *Androctonus australis* hector scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 60(4-5): 373-80.
- Barona, J., C.V.F. Batista, F.Z. Zamudio, F. Gomez-Lagunas, E. Wanke, R. Otero, and L.D. Possani. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ - and K⁺ -channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et biophysica acta* 1764(1): 76-84.
- Barona, J., R. Otero, and V. Núñez. 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en latinoamérica. *Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud* 24(1): 42-9.
- Batista, C.V.F., G. D'Suze, F. Gómez-Lagunas, F.Z. Zamudio, S. Encarnación, C. Sevcik, and L.D. Possani. 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics* 6(12): 3718-27.
- Batista, C.V.F., L. del Pozo, F.Z. Zamudio, S. Contreras, B. Becerril, E. Wanke, and L.D. Possani. 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, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 803(1): 55-66.
- Batista, C.V.F., S. a Román-González, S.P. Salas-Castillo, F.Z. Zamudio, F. Gómez-Lagunas, and L.D. Possani. 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 146(1-2): 147-57.
- Batista, C.V.F., F.Z. Zamudio, S. Lucas, J.W. Fox, A. Frau, G. Prestipino, and L.D. Possani. 2002. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon* 40(5): 557-62.
- Becerril, B., M. Corona, F.I. Coronas, F. Zamudio, E.S. Calderon-Aranda, P.L. Fletcher, B.M. Martin, and L.D. Possani. 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *The Biochemical journal* 313 (Pt 3: 753-60.
- Becerril, B., S. Marangoni, and L.D. Possani. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 35(6): 821-35

- Bertazzi, D.T., A.I. de Assis-Pandochi, A.E.C.S. Azzolini, V.L. Talhaferro, M. Lazzarini, and E.C. Arantes. 2003. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon* 41(4): 501-8.
- Billen, B., F. Bosmans, and J. Tytgat. 2008. Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Current pharmaceutical design* 14(24): 2492-502.
- Borges, A., M.J. Alfonzo, C.C. García, N.J. Winand, E. Leipold, and S.H. Heinemann. 2004a. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel beta-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon* 43(6): 671-84.
- Borges, A., C.C. García, E. Lugo, M.J. Alfonzo, M.J. Jowers, and H.J.M. Op den Camp. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 142(3-4): 240-52.
- Borges, A., E. Trejo, A.M. Vargas, G. Céspedes, A. Hernández, and M.J. Alfonzo. 2004b. Pancreatic toxicity in mice elicited by *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* scorpion venoms. *Investigación clínica* 45(3): 269-76.
- Bosmans, F., and J. Tytgat. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon* 49(2): 142-58.
- Botero-Trujillo, R., and G. Fagua. 2007. Additions to the knowledge of the geographical distribution of some Colombian Scorpions (Buthidae : Revista Ibérica de Aracnología 14(31): 129-134.
- Brazón, J., B. Guerrero, C.L. Arocha-Piñango, C. Sevcik, and G. D'Suze. 2008. Effect of *Tityus discrepans* scorpion venom on global coagulation test. Preliminary studies. *Investigación clínica* 49(1): 49-58.
- Brusca, R.C., G.J. Brusca, and N.J. Haver. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates; 2 edition.
- Camargos, T.S., R. Restano-Cassulini, L.D. Possani, S. Peigneur, J. Tytgat, C.A. Schwartz, E.M.C. Alves, S.M. de Freitas, and E.F. Schwartz. 2011. The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 32(7): 1509-17.
- Catterall, W.A., S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, F.H. Yu, K. Konoki, and T. Scheuer. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49(2): 124-41.
- Catterall, W.A., A.L. Goldin, and S.G. Waxman. 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews* 57(4): 397-409.

