UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião
***Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das**
toxinas Ts6 e Ts7

Felipe Augusto Cerni

Ribeirão Preto

2012

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 01/06/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião
***Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das**
toxinas Ts6 e Ts7

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Felipe Augusto Cerni

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

Ribeirão Preto

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Augusto Cerni

Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

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

Aprovado em: ____ / ____ / 2012

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico esta dissertação aos meus pais **Antonio Francisco e Maria de Lourdes**, pelo incentivo, aos meus irmãos, **Gustavo e Caroline** pela amizade, e a **Manuela** pela amizade e carinho constante.*

Dedicatória

A minha orientadora, Eliane Candiani Arantes, pela amizade, oportunidade e confiança, além de compartilhar seu conhecimento científico.

Ao programa de Pós Graduação em Toxicologia, principalmente as secretárias Maria Aparecida de Almeida Consuli Segato e Rosemary Ioshimine Gerolineto, pelo auxílio nas atividades burocráticas.

Ao suporte financeiro cedido pela CAPES e FAPESP.

Ao Dr. José Elpidio Barbosa, por compartilhar as instalações do seu laboratório e também por me incluir nos momentos de descontração de sua equipe.

Ao Dr. Jan Tytgat e ao laboratório de toxicologia da Universidade Católica de Leuven (Elia, Dieter, Steve, Sarah, Marijke e Anelees) pela oportunidade profissional fantástica proporcionada durante os seis meses de estágio na Bélgica.

Aos meus amigos do laboratório de Toxinas Animais que tornaram o ambiente de trabalho um local agradável para se conviver (Carol, Fernando, Renata, Fernanda, Iara, Johara, Ernesto, Priscila, Gisele, Franciele, Amanda, Tibério, Matheus, Elisa), em especial à Karla pelo auxílio científico e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunopatologia Molecular (Jaqueline, Thaís, Carolina, Fernanda, Eduardo, Lucas e Luciano,) por fazer a minha adaptação ao cotidiano acadêmico mais fácil.

Aos meus grandes amigos de infância, Fernando e Naif pela fiel amizade que já existe a mais de 20 anos, sempre me ajudando nos momentos de tristeza ou de alegria (**Mocó**).

Às minhas amigas, Liliane, Paula e Elyara por fazerem a minha estadia aqui em Ribeirão Preto mais alegre e divertida.

Aos meus amigos brasileiros que residem na Bélgica (Cadu, Bia, João, Ana Paula, Juliana e Tutu), em especial à Camila e Jan Piessens (90% brasileiro) mostrando que é possível ter diversão e alegria em qualquer lugar do planeta, basta apenas ter mais brasileiros no mesmo.

Aos meus irmãos (Caroline e Gustavo) pelo carinho e amizade e aos meus pais (Antonio e Maria) pelo incentivo e por me mostrar a importância de valorizar o conhecimento.

Em especial a minha esposa Manuela, pelo auxílio emocional e intelectual, me inspirando cada vez mais a ser um pesquisador e ser humano mais determinado.

Epígrafe

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein

RESUMO

CERNI, F. A. **Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7.** 2012. 86p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

