

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização estrutural e funcional de neurotoxinas
presentes nas frações XIIA e XIIB da peçonha do escorpião *Tityus
serrulatus***

Caroline Marroni Cremonez

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização estrutural e funcional de neurotoxinas
presentes nas frações XIIA e XIIB da peçonha do escorpião *Tityus
serrulatus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Caroline Marroni Cremonez

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes
Braga

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia no dia 22/05/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

RESUMO

CREMONEZ, C. M., **Isolamento e caracterização estrutural e funcional de neurotoxinas presentes nas frações XIIA e XIIB da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. Ribeirão Preto, 2015. 92 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O escorpião amarelo *Tityus serrulatus* (Ts) é considerado a espécie mais perigosa do Brasil, e muitas das toxinas de sua peçonha já foram isoladas e caracterizadas. No entanto, as frações XIIA e XIIB, obtidas da cromatografia de troca iônica da peçonha de Ts, possuem várias toxinas de baixa massa molecular ainda não caracterizadas. Através da combinação de técnicas de RP-FPLC em colunas C8 e C18, espectrometria de massas e/ou sequenciamento amino-terminal, foi possível isolar e identificar os componentes destas frações, bem como realizar as caracterizações estrutural, por RMN, e eletrofisiológica, por *Two Microelectrode Voltage Clamp*, de algumas neurotoxinas isoladas. Foram escolhidas três toxinas de interesse: Ts11, Ts9 e Ts1-G. Nossos resultados mostram que a Ts11 foi capaz de bloquear canais para potássio dependentes de voltagem (Kv): Kv1.2, Kv1.3, Kv4.2, Kv10.1, hERG, e Shaker IR, bloqueando em 25%, 27%, 25%, 15%, 12%, e 10% as correntes de potássio, respectivamente. A Ts11 possui uma estrutura única (estrutura obtida por RMN): ICK *scaffold* sem os elementos de estrutura secundária (alfa-hélice ou fita-beta). Esta estrutura diferenciada, somada à atividade biológica caracterizada neste estudo, evidencia uma nova subfamília de KTx, a qual foi denominada como ϵ -KTx, sendo a Ts11 o primeiro membro desta subfamília: ϵ -KTx1.1. A caracterização funcional da Ts9 mostra que a mesma não apresenta atividade bloqueadora sobre os canais Kv testados (Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.2; Kv7.2; Kv10.1 hERG e Shaker IR), na concentração de 100 nM. Apesar da Ts9 não ter bloqueado os canais testados, ela apresenta estrutura e resíduos-chave que sugerem sua ação em Kvs e estudo anteriormente publicado mostra que ela é um potente ligante de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância (SK). Também foi conduzido um estudo comparativo entre a Ts1e sua isoforma precursora Ts1-G nos canais para sódio dependentes de voltagem Nav1.1 – 1.8 e DmNav1, a fim de analisar a importância da amidação C-terminal. A Ts1 madura possui região C-terminal amidada, enquanto que sua isoforma Ts1-G não é amidada, pois apresenta uma Gly na região C-terminal (última etapa de transformação pós-traducional, anterior a ação da enzima α -amidante). A Ts1-G não apresentou ação nos canais (Nav) na concentração testada (100 nM), enquanto que a Ts1 (100 nM) age como β - toxina, reduzindo o limiar de excitação dos canais Nav e/ou reduzindo as correntes de sódio, evidenciando que a amidação C-terminal é importante para a atividade biológica da toxina madura. Adicionalmente, nas análises por MALDI/TOF das frações XIIA e XIIB, foram encontrados 45 componentes cujas massas moleculares não correspondem a de toxinas já isoladas, abrindo perspectivas para a identificação de moléculas com potencial uso biotecnológico, visto que toxinas com ação em canais iônicos podem ser ferramentas valiosas para a elucidação das características farmacológicas, fisiológicas e estruturais dos seus alvos.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*, canais iônicos, Ts9, Ts11, Ts1-G.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Escorpião *Tityus serrulatus*

Escorpiões formam um dos grupos de animais mais antigos presentes na Terra. Existem indícios de sua existência há mais de 400 milhões de anos (LOURENÇO, 1994), representados atualmente por aproximadamente 1700 diferentes espécies descritas (SCHOLTE et al., 2009). Os escorpiões de maior importância médica pertencem à família Buthidae, que inclui os gêneros: *Leiurus* (Oriente Médio), *Androctonus* e *Buthus* (Norte da África), *Parabuthus* (África do Sul), *Mesobuthus* (Ásia, principalmente na Índia), *Centruroides* (América do Norte e Central), e *Tityus* (América do Sul) (ISBISTER e BAWASKAR, 2014). O envenenamento por escorpião é considerado como um problema de saúde pública negligenciado e associado à pobreza pela Organização Mundial da Saúde (RECKZIEGEL e PINTO, 2014).

No Brasil, a espécie *Tityus serrulatus* (Ts), primeiramente descrita por Lutz (1922), é considerada a espécie mais perigosa, sendo responsável pela maioria dos casos de envenenamento (PETRICEVICH, 2005). O *Tityus serrulatus* (Figura 1) possui tronco marrom-escuro, com patas, pedipalpos e cauda amarelos, ficando assim conhecido popularmente como escorpião amarelo e pode medir entre 6 e 7 centímetros quando adulto. Na face dorsal dos segmentos distais da cauda, apresenta uma serrilha, formada por pequenos dentes, conferindo o nome *serrulatus* à espécie (LUTZ, 1922).



Figura 1. Escorpião Amarelo *Tityus serrulatus*.

Fonte: Laboratório de Toxinas Animais.

O envenenamento por *Tityus serrulatus* é atualmente considerado um problema de saúde pública, principalmente em grandes centros urbanos. Adicionalmente, a abundância de abrigo e alimento (baratas, cupins, entre outros insetos) que o escorpião encontra em lixos e entulhos, a ausência de predadores naturais e a reprodução por partenogênese contribuem para o aumento rápido da população de escorpiões (cada gestação dura em média 3 meses e gera por volta de 20 filhotes). Consequentemente, observa-se um grande aumento no número de acidentes (MARCUSSEI; ARANTES e SOARES, 2011).

Segundo dados do SINAN (Sistema De Informação De Agravos de Notificação- Ministério da Saúde), em 2014 foram notificados 78200 acidentes por escorpião no Brasil. (Figura 2), superando o número total de acidentes causados pelos demais animais peçonhentos ocorridos no mesmo ano (63466 notificações).

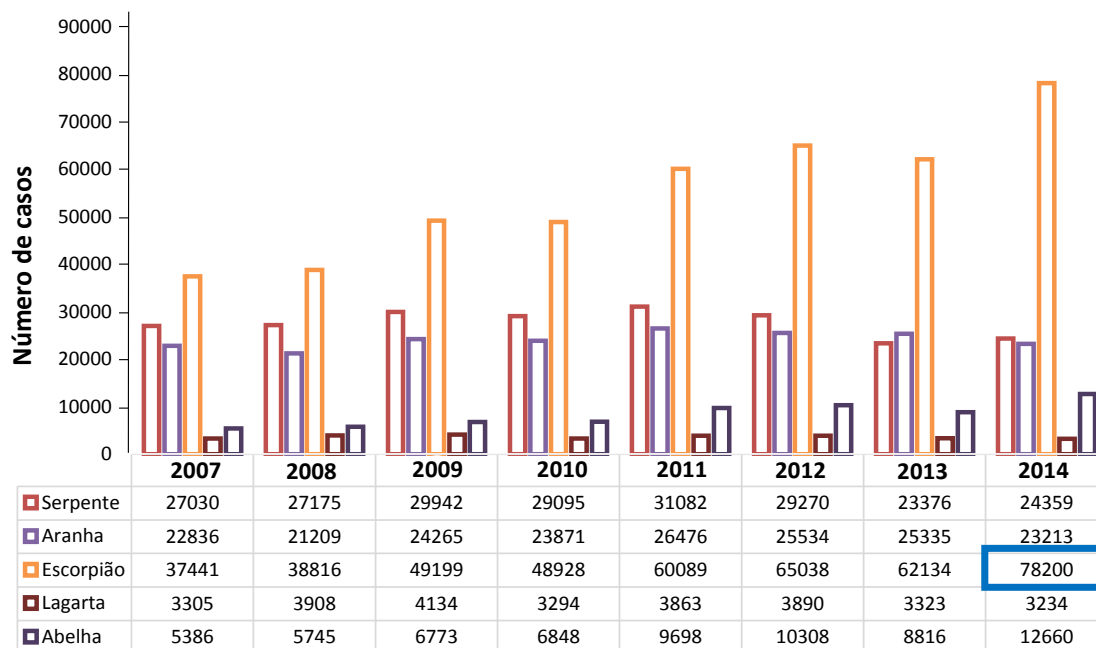


Figura 2. Acidentes por animais peçonhentos notificados entre 2007 e 2014.