- Cecchini, A.L., F. Vasconcelos, S.G. Amara, J.R. Giglio, and E.C. Arantes. 2006. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTX-V on neurotransmitter uptake in vitro. *Toxicology and applied pharmacology* 217(2): 196-203.
- Celis, A., R. Gaxiola-robles, and E. Sevilla-godínez. 2007. Tendencia de la mortalidad por picaduras de alacrán en México , 1979 – 2003. *Revista Panamericana de Salud Pública* 21(1): 373-380.
- Chippaux, J.-P., and M. Goyffon. 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica* 107(2): 71-9.
- Chávez-Olórtegui, C., E. Kalapothakis, A.M. Ferreira, A.P. Ferreira, and C.R. Diniz. 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35(2): 213-21.
- Cohen, L., I. Karbat, N. Gilles, O. Froy, G. Corzo, R. Angelovici, D. Gordon, and M. Gurevitz. 2004. Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative “hot spot” common to all scorpion beta-toxins affecting Na⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* 279(9): 8206-11.
- Cohen, L., I. Karbat, N. Gilles, N. Ilan, M. Benveniste, D. Gordon, and M. Gurevitz. 2005. Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *The Journal of biological chemistry* 280(6): 5045-53.
- Cologna, C.T., S. Marcussi, J.R. Giglio, A.M. Soares, and E.C. Arantes. 2009. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein and peptide letters* 16(8): 920-32.
- Corona, M., M. Zurita, L.D. Possani, and B. Becerril. 1996. Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Toxicon* 34(2): 251-6.
- Corrêa, M.M., S.V. Sampaio, R. a Lopes, L.C. Mancuso, O. a Cunha, J.J. Franco, and J.R. Giglio. 1997. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon* 35(7): 1053-67.
- Cupo, P., M. de Azevedo-Marques, and S.E. Hering. 2003. ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS: ESCORPIÕES E ARANHAS. *Medicina, Ribeirão Preto* V(36): 490-497.
- DeBin, J.A., J.E. Maggio, and G.R. Strichartz. 1993. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *The American journal of physiology* 264(2 Pt 1): C361-9.

- Dehesa-Dávila, M., A.N. Ramírez, F.Z. Zamudio, G. Gurrola-Briones, A. Liévano, A. Darszon, and L.D. Possani. 1996. Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 113(2): 331-9.
- Demeure, K., V. Gabelica, and E.A. De Pauw. 2010. New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21(11): 1906-17.
- Diego-García, E., Y. Abdel-Mottaleb, E.F. Schwartz, R.C.R. de la Vega, J. Tytgat, and L.D. Possani. 2008. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(1): 187-200.
- Diego-García, E., C.V.F. Batista, B.I. García-Gómez, S. Lucas, D.M. Candido, F. Gómez-Lagunas, and L.D. Possani. 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* 45(3): 273-83.
- Díaz, P., G. D'Suze, V. Salazar, C. Sevcik, J.D. Shannon, N.E. Sherman, and J.W. Fox. 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon* 54(6): 802-17.
- D'Suze, G., F. Corona, L.D. Possani, and C. Sevcik. 1996. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 34(5): 591-8.
- D'Suze, G., P. Díaz, V. Salazar, C. Sevcik, and J. Brazón. 2007. Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 50(8): 1116-25.
- D'Suze, G., V. Salazar, P. Díaz, C. Sevcik, H. Azpurua, and N. Bracho. 2004a. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 44(8): 851-60.
- D'Suze, G., E.F. Schwartz, B.I. García-Gómez, C. Sevcik, and L.D. Possani. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie* 91(8): 1010-9.
- D'Suze, G., C. Sevcik, M. Corona, F.Z. Zamudio, C.V.F. Batista, F.I. Coronas, and L.D. Possani. 2004b. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 43(3): 263-72.
- D'Suze, G., C. Sevcik, and J. Brazón. 2010. Fisipatología inducida por el veneno de alcranes del género *Tityus* de Venezuela. p. 31-64. *In Edición*

especia , novena reunión internacional de expertos en envenenamiento por animales ponzoñosos. México.