Fonte: Sinan- Ministério da Saúde

A peçonha do *Tityus serrulatus* é constituída de muco insolúvel, mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, amins bioativas, hipotensinas, hialuronidase, inibidor de calicreína, peptídeo potencializador de bradicinina, proteínas alergênicas, metaloproteínases, peptídeo natriurético, outros peptídeos (PAPE, peptídeos antimicrobianos, entre outros) e várias neurotoxinas (PESSINI et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2005; VERANO-BRAGA et al., 2008; COLOGNA et al., 2009; ALVARENGA et al., 2012; ALVES et al., 2013; CARMO et al., 2014; BORDON; COLOGNA e ARANTES, 2015; MACHADO et al., 2015). Estima-se a existência de mais de 300 toxinas, sendo a maior parte delas pequenas proteínas com massa molecular menor que 10 kDa (PIMENTA, A.M.C. et al., 2001 *apud* BORDON, K.C.F.; COLOGNA, C.T. e ARANTES, E.C., 2015). O uso de técnicas ômicas, como proteoma da peçonha e transcriptoma da glândula de peçonha, tem gerado uma gama de novas informações a respeito da composição deste rico arsenal de moléculas que compõe a peçonha do *Tityus serrulatus*.

O efeito tóxico da peçonha dos escorpiões depende de alguns fatores como a espécie do escorpião, o local da picada, a dose inoculada, o peso, a idade, a dieta e o estado de saúde da vítima e sua sensibilidade (AMARAL e REZENDE, 1990).

Os principais sintomas causados pela peçonha, tais como hiperglicemia, hiper/hipotermia, hiper/hipotensão, pancreatite, alterações eletrocardiográficas, taquicardia e ou bradicardia, miocardite, aumento de creatina quinase e interleucinas, edema pulmonar, etc. (ISMAIL, 1995), são em sua maioria, devidos ao influxo de Na^+ e à intensa liberação de neurotransmissores dos terminais nervosos simpáticos e parassimpáticos bem como da glândula adrenal (DINIZ, 1978). A morte por envenenamento escorpiônico ocorre como resultado de falência cardio-respiratória, que ocorre em algumas horas após o acidente.

Neurotoxinas são os componentes mais importantes da peçonha de escorpiões e as principais responsáveis pelas manifestações no envenenamento, por atuarem diretamente nos mecanismos de permeabilidade iônica de membranas de células excitáveis. As neurotoxinas exercem efeito especificamente em canais para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ou Cl^- dependentes de voltagem, alterando seus mecanismos de ativação ou inativação, levando à intensa despolarização celular e consequente liberação de neurotransmissores. O aumento de neurotransmissores nas fendas sinápticas é responsável pelos efeitos fisiopatológicos do envenenamento (GORDON et al., 1998; POSSANI et al., 1999). Considerando que os principais sinais e sintomas observados no envenenamento por escorpiões é consequência da interação de suas toxinas com canais iônicos dependentes de voltagem, principalmente canais para sódio e para potássio, é importante conhecer o papel fisiológico destes canais e como esta interação toxina/canal ocorre.

1.2. Canais iônicos e Toxinas

A pesquisa com canais iônicos tem crescido muito nos últimos anos e grande parte do conhecimento adquirido sobre as propriedades estruturais e mecanismos de ação destes canais, sua identificação e distribuição em diversos tecidos e tipos celulares foi conseguido com o uso de neurotoxinas. Elas também contribuíram para avaliar o papel desses canais em processos patológicos, como câncer, canalopatias, doenças auto-imune, Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, entre outras.

Os canais iônicos desempenham papel crucial na geração do potencial de ação e, conseqüentemente, em diversas atividades celulares, tais como transdução de sinais, liberação de neurotransmissores, contração muscular, secreção hormonal, crescimento, motilidade e apoptose (KIM, 2014).

A modulação de canais exercida por toxinas animais desperta grande interesse, pois podem ser consideradas modelos para o desenvolvimento de moléculas com potencial uso terapêutico (LEWIS e GARCIA, 2003; COLOGNA et al., 2009; WULFF; CASTLE e PARDO, 2009).

As canalopatias representam um importante grupo de desordens caracterizadas pela disfunção dos canais iônicos, podendo ser de origem genética ou adquirida. Consistentes com a distribuição destes canais pelo corpo humano, as desordens em canais iônicos implicam em uma série de doenças, atingindo os sistemas nervoso (epilepsia, enxaquecas, cegueira, surdez), cardiovascular (arritimias, hipertensão, síndrome do QT longo), respiratório (asma, fibrose cística), endócrino (diabetes mellitus neonatal), urinário (síndrome de Bartter), digestório (síndrome do intestino irritável) e imune (miastenia gravis) (para revisão ver KIM, J, 2014)

Já se conhece o papel crucial do canal para potássio Kv1.3 em enfermidades como esclerose múltipla e doenças auto-imune, e estudos sugerem que a inibição seletiva de Kv1.3 poderia representar uma terapia apropriada para o tratamento de doenças como diabetes tipo 1, psoríase e artrite reumatoide (LEWIS e GARCIA, 2003).

O primeiro peptídeo escorpiônico testado *in vivo* foi a Margatoxina do escorpião *Centruroides margaritus*, um potente bloqueador de canais para potássio Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3. Sabe-se que os canais Kv1.3 são responsáveis pela ativação dos linfócitos T e toxinas capazes de bloqueá-los poderiam ser utilizadas como modelos moleculares para o desenvolvimento de drogas imunossupressoras (GARCIA-CALVO et al., 1993).

Adicionalmente, bloqueadores seletivos de canais iônicos apresentam potencial uso para o diagnóstico e tratamento do câncer. Como exemplo, podemos citar a clorotoxina isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, que se liga especificamente a canais para cloreto ativados por Ca^{2+} na matrix extracelular de gliomas, e despertou grande interesse da indústria farmacêutica pelo seu potencial uso em diagnóstico desta patologia (LEWIS e GARCIA, 2003).

Na peçonha de *Tityus serrulatus* foram identificadas até o presente momento toxinas que interagem seletivamente em canais para sódio e para potássio (para revisão ver (BORDON; COLOGNA e ARANTES, 2015), direcionando nossos estudos para a avaliação da atividade de toxinas sobre estes canais.

1.2.1. Canais para Sódio

Os canais para sódio dependentes de voltagem (Nav) são proteínas transmembrana responsáveis pelo aumento dependente de voltagem na permeabilidade deste íon, iniciando assim potenciais de ação de células excitáveis. Até o presente momento foram identificadas 9 isoformas de canais Nav em células de mamíferos denominados, Nav1.1 – Nav1.9. As isoformas apresentam mais de 50% de identidade em sua sequência de aminoácidos e se diferenciam por sua localização no sistema nervoso e pelos seus padrões de expressão (GOLDIN, 2001; BOSMANS e TYTGAT, 2007).

Estes canais consistem em um poro formado por uma subunidade α , de aproximadamente 250 kDa, que pode estar associada com subunidades β auxiliares ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), em mamíferos (CATTERALL, 2000), e subunidade TipE em canais Nav de insetos (LEE et al., 2000). A subunidade α é formada por 4 domínios homólogos ligados covalentemente (I-IV), cada um contendo 6 segmentos transmembrana (S1-S6), sendo o segmento S4 carregado positivamente (lisina, arginina e histidina) e atua como sensor de voltagem para ativação do canal (Figura 3) A inativação é mediada por uma alça intracelular que conecta os domínios III e IV (CESTELE e CATTERALL, 2000a), em particular uma sequência curta de aminoácidos hidrofóbicos denominada sequência IFM (isoleucina, fenilalanina e metionina) (YU e CATTERALL, 2003). Atualmente tem-se conhecimento de 5 sítios receptores distintos em canais Nav. A interação das toxinas com os respectivos sítios leva a alterações significativas da função do canal (STEVENS; PEIGNEUR e TYTGAT, 2011).

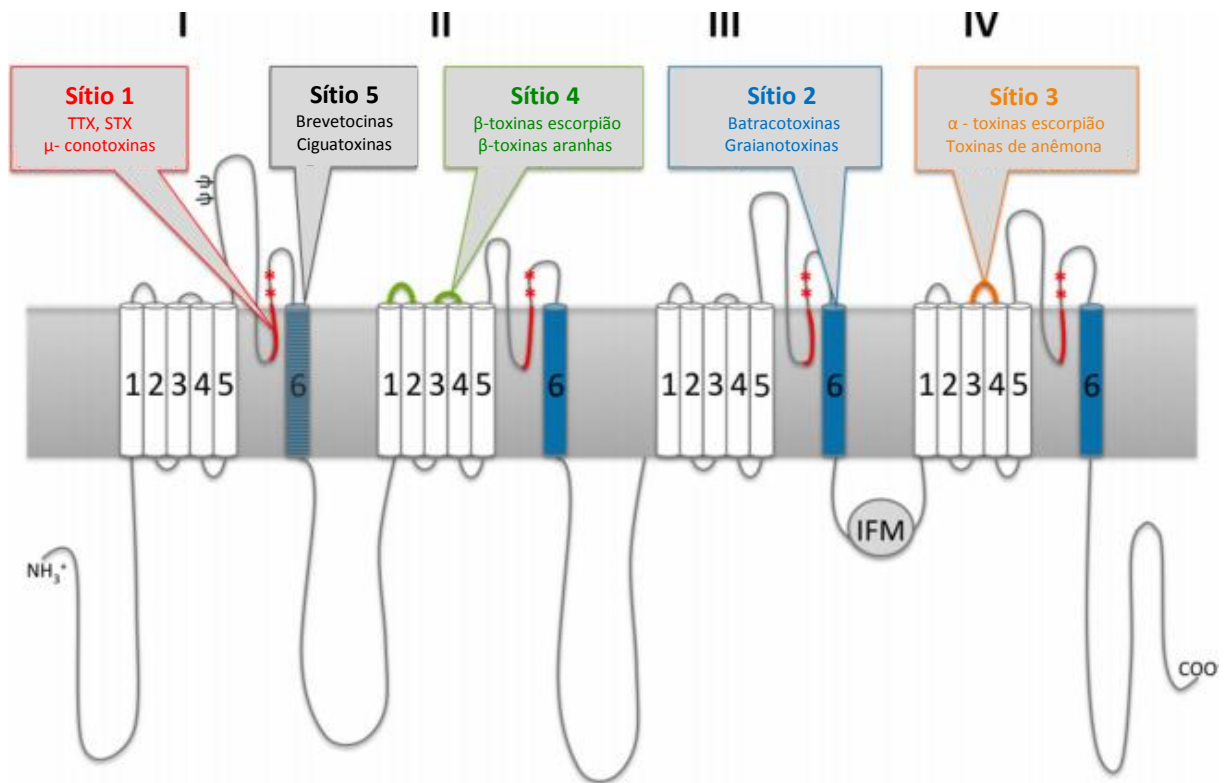


Figura 3. Representação esquemática da subunidade α do canal para sódio dependente de voltagem e os seus sítios de interação com toxinas animais. Fonte: Adaptado de Stevens, Peigneur, Tytgat, 2011.