- Eitan, M., E. Fowler, R. Herrmann, A. Duval, M. Pelhate, and E. Zlotkin. 1990. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry* 29(25): 5941-7.
- Estrada, G., R. Restano-Cassulini, E. Ortiz, L.D. Possani, and G. Corzo. 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): 75-9.
- Favreau, P., L. Menin, S. Michalet, F. Perret, O. Cheneval, M. Stöcklin, P. Bulet, and R. Stöcklin. 2006. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* 47(6): 676-87.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- Flórez, E. 2001. Escorpiones de la familia Buthidae (chelicerata: scorpiones) de Colombia. *Biota Colombiana* 2(1): 25- 30.
- Flórez, E. 2007. Los escorpiones enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. *Innovación y Ciencia* 2(1): 25-30.
- Froy, O., N. Zilberberg, D. Gordon, M. Turkov, N. Gilles, M. Stankiewicz, M. Pelhate, E. Loret, D.A. Oren, B. Shaanan, and M. Gurevitz. 1999. The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins. *The Journal of biological chemistry* 274(9): 5769-76.
- Fuller, M.D., C.H. Thompson, Z.-R. Zhang, C.S. Freeman, E. Schay, G. Szakács, E. Bakos, B. Sarkadi, D. McMaster, R.J. French, J. Pohl, J. Kubanek, and N. a McCarty. 2007. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *The Journal of biological chemistry* 282(52): 37545-55.
- García, C., E.S. Calderón-Aranda, G.A.V. Anguiano, B. Becerril, and L.D. Possani. 2003. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 41(4): 417-27.
- García, M.L., Y. Gao, O.B. McManus, and G.J. Kaczorowski. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39(6): 739-48.
- Goldin, A.L., R.L. Barchi, J.H. Caldwell, F. Hofmann, J.R. Howe, J.C. Hunter, R.G. Kallen, G. Mandel, M.H. Meisler, Y.B. Netter, M. Noda, M.M. Tamkun,

- S.G. Waxman, J.N. Wood, and W.A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28(2): 365-8.
- Goldin, A.L. 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology* 63: 871-94.
- González-Sponga, M.A. 1996. Guía para identificar escorpiones de Venezuela. Lagoven, Caracas.
- Gordon, D., I. Karbat, N. Ilan, L. Cohen, R. Kahn, N. Gilles, K. Dong, W. Stühmer, J. Tytgat, and M. Gurevitz. 2007. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon* 49(4): 452-72.
- Gueron, M., R. Ilia, and G. Margulis. 2000. Arthropod poisons and the cardiovascular system. *The American journal of emergency medicine* 18(6): 708-14.
- Guerrero-Vargas, J.A., and J.R. Rodríguez. 2011. Geographical and altitudinal distribution of scorpionism in Colombia. p. 196-198. *In* 17 Congress of the European Section of the International Society on Toxinology. Valencia, Spain.
- Guerrero-Vargas, J.A., M. Libério, and M.S. Castro. 2008. Aplicación biotecnológica de la Toxinología: La importancia del veneno de escorpiones y la secreción cutánea de anuros. *Innovación y Ciencia* 15(2): 16-25.
- Guerrero-Vargas, J.A., C.B.F. Mourão, V. Quintero-Hernández, L.D. Possani, and E.F. Schwartz. 2012. Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺-Channel Scorpion Toxins. *PloS ONE* 7(2): e30478.
- Guimaraes, P., M. Pinto, and M. Melo. 2011. Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por *Tityus fasciolatus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(6): 1382-1390.
- Gurevitz, M., D. Gordon, S. Ben-Natan, M. Turkov, and O. Froy. 2001. Diversification of neurotoxins by C-tail "wiggling": a scorpion recipe for survival. *The FASEB journal* 15(7): 1201-5.
- Gurevitz, M., I. Karbat, L. Cohen, N. Ilan, R. Kahn, M. Turkov, M. Stankiewicz, W. Stühmer, K. Dong, and D. Gordon. 2007. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon* 49(4): 473-89.
- Gwee, M.C.E., S. Nirthanan, H.-E. Khoo, P. Gopalakrishnakone, R.M. Kini, and L.-S. Cheah. 2002. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 29(9): 795-801.

- Gómez, J.P., and R. Otero. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública* 25(1): 50-60.
- Gómez, J.P., R. Otero, V. Núñez, M. Saldarriaga, A. Díaz, and M. Velásquez. 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB* (4): 159-165.
- Gómez, J., J. Quintana, P. Arbeláez, J. Fernández, J. Silva, J. Barona, J. Gutiérrez, A. Díaz, and R. Otero. 2010. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud* 30(1): 126-39.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hassani, O., P. Mansuelle, S. Cestèle, M. Bourdeaux, H. Rochat, and F. Sampieri. 1999. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts gamma) from the scorpion *Tityus serrulatus*. *European journal of biochemistry / FEBS* 260(1): 76-86.
- Hoorn, C., F.P. Wesselingh, H. ter Steege, M.A. Bermudez, A. Mora, J. Sevink, I. Sanmartín, A. Sanchez-Meseguer, C.L. Anderson, J.P. Figueiredo, C. Jaramillo, D. Riff, F.R. Negri, H. Hooghiemstra, J. Lundberg, T. Stadler, T. Särkinen, and A. Antonelli. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science (New York, N.Y.)* 330(6006): 927-31.
- Huang, X. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research* 9(9): 868-877.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., A.T.C. Ching, E. Carvalho, F. Faria, M.Y. Nishiyama, P.L. Ho, and M.R.V. Diniz. 2006. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics* 173(2): 877-89.
- Kahn, R., I. Karbat, N. Ilan, L. Cohen, S. Sokolov, W.A. Catterall, D. Gordon, and M. Gurevitz. 2009. Molecular requirements for recognition of brain voltage-gated sodium channels by scorpion alpha-toxins. *The Journal of biological chemistry* 284(31): 20684-91.
- Kalapothakis, E., S. Jardim, a C. Magalhães, T.M. Mendes, L. De Marco, L.C. Afonso, and C. Chávez-Olórtegui. 2001. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 39(5): 679-85.
- Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessell. 2000. Principles of neural science. 4th ed. McGraw-Hill.