A subunidade α dos canais de mamíferos e insetos é conservada em relação à sequência de aminoácidos, estrutura e organização topológica (LOUGHNEY; KREBER e GANETZKY, 1989), e despertada grande interesse, uma vez que a compreensão do seu funcionamento e a descoberta de moléculas capazes de interagir com os mesmos podem levar ao desenvolvimento de novos inseticidas (ZLOTKIN; FISHMAN e ELAZAR, 2000; ARNON et al., 2005).

As toxinas que afetam os canais para sódio são os principais agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos da peçonha escorpiônica. São consideradas neurotoxinas de cadeia longa e apresentam estrutura secundária altamente conservada, estabilizadas por 4 pontes dissulfeto (POSSANI et al., 1999). Elas podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua especificidade aos diferentes sítios dos canais Nav de células de mamíferos: α -toxinas e β -toxinas (JOVER et al., 1980; COURAUD et al., 1982; YATANI et al., 1988; GUREVITZ et al., 1998).

As α -toxinas escorpiônicas são uma família de polipeptídios relacionados tanto estruturalmente quanto funcionalmente. São proteínas formadas por 60 a 76 aminoácidos

estabilizadas por 4 pontes dissulfeto (GORDON e GUREVITZ, 2003). Essas toxinas têm sido classificadas quanto a sua toxicidade específica às células de mamíferos e às células de insetos: **(a)** aquelas com maior afinidade aos canais para sódio de células de mamíferos são denominadas toxinas **α -clássicas**; **(b)** aquelas com maior afinidade aos canais para sódio de insetos são denominadas toxinas **α -anti-inseto**; **(c)** e aquelas que são capazes de se ligar a ambos os tipos de canais são chamadas toxinas **α -like**. As α -toxinas ligam-se ao sítio 3 dos canais Nav, diminuindo ou bloqueando o mecanismo de inativação desses canais, prolongando assim a fase de repolarização do potencial de ação, com pouco ou nenhum efeito no processo de ativação (FONTECILLA-CAMPS; HABERSETZER-ROCHAT e ROCHAT, 1988). *In vivo*, as α -toxinas podem matar, por induzirem paralisia e/ou arritmia (BOSMANS e TYTGAT, 2007).

As β -toxinas são formadas por 60 a 65 aminoácidos e ligam-se ao sítio 4 do canal Nav (alça extracelular entre os segmentos S3-S4 do domínio II), modulando a ativação do canal, e levando à sua abertura em potenciais mais negativos, e/ou uma redução na amplitude do pico da corrente de sódio, provocando assim o disparo de potenciais de ação espontâneos e contínuos (CESTELE e CATTERALL, 2000a; MARCUSSI; ARANTES e SOARES, 2011). As β -toxinas também são classificadas de acordo com sua preferência para canais de insetos e mamíferos em: **(a) β m**, interagem com canais para sódio de mamíferos; **(b) β i**, são seletivas para canais de insetos; **(c) β -like**, as que não mostram preferência entre canais Nav de mamíferos ou insetos; e **(d) $\beta\alpha$** , que apresentam estrutura primária de β -toxinas, mas ação semelhante a de α -toxinas (BOSMANS; MARTIN-EAUCLAIRE e TYTGAT, 2007).

As diferenças das estruturas e das ações entre α e β -toxinas são extensivamente estudadas, porém as diferenças relacionadas aos efeitos farmacológicos ainda são pouco conhecidas.

1.2.2. Canais para Potássio

São caracterizados pela sua grande diversidade sendo uma família formada por mais de 40 tipos diferentes de canais, classificados em 12 subfamílias (Kv1 – Kv12) de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos (GUTMAN et al., 2005). As subfamílias dos canais Kv são estruturalmente similares, organizando-se em tetrâmeros de 4 subunidades alfas que se unem formando complexos homo ou heteromultiméricos

(Figura 4). Cada subunidade α do canal Kv possui 6 segmentos transmembranas (S1-S6) e uma alça (P) altamente conservada, localizada entre os segmentos S5 e S6 (CATTERALL et al., 2007).

Funcionalmente, os canais para potássio apresentam duas regiões: uma região sensível à voltagem, que compreende os segmentos transmembranas S1 a S4, que contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente; e uma região formadora do poro condutor, formada pelos segmentos S5 e S6 e pela alça P (CATTERALL, 1995). O modelo proposto para elucidar o mecanismo de abertura e fechamento (*gating*) dos mesmos considera que a região C-terminal do segmento S3 e o segmento S4 formam uma estrutura parecida a um remo (*paddle-like structure*), a qual é responsável pela abertura e fechamento do canal (DOYLE et al., 1998).

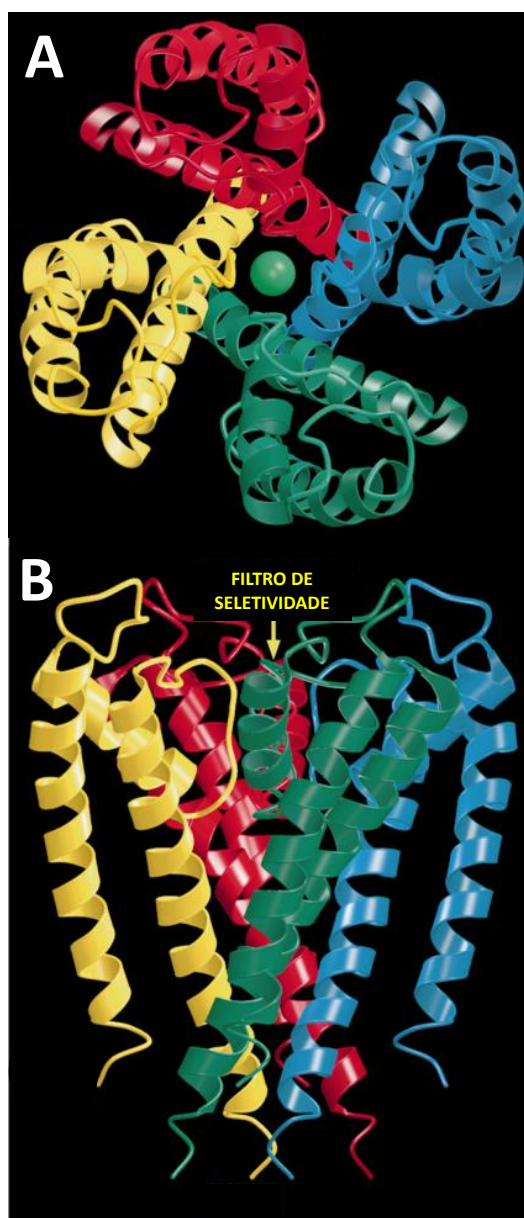


Figura 4. Representação tridimensional de um canal para potássio dependente de voltagem. (A) Representação tridimensional do tetrâmero que forma o Kv, visto da porção extracelular. (B) Representação tridimensional do canal integral. Cada tetrâmero representado por uma cor. Fonte: Adaptado de Doyle et al., 1998.

Embora as neurotoxinas específicas para canais Nav sejam consideradas os componentes mais tóxicos da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, as neurotoxinas que atuam em canais para potássio são de extrema importância para o quadro do envenenamento, pois agem de forma sinérgica com as outras neurotoxinas potencializando a ação tóxica da peçonha.

Um pouco mais de 30 anos se passaram desde que foi descoberta a Noxiustoxina, a primeira toxina isolada do escorpião *Centruroides noxius*, e que demonstrou afetar a

permeabilidade de canais Kv em axônios gigantes de lula (POSSANI; MARTIN e SVENDSEN, 1982). A descoberta da *Charybdotoxin*, por Miller e colaboradores (1985), promoveu um grande aumento de estudos nessa área, já que tal peptídeo se mostrou um excelente modelo para o estudo de função e estrutura do canal para potássio (RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004).

O papel fisiológico e a estrutura de alguns canais Kv são bem conhecidos devido à descoberta de toxinas capazes de interagir com alta afinidade e especificidade com as diferentes isoformas dos mesmos. O reconhecimento dos diferentes subtipos de canais para potássio depende de certos aminoácidos posicionados em pontos específicos da superfície da toxina, normalmente encontrados na fita- β .

Toxinas que interagem com os canais Kv, em geral, exercem sua ação de duas formas gerais: ligando-se a porção extracelular do poro condutor, ocluindo assim a passagem dos íons, ou pela modulação da parte sensível à voltagem (GARCIA et al., 1991). Os mecanismos de interação toxina-canal propostos são: **(a) díade funcional**, que consiste nos resíduos K e Y/F, normalmente encontrados nas posições K27 Y36, ou F25 K27 e dispostos a uma distância de aproximadamente 7Å; **(b) anel básico**, formado por quatro ou cinco resíduos básicos encontrados ao redor da díade funcional, não necessariamente idênticos, que seriam responsáveis por estabilizar a interação com o canal, criando contatos com resíduos importantes da região do poro do canal Kv; **(c) modelo “Apamin-like”**, que considera os resíduos básicos encontrados na α -hélice do peptídeo os responsáveis pela interação da toxina com canais para potássio ativados por cálcio; **(d) modelo “Two-heads”**, modelo proposto para as toxinas da família γ -KTx, específicas para canais ERG (*ether-à-go-go related genes*). Estes canais possuem uma α -hélice extra na parte interna do poro do canal, que desempenha papel importante na interação toxina-canal. O epítipo proposto é formado por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica em regiões separadas na toxina, que juntas interagem tanto com a α -hélice extra quanto com o vestíbulo do canal ERG, formando assim o modelo “duas cabeças” de interação com o canal; **(e) hERG Hot-Spot**, este modelo é proposto para algumas toxinas pertencentes a família α -KTx que interagem tanto com canais Kv, quanto com canais hERG (*human ether-à-go-go related genes*). Para estas toxinas é proposto que dois resíduos básicos R e/ou K, encontrados nas posições 19 e 20 seriam os responsáveis pela interação com os canais hERG (RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004; ABDEL-MOTTALEB et al., 2008).

De acordo com a *Scorpktx: Scorpion potassium channel toxins: nomenclature and list of entries* (UNIPROT, 2015), as toxinas específicas para potássio são atualmente agrupadas em 5 famílias: α , β , γ , κ e δ - KTx. O princípio do agrupamento baseia-se no alinhamento dos resíduos de cisteínas e em outros resíduos altamente conservados. Esta nomenclatura proposta tem a virtude de recapitular o que se sabe sobre a filogenia de muitas toxinas de escorpião, bem como abordar, até certo ponto, os efeitos farmacológicos conhecidos das mesmas (TYTGAT et al., 1999; SAUCEDO et al., 2012).

A família α -KTx, a mais representativa delas, apresenta, atualmente, mais de 145 toxinas, subdivididas em 30 subfamílias (RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004; COLOGNA et al., 2011; QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013; UNIPROT, 2015). Esta família é composta por peptídeos de 23 a 43 resíduos de aminoácidos, estabilizados por três a quatro pontes dissulfeto, sendo duas pontes extremamente conservadas e conectam a α -hélice com uma fita- β , adotando o enovelamento denominado CS α / β (*Cystein stabilized α / β scaffold*) (MOUHAT et al., 2004; RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004).

As β -KTx são consideradas as toxinas de cadeia longa, são 34 peptídeos constituídos por aproximadamente 60 aminoácidos, e também adotam a estrutura CS α / β (DIEGO-GARCIA et al., 2008; SAUCEDO et al., 2012; UNIPROT, 2015). A família β -KTx é subdividida em 3 grupos: **(a) Peptídeos homólogos à TsTx-K β** , que são peptídeos similares a TsTx-K β do escorpião *T. serrulatus*. A TsTx-K β (atualmente denominada Ts8) é a única toxina pertencente a este grupo que foi parcialmente caracterizada até o momento, tendo como ação principal o bloqueio de Kv1.1 com IC₅₀ de 96nM. As demais toxinas foram preditas através de transcriptoma; **(b) Peptídeos homólogos à BmTXK β** , que são os peptídeos homólogos a BmTXK β identificados em escorpiões da família Buthidae; **(c) Peptídeos *Scorpine-like***, os membros desta família são também conhecidos como peptídeos “órfãos” e possuem dois domínios funcionais: α -hélice N-terminal com atividade citolítica e/ou atividade antimicrobiana do tipo defensina de inseto, e um domínio C-terminal com CS α / β *scaffold*, responsável pela atividade bloqueadora de canais Kv (QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013).

Dentro da família das γ -KTx, são conhecidas 29 toxinas, subdivididas em 5 grupos. São toxinas que atuam em canais para potássio do tipo ERG (*ether-à-go-go*), tanto de humanos quanto de ratos. São compostas de 36 a 47 aminoácidos, estabilizados por três a quatro pontes dissulfeto, e também adotam o CS α / β *scaffold* (DIEGO-GARCIA

et al., 2008; SAUCEDO et al., 2012; QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013; UNIPROT, 2015).

A família κ -KTx, diferentemente das α , β , γ -KTxs, que são caracterizadas pelo CS $\alpha\beta$ *scaffold*, possuem uma estrutura puramente helicoidal estabilizada por duas pontes dissulfeto, conhecida como α -hairpin, onde as duas α -hélices são ligadas por uma alça, e assim adotando estrutura do tipo CS $\alpha\alpha$ (*Cystein stabilized helix loop helix scaffold*). Atualmente são conhecidas 18 toxinas, que são distribuídas em 5 grupos. Elas são consideradas bloqueadores fracos de canais para potássio, apesar de apresentarem a díade funcional (K e Y), resíduos importantes para atividade bloqueadora de outras toxinas. Ainda não está claro se os membros desta família atuam em canais para potássio através deste mesmo mecanismo (díade funcional), ou se os canais Kv são de fato seu receptor alvo. Este questionamento ainda existe devido à falta de caracterização estrutural e funcional das toxinas desta família. (SRINIVASAN; SCHACHNER e CATTERALL, 1998; SRINIVASAN et al., 2002; MOUHAT et al., 2004; SAUCEDO et al., 2012; QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013).

Na subfamília δ -KTx ficaram agrupadas sete toxinas *Kunitz-type*, que possuem tanto atividade bloqueadora de Kv quanto atividade inibidora de serino proteases. Estas toxinas possuem por volta de 60 aminoácidos e uma estrutura tridimensional conservada própria da subfamília, com três pontes dissulfeto, uma conectando a α -hélice à fita- β e as outras duas conectando a α -hélice às porções C-terminal e N-terminal, respectivamente.(YUAN et al., 2008; CHEN et al., 2013; UNIPROT, 2015).

Ainda dentro da superfamília das KTx, encontramos as λ -KTx e λ -KTx/calcine, duas subfamílias caracterizadas pela estrutura do tipo *Inhibitory Cysteine Knot* (ICK), predominantemente encontrado na peçonha de *Conus* e de aranhas (GAO et al., 2013). ICK é uma estrutura muito bem conservada do ponto de vista evolutivo, compartilhada por um grande número de peptídios com sequência e atividades diversas, bem como em diversos organismos não relacionados (plantas, fungos, humanos, moluscos, insetos, entre outros) (ZHU et al., 2003; SMITH et al., 2011a). É caracterizada pela presença de um nó de cisteína, que consiste em um anel formado por duas pontes dissulfeto (Ex. C1-C4 e C2-C5), e através das pontes interconectadas (C1-C2 e C4-C5) cruza uma terceira ponte dissulfeto (C3-C6) (NORTON, 2002). As toxinas pertencentes a esta subfamília possuem atividade bloqueadora de Kvs e/ou são ativas em receptores rianodina (GAO et al., 2013).

Por fim, a ϕ -liotoxins-Lw1a, uma toxina isolada do escorpião *Liocheles waigien*, é o primeiro exemplo de toxina nativa a adotar a estrutura do tipo DDH ou *Disulfide-Directed β -hairpin*. Apesar desta toxina não ser ativa em Kvs, a mesma possui uma estrutura tridimensional que é considerada ser a ancestral evolutiva das estruturas ICK. Sua atividade em receptores rianodina revela uma ligação funcional na evolução entre os dois tipos estruturais de toxinas (SMITH et al., 2011b; SMITH et al., 2013)

Diversas toxinas de *Tityus serrulatus* já foram isoladas e algumas que interagem especificamente com canais iônicos já estão bem caracterizadas com relação às suas ações em canais para potássio ou sódio (DE LIMA e MARTIN-EAUCCLAIRE, 1995).

1.3. Isolamento de toxinas

As primeiras tentativas de isolar e caracterizar estes componentes ativos da peçonha de escorpião se iniciou com Mohamed em 1944 (MOHAMED, 1944). Neste trabalho o autor descreve os primeiros métodos para purificação e caracterização de toxinas de escorpiões egípcios. Desde então, várias metodologias foram sendo introduzidas.

Miranda e colaboradores, em 1970, propuseram um método geral para purificação de toxinas. Neste, foram isoladas 11 toxinas dos escorpiões *Androctonus australis*, *Buthus occitanus tunetanus* e *Leiurus quinquestriatus*. O método consistia em extrair a porção solúvel da peçonha com água destilada, eliminando nesta etapa mucoproteínas, seguida de uma filtração em coluna Sephadex G-50, e outras duas cromatografias de troca iônica (catiônica e aniônica) (MIRANDA et al., 1970).

O escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, tem sido extensivamente estudado e muitas de suas toxinas já foram isoladas e caracterizadas. Os trabalhos pioneiros com esta espécie foram realizados na década de 50 e 60 (DINIZ; GONÇALVES, 1956, 1960; GOMEZ & DINIZ, 1966).