- Karbat, I., F. Frolow, O. Froy, N. Gilles, L. Cohen, M. Turkov, D. Gordon, and M. Gurevitz. 2004. Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins. *The Journal of biological chemistry* 279(30): 31679-86.
- Khattabi, A., R. Soulaymani-Bencheikh, S. Achour, and L.-R. Salmi. 2011. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105(7): 364-9.
- Kirsch, G.E., A. Skattebøl, L.D. Possani, and A.M. Brown. 1989. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *The Journal of general physiology* 93(1): 67-83.
- Lazo, G.R., J. Tong, R. Miller, C. Hsia, C. Rausch, Y. Kang, and O.D. Anderson. 2001. Software scripts for quality checking of high-throughput nucleic acid sequencers. *BioTechniques* 30(6): 1300-5.
- Loret, E., and B.D. Hammock. 2001. Structure and neurotoxicity of venoms. p. 204-233. *In* Brownell, P., Polis, G. (eds.), *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, USA, New York.
- Loret, E.P., M.F. Martin-Eauclaire, P. Mansuelle, F. Sampieri, C. Granier, and H. Rochat. 1991. An anti-insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis* Hector also acts on the alpha- and beta-sites of the mammalian sodium channel: sequence and circular dichroism study. *Biochemistry* 30(3): 633-40.
- López-González, I., T. Olamendi-Portugal, J.L. De la Vega-Beltrán, J. Van der Walt, K. Dyason, L.D. Possani, R. Felix, and A. Darszon. 2003. Scorpion toxins that block T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. *Biochemical and biophysical research communications* 300(2): 408-14.
- Lourenço, W.R. 2001. Scorpion Diversity in Tropical South America. p. 448. *In* Brownell, P., Polis, G. (eds.), *Scorpion Biology and Research*. OUP USA.
- Lourenço W.R. 1994. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. *Biogeographica* 70: 155-160.
- Ma, Y., R. Zhao, Y. He, S. Li, J. Liu, Y. Wu, Z. Cao, and W. Li. 2009. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. *BMC genomics* 10: 290.
- Marangoni, S., J. Ghiso, S.V. Sampaio, E.C. Arantes, J.R. Giglio, B. Oliveira, and B. Frangione. 1990. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Journal of protein chemistry* 9(5): 595-601.