Gomez e Diniz em 1966 realizaram a extração da peçonha bruta com água destilada e a submeteram à filtração em gel de Sephadex G-25. A fração tóxica foi, em seguida, cromatografada em coluna de CM-Celulose, sendo obtidas duas frações tóxicas. Uma delas foi parcialmente caracterizada e denominada Tityustoxina (TsTX).

Na sequência, Coutinho Netto (1975) purificou e caracterizou a Tityustoxina, fração parcialmente caracterizada por Gomez e Diniz em 1966, combinando extração da peçonha

com amônia, seguida de gel filtração em coluna Sephadex G-50 e cromatografia de troca iônica em resina CM-celulose-52. A Tityustoxina mostrou ser uma toxina protéica de caráter básico, com 61 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 6.995 Da, N-terminal lisina e sem a presença de metionina em sua composição.

Toledo e Neves (1976) mantiveram as etapas de gel filtração em Sephadex G-25, seguida de troca iônica em coluna de CM-Celulose-52, utilizando gradiente convexo de concentração de acetato de amônio para a eluição dos componentes. Eles obtiveram duas toxinas, TsTX-I e TsTX-II (atualmente denominadas Ts1 e Ts2, respectivamente, por Cologna et al., 2009). A TsTX-I com massa molecular de 6.932 Da e uma lisina N-terminal, enquanto que a TsTX-II apresentou em seu N-terminal uma glicina e massa molecular de 8.500 Da (MARCUSI; ARANTES e SOARES, 2011).

Em 1981, Possani e colaboradores purificaram 4 toxinas provenientes da peçonha do *Tityus serrulatus*, II-11 e III-10, III-8 e IV-5, atualmente denominadas respectivamente Ts1 (II-11 e III-10 são a mesma toxina), Ts2 e Ts3 (COLOGNA et al., 2009), utilizando filtração em Sephadex G-50 e cromatografia em CM-Celulose-52 com gradiente de NaCl em tampão de acetato de amônio. Porém essas 3 toxinas isoladas demonstraram possuir composição em aminoácidos muito semelhantes às toxinas já descritas (MARCUSI; ARANTES e SOARES, 2011).

Sampaio e colaboradores em 1983 realizaram a purificação de toxinas utilizando gel filtração em Sephadex e cromatografia em CM-Celulose-52, porém desta vez utilizando como fase móvel uma solução de bicarbonato de amônio. Desta maneira conseguiram purificar 5 toxinas provenientes da peçonha de *T. serrulatus*. Uma delas apresentou semelhança sequencial com a toxina TsTX-I (Ts1), já purificada por Toledo e Neves em 1976 (MARCUSI; ARANTES e SOARES, 2011).

Arantes e colaboradores (1989) desenvolveram uma metodologia para o fracionamento da peçonha de *T. serrulatus* na qual foi abolida a filtração em gel de Sephadex. O extrato da peçonha foi cromatografado diretamente em coluna de CM-celulose-52, sendo obtidas treze frações protéicas (I-XIII). A caracterização química da fração XIII, a única considerada pura, mostrou que a mesma é igual à toxina γ (POSSANI et al., 1977), e atualmente denominada Ts1 (COLOGNA et al., 2009), sendo a toxina mais abundante da peçonha de *T. serrulatus*, representando aproximadamente 15% dos componentes solúveis da peçonha.

Cerni et al (2014) padronizaram o fracionamento do extrato bruto da peçonha de

Tityus serrulatus através de modificações do método de fracionamento da peçonha de *T. serrulatus* descrito por Arantes et al. (1989) e adaptado para sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC – *Fast Protein liquid chromatography*), no qual a peçonha solúvel é adicionalmente submetida a uma filtração em membrana antes de ser aplicada à coluna de troca catiônica. O perfil cromatográfico obtido neste método foi semelhante aos obtidos no uso da metodologia de Arantes (1989), com uma melhora na resolução de algumas frações (frações VI, VIII, IX e XI), tornando o método mais rápido e prático, uma vez que tornou a leitura das absorvâncias automatizada (CERNI et al., 2014).

1.4. *Tityus serrulatus*: Toxinas isoladas

Até a presente data, foram isoladas e bem caracterizadas 19 diferentes toxinas da peçonha de *T. serrulatus* (COLOGNA et al., 2009; COLOGNA et al., 2011; ALVARENGA et al., 2012; SAUCEDO et al., 2012; BORDON; COLOGNA e ARANTES, 2015).

A toxina Ts1, citada anteriormente, é amplamente estudada. É uma β -toxina, apresenta 61 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária e age especificamente em canais para sódio de mamíferos e insetos (BARHANING et al., 1983, 1984) e atua reduzindo o limiar de ativação dos canais Nav, prolongando o potencial de ação e, conseqüentemente, levando a uma intensa liberação de catecolaminas, glutamato e dopamina (MASSENSINI et al., 1998; FERNANDES et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005). Sua estrutura tridimensional, determinada por cristalografia de Raios-X, revela um domínio bem conservado formado por uma alfa-hélice e três folhas beta antiparalelas estabilizadas por 4 pontes dissulfeto (POLIKARPOV et al., 1999; PINHEIRO et al., 2003; COLOGNA et al., 2009).

A Ts2 foi inicialmente considerada uma β -toxina escorpiônica por compartilhar 72% de identidade com a estrutura primária da Ts1, entretanto apresentava propriedades semelhantes às de α -toxinas, uma vez que prolonga a duração do potencial de ação em nervo vago de coelhos. Esta controversa de dados manteve a classificação da Ts2 não esclarecida por muito tempo (COLOGNA et al., 2009). Apenas em 2012 ensaios eletrofisiológicos em canais Nav de mamíferos e inseto (KIRSCH et al., 1989; COLOGNA et al., 2012) avaliaram a seletividade e a especificidade desta toxina. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, atualmente a Ts2 é classificada como uma α -

toxina.

A Ts3 é uma α -toxina caracterizada primariamente por Kirsch e colaboradores (1989). Inibe a inativação de canais para Na^+ e exerce efeitos na liberação de catecolaminas, acetilcolina, óxido nítrico, GABA, aspartato e glutamato em preparações *in vitro* e *in vivo* (KIRSCH et al., 1989; MASSENSINI et al., 1998; COLOGNA et al., 2009).

A toxina Ts5 corresponde a 2% da peçonha solúvel e também é considerada uma α -toxina. Estudos eletrofisiológicos mostraram que essa toxina prolonga o potencial de ação de fibras do nervo vago de coelho (ARANTES et al., 1994), bem como inibe a recaptação de ^3H -GABA (γ -aminobutyric acid) e ^3H -DA (dopamina) em sinaptosomas isolados de cérebro de rato, de forma dependente de Ca^{2+} , em consequência de despolarização envolvendo canais Nav (CECHINI et al., 2006).

As toxinas Ts6, Ts7 e Ts9 são específicas para canais Kv, classificadas como α -KTxs, e cada uma apresenta diferente afinidade para os diversos subtipos de canais Kv existentes. Apesar da arquitetura 3D semelhante, pequenas diferenças nas estruturas primárias dessas toxinas são responsáveis por modificar sua afinidade a um ou mais canais para potássio (BLAUSTEIN et al., 1991; ROGOWSKI et al., 1994; LEGROS et al., 1996; NOVELLO et al., 1999; COLOGNA et al., 2009).

A Ts8 é uma β -KTx, e é também conhecida como TsK2, Tityustoxin K-beta, TsTX-K beta and TsTx-K β , que bloqueia seletivamente Kv1.1 com IC_{50} de 96nM (DIEGO-GARCIA et al., 2008). Sua sequência de aminoácidos foi deduzida a partir biblioteca de cDNA de *T. serrulatus*, e mostrou identidade de 64% com outra toxina de cadeia longa bloqueadora de canais iônicos BmTxKb2, isolada do escorpião *Buthus martensii* (COLOGNA et al., 2009).

Ainda é encontrado na peçonha de *T. serrulatus* um peptídeo não tóxico denominado Ts4, incapaz de induzir os sintomas típicos causados por outras toxinas escorpiônicas. Embora considerado não tóxico, induz reações alérgicas, lacrimação, espasmos musculares em experimentos conduzidos em camundongos, além de liberação dose dependente de GABA e glutamato em preparações sinaptosomais (MARANGONI et al., 1990; SAMPAIO et al., 1991). Apesar de não tóxica, a toxina induz a produção de anticorpos policlonais capazes de neutralizar a peçonha através da reação cruzada da Ts4 com outras toxinas tóxicas. Anticorpos criados contra peptídeos correspondentes aos aminoácidos 1-15 e 47-61 da toxina foram capazes de neutralizar uma mistura de todas

as toxinas tóxicas da peçonha de *T. serrulatus*, evidenciando que esses epítomos podem estar envolvidos com a ação tóxica da peçonha (CHAVEZ-OLORTEGUI; MOLINA; GRANIER, 2002).

Os peptídeos Ts10 e Ts14, isolados por Ferreira e colaboradores (1993) e Verano-Braga e colaboradores (2008), respectivamente, foram caracterizados com atividade potencializadora da bradicinina.

As toxinas Ts11, Ts12 e Ts13, possuem 29 resíduos e massa molecular que varia de 2900 a 3027 Da. Foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente por Pimenta e colaboradores (2003). Apesar das sequências de aminoácidos relacioná-las com toxinas que agem em canais Kv, a função dessas toxinas ainda não havia sido determinada.

A Ts15 foi caracterizada por Cologna e colaboradores em 2011, classificada em uma nova subfamília das α -KTx, e denominada como α -KTx 21.1. Possui 36 aminoácidos estabilizados por 3 pontes dissulfeto e massa molecular de 3956 Da. Atua preferencialmente em canais Kv1.2 e Kv1.3.

A Ts16 (número de acesso UniProtKB P86271) foi primeiramente isolada pelo grupo de Arantes (BORDON et al., 2009), e em 2012, Saucedo e colaboradores realizaram a caracterização estrutural da Ts16 recombinante. Ela é classificada como uma α -KTxs, entretanto essa classificação é baseada no alinhamento de sua estrutura primária com as demais KTx. Diferentemente de todas as outras α -KTx que possuem CS α / β *scaffold*, a caracterização estrutural da Ts16 mostrou que a toxina adota o CS α / α *scaffold*, que é típico das γ -KTx. Apesar de sua estrutura ser semelhante as κ -KTx, o alinhamento da sequência de acordo com Tytgat et al. (1999) é impossível, e a identidade com outros membros da família é baixa. A conformação Ca/ α da Ts16 aparenta ser uma versão α do *scaffold* CS α / β , quando sobrepostas (SAUCEDO et al., 2012). Existe também a possibilidade instigante de haver mudança entre as conformações Ca/ α e CS α / β . Tal transição estrutural foi previamente encontrada em outras proteínas (SAUCEDO et al., 2012; ROSENGREN et al., 2003).

Também no ano de 2012, Alvarenga e colaboradores realizaram o transcriptoma completo da glândula do escopião *Tityus serrulatus*, trabalho no qual foi possível identificar a Ts17 (identidade de 86% com Ts5), Ts18 (identidade de 63% com uma NaScTx do escorpião *Hottentotta judaicus*) e Ts19 (precursor da Ts8) e mais de uma dúzia de novos componentes ainda não caracterizados (ALVARENGA et al., 2012).

Além dessas toxinas já citadas, na peçonha de *T. serrulatus* são encontradas

hialuronidases e proteases. As hialuronidases são enzimas consideradas não tóxicas, mas agem como fator de espalhamento por facilitarem a difusão de outras toxinas nos diversos tecidos, contribuindo assim para o envenenamento local e sistêmico (POSSANI et al., 1977; PESSINI et al., 2001)(POSSANI et al., 1977; PESSINI et al., 2001). Almeida e colaboradores (2002) descreveram a presença de enzimas proteolíticas com atividade gelatinolítica na peçonha de *T. serrulatus*, e Bertazzi (2007) demonstrou ainda a presença de proteases capazes de ativar o sistema complemento, podendo exercer papel importante nos processos inflamatórios.

São encontradas na peçonha hipotensinas, inibidor de calicreína, peptídeo potencializador de bradicinina, proteínas alergênicas, metaloproteínases, peptídeo natriurético, outros peptídeos (PAPE, peptídeos antimicrobianos, entre outros) (para revisão completa ver BORDON, K.C.F.; COLOGNA, C.T. e ARANTES, E.C., 2015)

Embora várias toxinas já tenham sido descritas, o número é extremamente pequeno comparado à estimativa do número de toxinas existentes na peçonha (aproximadamente 300 toxinas), evidenciando a importância da continuidade do estudo da peçonha de *Tityus serrulatus*.

JUSTIFICATIVA

Muitas toxinas obtidas a partir de venenos e peçonhas animais têm sido alvo de interesse em todo o mundo devido ao seu potencial biotecnológico e por se mostrar valiosa ferramenta molecular para a elucidação estrutural, fisiológica e farmacológica de seus alvos. A pesquisa com canais iônicos tem crescido muito nos últimos anos e grande parte do conhecimento adquirido sobre o papel desses canais em processos fisiopatológicos, bem como suas estruturas deve-se ao uso de toxinas animais como ferramenta molecular.

A gama de atividades biológicas apresentadas pelas toxinas animais tem aguçado o interesse de pesquisadores por estudos envolvendo o desenvolvimento de moléculas sintéticas com base na estrutura destas toxinas animais, visando o descobrimento e *design* de moléculas com potencial uso terapêutico (LEWIS e GARCIA, 2003).

O primeiro exemplo de sucesso de drogas baseadas em toxinas é o fármaco captopril (Capoten®) da indústria Bristol-Myers Squibb, um anti-hipertensivo sintetizado com base na estrutura de um peptídeo isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* nos anos 60, que é hoje um dos medicamentos mais utilizados em todo o mundo para o tratamento

de hipertensão arterial e pós-infarto do miocárdio. Ainda envolvendo doenças cardiovasculares, temos o Ancrod e o Batroxobin das peçonhas de *Agkistrodon rhodostoma* e *Bothrops atrox*, respectivamente, que clivam enzimaticamente o fibrinogênio sanguíneo e reduzem os déficits neurológicos nos primeiros estágios de acidente vascular encefálico (LEWIS e GARCIA, 2003). Outro fármaco já utilizado no tratamento de casos de trombose é o Eptifibatide (Integrilin®), sintetizado a partir da barbourina, isolada da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbouri* (SCARBOROUGH et al., 1991).

O peptídeo SNX-111, análogo do peptídeo ω -conotoxina MVIIA, isolado da peçonha do caracol marinho *Conus magus*, é utilizado como potente analgésico (cerca de mil vezes mais potente que a morfina) em pacientes com câncer e AIDS e em espasmos severos decorrentes de lesões medulares (PENN e PAICE, 2000; RIDGEWAY; WALLACE e GERAYLI, 2000). Este novo princípio ativo foi aprovado em julho de 2000 pelo FDA (EUA) com o nome comercial de Ziconotide®. Diversas outras toxinas isoladas a partir da peçonha do caracol marinho vêm sendo estudadas devido a suas ações em canais para cálcio sensíveis a voltagem, inibição de receptores NMDA e nicotínico, inibidores de α_2 adenoceptores e transportadores de noradrenalina, e ação agonista em receptores de neurotensina (LEWIS e GARCIA, 2003).

Estudos envolvendo toxinas escorpiônicas também já demonstraram sua eficiência na medicina. Entretanto, dos inúmeros bloqueadores de canais para potássio já identificados, apenas um pequeno número deles mostra resultados promissores em modelos animais. O primeiro peptídeo testado *in vivo* foi a Margatoxina do escorpião *Centruroides margaritus*, um potente bloqueador de canais para potássio Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3. Os canais Kv1.3 são responsáveis pela ativação dos linfócitos T e toxinas capazes de bloqueá-los podem ser utilizadas como modelos moleculares para o desenvolvimento de drogas imunossupressoras. (GARCIA-CALVO et al., 1993). Algumas toxinas escorpiônicas também possuem ação em canais para cloreto, que são hiperexpressos em diferentes tipos de cânceres. A clorotoxina isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus* se liga especificamente a canais para cloreto ativados por Ca^{2+} na matrix extracelular de gliomas, e possui grande potencial para o uso em diagnóstico e tratamento de câncer. Com base nessa descoberta, a TransMolecular Inc. está conduzindo os testes de fase clínica 1 e 2, com a molécula ^{131}I -TM-601 (^{131}I -clorotoxina), para fins de diagnóstico por imagem, bem como para tratamento local de gliomas (LEWIS e GARCIA, 2003; HOCKADAY et al., 2005).

O escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, tem sido extensivamente estudado e muitas de suas toxinas já foram isoladas e caracterizadas (COUTINHO NETTO 1975; POSSANI et al., 1981; SAMPAIO, 1991; BORDON; COLOGNA e ARANTES, 2015). Tanto do ponto de vista da investigação fundamental, como do ponto de vista clínico, o conhecimento de toxinas peptídicas da peçonha de escorpião é de extrema importância. Entender o papel destas toxinas no envenenamento, elucidar seus mecanismos de ação e estrutura são apenas o início de um estudo maior, que visa a utilização destas moléculas como moldes para futuros fármacos, que possam contribuir com a ciência e a saúde humana.

2. CONCLUSÕES

Foram realizadas a padronização do isolamento das toxinas provenientes das frações XIIA e XIIB, e a identificação de toxinas já descritas na literatura e de 45 compostos ainda não identificados por espectrometria de massas e/ou sequenciamento amino-terminal.

A caracterização estrutural por RMN e caracterização funcional através de ensaios eletrofisiológicos da Ts11 nos mostrou que a toxina pode ser considerada uma bloqueadora fraca de Kvs, interagindo com o canal por bloqueio físico e não modulação da sua dependência de voltagem. A determinação da sua estrutura terciária por RMN mostrou que a Ts11 possui uma estrutura única e nova, do tipo *Inhibitory Cysteine Knot* (ICK), estabilizada por 4 pontes dissulfeto e sem os elementos de estrutura secundária alfa-hélice ou fita-beta. Podemos afirmar, com o melhor do nosso conhecimento, que este tipo de estrutura não foi descrito até o momento para toxinas de escorpião. Considerando as características estruturais inéditas e a atividade biológica em Kvs apontadas neste estudo, há evidências suficientes para a sugestão de uma nova subfamília de KTxs, a ϵ -KTx, sendo a Ts11 o primeiro membro desta subfamília: ϵ -KTx1.1

A caracterização eletrofisiológica da Ts9 mostrou que a toxina não possui atividade em canais para potássio dependentes de voltagem na concentração de 100 nM sobre os subtipos de canais testados. Apesar da Ts9 não ter bloqueado os canais testados, ela apresenta estrutura e resíduos-chave que sugerem sua ação em Kvs e estudo anteriormente publicado mostra que ela é um potente ligante de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância (SK).