- Marangoni, S., M.H. Toyama, E.C. Arantes, J.R. Giglio, C.A. da Silva, E.M. Carneiro, A.A. Gonçalves, and B. Oliveira. 1995. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochimica et biophysica acta* 1243(3): 309-14.
- Martin-Eauclaire, M.F., B. Céard, A.M. Ribeiro, C.R. Diniz, H. Rochat, and P.E. Bougis. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS letters* 302(3): 220-2.
- Mazzei de Dávila, C.A., D.F. Dávila, J.H. Donis, G.A. de Bellabarba, V. Villarreal, and J.S. Barboza. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 40(9): 1339-46.
- Mejías, R., C. Yáñez, R. Arias, R. Mejías, Z. de Arias, and J. Luna. 2007. Ocurrencia de escorpionismo en los distritos sanitarios del estado Mérida , Venezuela . *Investigación Clínica* 48(2): 147-153.
- Montoya, M., and L. Armas. 2002. Escorpiones (Arachnida) del Archipiélago de Bocas del Toro , Panamá. *Revista de Biología Tropical* 50(1): 155-160.
- Murgia, A.R., C.V.F. Batista, G. Prestipino, and L.D. Possani. 2004. Amino acid sequence and function of a new alpha-toxin from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei*. *Toxicon* 43(6): 737-40.
- Nascimento, D.G., B. Rates, D.M. Santos, T. Verano-Braga, A. Barbosa-Silva, A. a a Dutra, I. Biondi, M.F. Martin-Eauclaire, M.E. De Lima, and A.M.C. Pimenta. 2006. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 47(6): 628-39.
- Nei, M., and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, USA.
- Olamendi-Portugal, T., B.I. García, I. López-González, J. Van Der Walt, K. Dyason, C. Ulens, J. Tytgat, R. Felix, A. Darszon, and L.D. Possani. 2002. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochemical and biophysical research communications* 299(4): 562-8.
- Oren, D.A., O. Froy, E. Amit, N. Kleinberger-Doron, M. Gurevitz, and B. Shaanan. 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. *Structure (London, England : 1993)* 6(9): 1095-103.
- Otero, R., E. Navío, F.A. Céspedes, M.J. Núñez, L. Lozano, E.R. Moscoso, C. Matallana, N.B. Arsuza, J. García, D. Fernández, J.H. Rodas, O.J. Rodríguez, J.E. Zuleta, J.P. Gómez, M. Saldarriaga, J.C. Quintana, V.

- Núñez, S. Cárdenas, J. Barona, R. Valderrama, N. Paz, A. Díaz, O.L. Rodríguez, M.D. Martínez, R. Maturana, L.E. Beltrán, M.B. Mesa, J. Paniagua, E. Flórez, and W.R. Lourenço. 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98(12): 742-50.
- Otero, R., F. Uribe, and A. Sierra. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actualizaciones Pediátricas* 8(3): 88-92.
- Pessini, A.C., T.T. Takao, E.C. Cavalheiro, W. Vichnewski, S.V. Sampaio, J.R. Giglio, and E.C. Arantes. 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39(10): 1495-504.
- Petricevich, V.L. 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators of inflammation* 2010: 903295.
- Petricevich, V.L., A. Hernández Cruz, F.I.V. Coronas, and L.D. Possani. 2007. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon* 50(5): 666-75.
- Pimenta, A.M., M. Martin-Eauclaire, H. Rochat, S.G. Figueiredo, E. Kalapothakis, L.C. Afonso, and M.E. De Lima. 2001a. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon* 39(7): 1009-19.
- Pimenta, A.M., R. Stöcklin, P. Favreau, P.E. Bougis, and M.F. Martin-Eauclaire. 2001b. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 15(17): 1562-72.
- Pineda Rivera, D., and J.A. Castellanos. 1998. Escorpionismo en Girardot Hospital San Rafael: Enero-Junio de 1994. *Tribuna Médica* 98(1): 19-28.
- Possani, L.D., B.M. Martin, M.D. Fletcher, and P.L. Fletcher. 1991. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *The Journal of biological chemistry* 266(5): 3178-85.
- Possani, L.D., E. Merino, M. Corona, F. Bolivar, and B. Becerril. 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82(9-10): 861-8.
- Quintero-Hernández, V., E. Ortiz, M. Rendón-Anaya, E.F. Schwartz, B. Becerril, G. Corzo, and L.D. Possani. 2011. Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression. *Toxicon* 58(8): 644-63.