A caracterização funcional da Ts1-G, uma isoforma precursora da Ts1, nos mostrou que quando comparada com a toxina madura Ts1, não apresentou atividade na concentração testada (100 nM). A diferença entre as duas toxinas está localizada na porção C-terminal: a Ts1 possui seu C-terminal amidado, enquanto que a isoforma Ts1-G possui um resíduo de glicina intacto (etapa que antecede a maturação da Ts1, onde o precursor sofre a ação de uma enzima alfa-amidante). A comparação das duas toxinas foi realizada a fim de analisar a importância da amidação C-terminal para a toxina madura. A Ts1 age como β - toxina, reduzindo o limiar de excitação do canal e/ou reduzindo as correntes de sódio, resultado que não foi observado para a Ts1-G.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOTTALEB, Y., et al. A common "hot spot" confers hERG blockade activity to alpha-scorpion toxins affecting K⁺ channels. **Biochem Pharmacol** v.76,n.(6),p. 805-815, 2008.
- ALMEIDA, F.M., et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1041-1045, 2002.
- ALVARENGA, E. R., et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics** v.2,p. 210-220, 2012.
- ALVES, R. S., et al. Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*). **Toxicon** v.74,p. 19-26, 2013.
- AMARAL, C. F. S.;N. A. REZENDE. Acidentes por escorpiões. **Arq Bras Med** v.4,p. 216, 1990.
- ARANTES, E. C., et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v. 8, p. 916, 1989.
- ARANTES, E. C., et al. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochim Biophys Acta** v.1199,n.(1),p. 69-75, 1994.
- ARNON, T., et al. BjalpαIT: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool. **Insect Biochem Mol Biol** v.35,n.(3),p. 187-195, 2005.
- AUGUSTE, P. et al. Leiurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ - Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 4753-4759, 1990.
- AUGUSTE, P. et al. Leiurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ - Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 4753-4759, 1990.
- BARHANING, J. et al. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus* gamma toxin receptor associated with the gating component of the Na⁺ channel from rat brain. **The Embo Journal**, Eynsham, v. 2, p.915-920, 1983.
- BARHANING, J. et al. *Tityus* gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. **Pflügers Archiv**, Berlin, v. 400, p. 22-27, 1984

- BECERRIL, B. et al. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. **FEBS**, Berlin, v. 335, p. 6-8, 1993.
- BENKHADIR, K., et al. Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. **Peptides** v.25,n.(2),p. 151-161, 2004.
- BIANCHI, L.;M. DRISCOLL. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. **WormBook**,p. 1-16, 2006.
- BERTAZZI, D.T. Isolamento e caracterização bioquímica dos components da peçonha de *Tityus serrulatus* com ação no sistema complemento. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2007
- BLANC, E., et al. Solution structure of TsKapa, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca(2+)-activated K⁺ channels. **Proteins** v.29,n.(3),p. 359-369, 1997.
- BLAUSTEIN, M.P., et al. Polypeptide toxins from the venoms of old world and new world scorpion preferentially block different potassium channels. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 40, p. 932-942, 1991.
- BORDON, K.C.F.; VARANDA, W. A.; ARANTES, E.C. Isolation and primary structure of a new scorpion toxin from *Tityus serrulatus* venom, 2009 [Online: <http://www.uniprot.org/uniprot/P86271>]
- BORDON, K. C. F.;C. T. COLOGNA;E. C. ARANTES. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*.In: P. GOPALAKRISHNAKONE;L. D. POSSANI;E. F. SCHWARTZ;R. C. RODRÍGUEZ DE LA VEGA. **Scorpion Venoms**. Netherlands, Springer, p. 411-438, 2015.
- BOSMANS, F.;M. F. MARTIN-EAUCLAIRE;J. TYTGAT. Differential effects of five 'classical' scorpion beta-toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. **Toxicol Appl Pharmacol** v.218,n.(1),p. 45-51, 2007.
- BOSMANS, F.;J. TYTGAT. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. **Toxicon** v.49,n.(2),p. 142-158, 2007.
- BOUGIS, P.E.; ROCHAT, H.; SMITH, L.A. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins: Structures of precursors, processing out comes, and expression of a functional recombinant toxin II. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, p. 19259–19265, 1989.
- BRADBURY, A. F.;M. D. FINNIE;D. G. SMYTH. Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. **Nature** v.298,n.(5875),p. 686-688, 1982.

- CARMO, A. O., et al. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon** v.90,p. 45-55, 2014.
- CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem** v.64,p. 493-531, 1995.
- CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron** v.26,n.(1),p. 13-25, 2000.
- CATTERALL, W. A., et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon** v.49,n.(2),p. 124-141, 2007.
- CECCHINI, A.L., et al. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTx-V on neurotransmitter uptake in vitro. *Toxicology and applied pharmacology*, New York, v. 217, 196-203, 2006
- CERNI, F. A., et al. Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K(+) channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. **Toxins (Basel)** v.6,n.(3),p. 892-913, 2014.
- CESTELE, S.;W. A. CATTERALL. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie** v.82,n.(9-10),p. 883-892, 2000a.
- CESTELE, S.;W. A. CATTERALL. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie** v.82,n.(9-10),p. 883-892, 2000b.
- CHAVEZ-OLORTEGUI C, MOLINA E, GRANIER C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Molecular immunology*, Oxford, v. 38, p. 867-76, 2002.
- CHEN, Z., et al. Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins. **PLoS One** v.8,n.(4),p. e60201, 2013.
- COELHO, V. A., et al. Functional and structural study comparing the C-terminal amidated beta-neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon** v.83,p. 15-21, 2014.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p, 2006.
- COLOGNA, C. T., et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein Pept Lett** v.16,n.(8),p. 920-932, 2009.

- COLOGNA, C. T., et al. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new alpha-KTx subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon** v.58,n.(1),p. 54-61, 2011.
- COLOGNA, C. T., et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. **FEBS J** v.279,n.(8),p. 1495-1504, 2012.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v.16, n.22, p. 10881-10890, 1988.
- COURAUD, F., et al. Two types a scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel, **Toxicon** v.40,p. 19, 1982.
- COUTINHO NETTO , J. **Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina**, Universidade de São Paulo,1975.
- DE LIMA, M. E.;M. F. MARTIN-EAUCLAIRE. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello). **Journal of Toxicology** v.14, 1995.
- DIEGO-GARCIA, E., et al. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cell Mol Life Sci** v.65,n.(1),p. **od venoms**. Berlin, Spring-Verlag, p. 379-394, 1978.
- DINIZ, C.R.; GONÇALVEZ,J.M. Some chemical and pharmacological properties of Brazilian scorpion venoms In: **Venoms.**, BUCKLEY, E.E.; PORGES, N.(Eds). Washington; A.A.A.S. Press. p. 131-144, 1956
- DINIZ, C. R. Chemical and pharmacological aspects of Tytiinae venoms. **In Artropod venoms**. Berlin, Spring-Verlag, p.379-394, 1978.
- DOYLE, D. A., et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science** v.280,n.(5360),p. 69-77, 1998.
- EDMAN, P.;G. BEGG. A protein sequenator. **Europ. J. Biochem**, v.1,p. 91, 1967.
- FERNANDES, V. M., et al. Dopamine release evoked by beta scorpion toxin, tityus gamma, in prefrontal cortical slices is mediated by intracellular calcium stores. **Cell Mol Neurobiol** v.24,n.(6),p. 757-767, 2004.
- FONTECILLA-CAMPS, J. C.;C. HABERSETZER-ROCHAT;H. ROCHAT. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.85,n.(20),p. 7443-7447, 1988.

- GAO, B., et al. Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. **Biosci Rep** v.33,n.(3), 2013.
- GARCIA-CALVO, M., et al. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. **J Biol Chem** v.268,n.(25),p. 18866-18874, 1993.
- GARCIA, M. L., et al. Use of toxins to study potassium channels. **J Bioenerg Biomembr** v.23,n.(4),p. 615-646, 1991.
- GOLDIN, A. L. Resurgence of sodium channel research. **Annu Rev Physiol** v.63,p. 871-894, 2001.
- GOMEZ, M.V., DINIZ, C.R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 33, p. 899-902, 1966.
- GORDON, D.;M. GUREVITZ. The selectivity of scorpion α -toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. **Toxicon** v.41,p. 128, 2003.
- GORDON, D., et al. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **Toxicon** v.17,p. 159, 1998.
- GOUET, P.; COURCELLE, E. ESPript: multiple sequence alignments in postscript. **Bioinformatics**, Oxford, v. 15, p. 305-308, 1999.
- GUREVITZ, M., et al. Sodium channel modifiers from scorpion venom: structure-activity relationship, mode of action and application. **Toxicon** v.36,n.(11),p. 1671-1682, 1998.
- GUTMAN, G. A., et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Rev** v.57,n.(4),p. 473-508, 2005.
- HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophys J** v.22,n.(2),p. 283-294, 1978.
- HILLE, B. Introduction- Ohm's law is central **Ion channels of excitable membranes**. Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc, p.1-22, 2001.
- HOCKADAY, D. C., et al. Imaging glioma extent with ¹³¹I-TM-601. **J Nucl Med** v.46,n.(4),p. 580-586, 2005.