- Randall, D., W. Burggren, and K. French. 2001. Animal physiology, mechanism and adaptations. 5th ed. Hardcover.
- Raouraoua-Boukari, R., S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki, M.-F. Martin-Eauclaire, and F. Laraba-Djebari. 2012. Immunomodulation of the Inflammatory Response Induced by *Androctonus australis* hector Neurotoxins: Biomarker Interactions. *Neuroimmunomodulation* 19(2): 103-110
- Rodríguez, J.R. 2006. CIGITOX-BASE DE DATOS (Centro de información, manejo e investigación en Toxicología) Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez, J.R. 2008. Determinación del efecto clínico e histopatológico causado por el veneno del escorpión *Tityus pachyurus* (Buthidae), en ratones cepa ICR. 103.
- Rodríguez de la Vega, R.C., and L.D. Possani. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43(8): 865-75.
- Rodríguez de la Vega, R.C., and L.D. Possani. 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., and L.D. Possani. 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 49(2): 171-80.
- de Roodt, A.R., N.R. Lago, O.D. Salomón, R.D. Laskowicz, L.E. Neder de Román, R. a López, T.E. Montero, and V.D.V. Vega. 2009. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*. *Toxicon* 53(1): 1-8.
- Rowe, A.H., Y. Xiao, J. Scales, K.D. Linse, M.P. Rowe, T.R. Cummins, and H.H. Zakon. 2011. Isolation and characterization of CvIV4: a pain inducing α -scorpion toxin. *PloS one* 6(8):17-26.
- Ruppert, E.E., R.S. Fox, and R.D. Barnes. 2003. Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach. Brooks Cole; 7 edition.
- Sambrook, J., and D. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition. Third. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition, New York.
- Sampaio, S.V., E.C. Arantes, W.A. Prado, F. Riccioppo Neto, and J.R. Giglio. 1991. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 29(6): 663-72.
- Sanz, L., J. Escolano, M. Ferretti, M.J. Biscoglio, E. Rivera, E.J. Crescenti, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, and J.J. Calvete. 2008. Snake

venomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *Journal of proteomics* 71(1): 46-60.

- Schwartz, E.F., E. Diego-Garcia, R.C. Rodríguez de la Vega, and L.D. Possani. 2007. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC genomics* 8: 119.
- Sevcik, C., G. D'Suze, P. Díaz, V. Salazar, C. Hidalgo, H. Aspúrua, and N. Bracho. 2004. Modelling Tityus scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F(ab')₂ extrusion mechanism from blood to tissues. *Toxicon* 44(7): 731-41.
- Silva, E.C.N., T.S. Camargos, A.Q. Maranhão, I. Silva-Pereira, L.P. Silva, L.D. Possani, and E.F. Schwartz. 2009. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 54(3): 252-61.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*.
- Teixeira, A.L., B.F. Fontoura, L. Freire-Maia, C.R. Machado, E.R. Camargos, and M.M. Teixeira. 2001. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon* 39(5): 703-9.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25(24): 4876-82.
- Thompson, C.H., P.R. Olivetti, M.D. Fuller, C.S. Freeman, D. McMaster, R.J. French, J. Pohl, J. Kubanek, and N.A. McCarty. 2009. Isolation and characterization of a high affinity peptide inhibitor of CIC-2 chloride channels. *The Journal of biological chemistry* 284(38): 26051-62.
- Trejo, E., A. Borges, B. Nañez, I. Lippo de Becemberg, R. González de Alfonzo, and M.J. Alfonzo. 2011. *Tityus zulianus* venom induces massive catecholamine release from PC12 cells and in a mouse envenomation model. *Toxicon* : 59: 117-123.
- Tytgat, J., K.G. Chandy, M.L. Garcia, G. a Gutman, M.F. Martin-Eauclaire, J.J. van der Walt, and L.D. Possani. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences* 20(11): 444-7.
- Valdivia, H.H., and L.D. Possani. 1998. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *Trends in cardiovascular medicine* 8(3): 111-8.

- Wagner, S., M.S. Castro, J.A.R.G. Barbosa, W. Fontes, E.N.F. Schwartz, A. Sebben, O. Rodrigues Pires, M.V. Sousa, and C.A. Schwartz. 2003. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon* 41(7): 737-45.
- Weinberger, H., Y. Moran, D. Gordon, M. Turkov, R. Kahn, and M. Gurevitz. 2010. Positions under positive selection-key for selectivity and potency of scorpion alpha-toxins. *Molecular biology and evolution* 27(5): 1025-34.
- Wilson, E. 1988. *Biodiversity*. John Wiley & Sons.
- Yatani, A., G.E. Kirsch, L.D. Possani, and A.M. Brown. 1988. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *The American journal of physiology* 254(3 Pt 2): H443-51.
- Zeng, X.-C., G. Corzo, and R. Hahin. 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life* 57(1): 13-21.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Artigo científico de parte dos resultados da tese, publicado na revista PLoS ONE (<http://www.plosone.org/home.action>)

Artigo intitulado: Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺-Channel Scorpion Toxins.

Citação: Guerrero-Vargas, J.A., C.B.F. Mourão, V. Quintero-Hernández, L.D. Possani, and E.F. Schwartz. 2012. Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺-Channel Scorpion Toxins. PLoS ONE 7(2): e30478