- ISBISTER, G. K.;H. S. BAWASKAR. Scorpion envenomation. **N Engl J Med** v.371,n.(5),p. 457-463, 2014.
- ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon** v.33,n.(7),p. 825-858, 1995.
- JOVER, E., et al. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. **Biochemistry** v.19,n.(3),p. 463-467, 1980.
- KELLER, R. **The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial**. 1st ed. Cantina, Goldau, 2004
- KIM, J. B. Channelopathies. **Korean J Pediatr** v.57,n.(1),p. 1-18, 2014.
- KIRSCH, G. E., et al. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. **J Gen Physiol** v.93,n.(1),p. 67-83, 1989.
- LASKOWSKI, R.A., et al. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **J. Appl. Crystallogr.**, 26, 283-291, 1993.
- LECOMTE, C., et al. Chemical synthesis and structure-activity relationships of Ts kappa, a novel scorpion toxin acting on apamin-sensitive SK channel. **J Pept Res** v.54,n.(5),p. 369-376, 1999.
- LEE, S. H., et al. Cloning and functional characterization of a putative sodium channel auxiliary subunit gene from the house fly (*Musca domestica*). **Insect Biochem Mol Biol** v.30,n.(6),p. 479-487, 2000.
- LEGROS, C., et al. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. **FEBS Lett** v.390,n.(1),p. 81-84, 1996.
- LEWIS, R. J.;M. L. GARCIA. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov** v.2,n.(10),p. 790-802, 2003.
- LOUGHNEY, K.;R. KREBER;B. GANETZKY. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell** v.58,n.(6),p. 1143-1154, 1989.
- LOURENÇO, W. R. Diversity and endemism in Tropical versus Template scorpion communities. **Biogeographica** v.70,p. 155-160, 1994.
- LUTZ, A. M., O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica** v.III,p. 26, 1922.

- MACHADO, R. J., et al. Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*. **Toxicon** v.101,p. 11-18, 2015.
- MARANGONI, S., et al. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Journal of Protein Chemistry**, New York, 9, 595-601, 1990.
- MARCUSSI, S.;E. C. ARANTES;A. M. SOARES. Envenenamento. **Escorpiões-Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. Ribeirão Preto, Brazil, Funpec, p.33-70, 2011.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. **FEBS Lett** v.302,n.(3),p. 220-222, 1992.
- MASSENSINI, A. R., et al. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. **Neuropharmacology** v.37,n.(3),p. 289-297, 1998.
- MERKLER, D. J. C-terminal amidated peptides: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. **Enzyme Microb Technol** v.16,n.(6),p. 450-456, 1994.
- MIRANDA, F. et al. Purification of animals toxins, isolation and characterizations of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* (Hector), *Buthus occitamus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. **European Journal of Biochemistry FEBS**, Berlin, v. 16, p. 514-523, 1970.
- MOHAMED, A.H. Notes on the toxin of Egyptian scorpions.**The Biochemical Journal**, London,v. 38, p. 287-285, 1944
- MOUHAT, S., et al. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. **Biochemical Journal** v.378,p. 717-726, 2004.
- NORTON, R. S. Toxin structure and function: What does structural genomics have to offer?In: A. MÉNEZ. **Perspectives in molecular toxinology**. England John Wiley & Sons, Ltda, p.159-173, 2002.
- NOVELLO, J.C. et al. TsTX-IV, a short chain four-disulfite-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca^{+} - activated K^{+} channels. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 651-660, 1999.
- PEIGNEUR, S., et al. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na-type isoforms. **Neuropharmacology**, 2015.

- PENN, R. D.;J. A. PAICE. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. **Pain** v.85,n.(1-2),p. 291-296, 2000.
- PESSINI, A. C., et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon** v.39,n.(10),p. 1495-1504, 2001.
- PETRICEVICH, V. L., LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm** v.2005,n.(1),p. 39-49, 2005.
- PIMENTA, A. M.;M. E. DE LIMA. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science** v.11,n.(11),p. 670-676, 2005.
- PIMENTA, A. M., et al. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. **Biochem Biophys Res Commun** v.301,n.(4),p. 1086-1092, 2003.
- PINHEIRO, C. B., et al. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** v.59,n.(Pt 3),p. 405-415, 2003.
- POLIKARPOV, I., et al. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. **J Mol Biol** v.290,n.(1),p. 175-184, 1999.
- POSSANI, L. D., et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur J Biochem** v.264,n.(2),p. 287-300, 1999.
- POSSANI, L. S., et al. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz e Mello. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v.46, p.205, 1981.
- POSSANI, L. D.;B. M. MARTIN;I. SVENDSEN. THE PRIMARY STRUCTURE OF NOXIUSTOXIN: A K⁺ CHANNEL BLOCKING PEPTIDE PURIFIED FROM THE VENOM OF THE SCORPION CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN **Carlsberg Res. Commun** v.47,p. 285-289, 1982.
- POSSANI, L. S., et al. Purification and properties of mamalian toxins from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Arch.Biochem.Biophys** v.180,p. 403, 1977.
- POSSANI, L. S., et al. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz e Mello. **Carlsberg Res.Commun.** v.46,p. 205, 1981.

- QUINTERO-HERNANDEZ, V., et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon** v.76,p. 328-342, 2013.
- RATES, B., et al. Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon** v.52,n.(5),p. 611-618, 2008.
- RECKZIEGEL, G. C.;V. L. PINTO, JR. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis** v.20,p. 46, 2014.
- RIDGEWAY, B.;M. WALLACE;A. GERAYLI. Ziconotide for the treatment of severe spasticity after spinal cord injury. **Pain** v.85,n.(1-2),p. 287-289, 2000.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.;L. D. POSSANI. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. **Toxicon** v.43,n.(8),p. 865-875, 2004.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.;L. D. POSSANI. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon** v.46,n.(8),p. 831-844, 2005.
- ROGOWSKI, R. S. et al. Tityustoxin K-alpha blocks voltage-gated non-inactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1475-1479, Feb 15 1994.
- ROSENGREN, K. J., et al. Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotideframework. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, p. 8606–8616, 2003.
- SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 21, p. 265-277, 1983.
- SAMPAIO, S. V. A., E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPPO NETO, F; GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T₁IV (TsTX-III) and T₂IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon** v.29,p. 672, 1991.
- SAUCEDO, A. L., et al. New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. **J Biol Chem** v.287,n.(15),p. 12321-12330, 2012.
- SCARBOROUGH, R. M., et al. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from venom of *Sistrurus m. barburi*. **J Biol Chem** v.266,p. 9362, 1991.
- SCHOLTE, R. G., et al. Inter- and intrapopulational genetic variability of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Acta Trop** v.112,n.(2),p. 97-100, 2009.

- SCHWIETERS, C. D., et al. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. **J. Magn. Reson.** v.160,n.(1),p. 65-73, 2003.
- SHAKA, A.J., LEE, C.J. AND PINES, A. Iterative Schemes for Bilinear Operators - Application to Spin Decoupling. **J. Magn. Reson.**, 77, 274-293, 1988.
- SMITH, J. J., et al. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.108,n.(26),p. 10478-10483, 2011a.
- SMITH, J. J., et al. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.108,n.(26),p. 10478-10483, 2011b.
- SMITH, J. J., et al. Multiple actions of phi-LITX-Lw1a on ryanodine receptors reveal a functional link between scorpion DDH and ICK toxins. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.110,n.(22),p. 8906-8911, 2013.
- SPRONK, C.A.E.M., et al. Improving the quality of protein structures derived by NMR spectroscopy. **J. Biomol. Nmr**, 22, 281-289, 2002.
- SRINIVASAN, J.;M. SCHACHNER;W. A. CATTERALL. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.95,n.(26),p. 15753-15757, 1998.
- SRINIVASAN, K. N., et al. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. **J Biol Chem** v.277,n.(33),p. 30040-30047, 2002.
- STEIN, E.G., RICE, L.M. AND BRUNGER, A.T. Torsion-angle molecular dynamics as a new efficient tool for NMR structure calculation. **J. Magn. Reson.**, 124, 154-164, 1997.
- STEVENS, M.;S. PEIGNEUR;J. TYTGAT. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Front Pharmacol** v.2,p. 71, 2011.
- TOLEDO, D., V.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 55, p. 249-253, 1976.TYTGAT, J., et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends Pharmacol Sci** v.20,n.(11),p. 444-447, 1999.
- UNIPROT. **Scorpktx: Scorpion potassium channel toxins: nomenclature and list of entries**, 2015.

- VASCONCELOS, F., et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** v.141,n.(1),p. 85-92, 2005.
- VERANO-BRAGA, T., et al. *Tityus serrulatus* Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.371,n.(3),p. 515-520, 2008.
- WULFF, H.;N. A. CASTLE;L. A. PARDO. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov** v.8,n.(12),p. 982-1001, 2009.
- YATANI, A., et al. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. **Am J Physiol** v.254,n.(3 Pt 2),p. H443-451, 1988.
- YU, F. H.;W. A. CATTERALL. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biol** v.4,n.(3),p. 207, 2003.
- YU, L., et al. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex. **Biochemistry** v.44,n.(48),p. 15834-15841, 2005.
- YUAN, C. H., et al. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. **PLoS One** v.3,n.(10),p. e3414, 2008.
- ZHU, S. Y., et al. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. **Faseb Journal** v.17,n.(10),p. 1765-+, 2003.
- ZLOTKIN, E.;Y. FISHMAN;M. ELAZAR. AaIT: from neurotoxin to insecticide. **Biochimie** v.82,n.(9-10),p. 869-881, 2000.