No Brasil, a espécie *Tityus serrulatus* (Ts) é a responsável pela maioria dos acidentes de envenenamento com escorpiões, bem como pela maior incidência de acidentes ocasionados por animais peçonhentos. Isso ocorre devido ao fato desta espécie possuir somente fêmeas, realizando uma reprodução assexuada (partenogênese), facilitando assim sua proliferação. Atualmente, existem 16 diferentes toxinas descritas provenientes da peçonha de Ts, sendo a Ts1 a mais abundante na peçonha solúvel. Dentre estas toxinas, as neurotoxinas com ação em canais para sódio e potássio são as que despertam maior interesse da comunidade científica, devido aos seus efeitos no envenenamento e especificidades por canais iônicos. As neurotoxinas com ação em canais para potássio são compostas por uma alfa-hélice e três fitas-beta antiparalelas, e são constituídas por 23-43 resíduos de aminoácidos. Essas estão classificadas em quatro famílias (α -, β -, γ - e κ -KTx). A família α -KTx é a de maior relevância e está dividida em 21 subfamílias. Estas toxinas com alta especificidade para diferentes subtipos de canais para sódio e potássio são de extrema importância, pois podem ser utilizadas como ferramentas terapêuticas específicas para células-alvo. Até o momento, nosso grupo realizava o isolamento dessas toxinas utilizando como primeira etapa de purificação a cromatografia da peçonha em coluna de CM-Celulose-52, segundo protocolo descrito por Arantes e colaboradores (1989). O presente trabalho padronizou um novo método de fracionamento inicial da peçonha utilizando a mesma coluna, porém incorporando o uso de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), onde foi possível observar um perfil cromatográfico semelhante ao anterior (XIII Frações), porém com maior reprodutibilidade e praticidade. Algumas frações do método anteriormente descrito foram subdivididas em duas (VIA-VIB, VIIIA-VIIIB, IXA-IXB e XIA-XIB), demonstrando que o novo procedimento também apresenta melhor resolução dos componentes da peçonha. Utilizando o novo método, foram purificadas as toxinas Ts6 e Ts7. Os efeitos dessas toxinas foram avaliados em 14 diferentes tipos de canais para potássio (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.1, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4, hERG e *Shaker*), expressos em células de oócitos de *Xenopus laevis*, através da técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos. A toxina Ts6 (1 μ M) demonstrou ter ação em 11 tipos de canais (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4, hERG e *Shaker*), porém nos canais Kv1.2, Kv1.3 e *Shaker* sua ação bloqueadora foi mais intensa. Através de experimentos de dose-resposta foi possível comprovar tal seletividade, demonstrando que a toxina Ts6 atua em quantidades extremamente baixas em ambos os canais (IC_{50} Kv1.2 = 6,19 $\pm$ 0,35 nM / IC_{50} Kv1.3 = 0,55 $\pm$ 0,20 nM). A toxina Ts7 (1 μ M) demonstrou ter ação em 11 tipos de canais para K⁺ (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.1, Kv7.1, hERG e *Shaker*), porém a ação de bloqueio em vários subtipos de canais não apresentou diferenças significativas, mostrando baixa seletividade entre os canais analisados. Este trabalho foi de

extrema importância por melhorar a reprodutibilidade, praticidade e resolução do método de fracionamento da peçonha de *Ts*, bem como por fornecer uma avaliação eletrofisiológica criteriosa das toxinas Ts6 e Ts7 em diferentes subtipos de canais para potássio.

O presente estudo demonstra a potencial aplicação da toxina Ts6, seletiva para canais K_v 1.3, para o tratamento de doenças autoimunes. Além disso, indica o uso das toxinas Ts6 e Ts7 como ferramentas para o estudo de características estruturais e funcionais de canais para potássio.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*, neurotoxinas, α -KTx, canais para potássio, Ts6, Ts7, eletrofisiologia, fracionamento de toxinas.

ABSTRACT

CERNI, F. A. **New fractionation procedure of *Tityus serrulatus* venom and electrophysiological characterization of toxins Ts6 and Ts7.** 2012. 86p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

In Brazil, *Tityus serrulatus* (Ts) species is the responsible for the most scorpion accidents and also for the major incidence of accidents caused by venomous animals. About 16 different toxins of Ts venom have been listed so far, being Ts1 the major one. Among these toxins, the neurotoxins with action on sodium and potassium channels are the most interest in the scientific community, due to their effect in the envenomation and ion channel specificity. The neurotoxins with action on potassium channels are composed of an α -helix and three β -strands formed by 23-43 amino acid residues. They are classified into four families (α -, β -, γ - and κ -KTx). The α -KTx family is the most relevant and is divided into 21 subfamilies. These toxins with high specificity for different subtypes of sodium and potassium channels are very important, because they can be used as therapeutic tools to specific target cells. Until now, the fractionation of these toxins was done using a CM-Cellulose-52 column, according to the protocol of Arantes and co-workers (1989). The present work standardized a new method of isolation using the same column, but incorporated the use of HPLC (High Performance Liquid Chromatography), in which was observed a chromatographic profile such as the previous one (XIII Fractions), however with high resolution and more practical. Some fraction of the previous method were divided in two subfractions (VIA-VIB, VIIIA-VIIIB, IXA-IXB e XIA-XIB), showing that the new method also present high resolution. Using the new method, it was isolated the Ts6 and Ts7 toxin. The effects of these toxins were evaluated in 14 different types of potassium channels (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.1, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4, hERG and *Shaker*), which were expressed in *Xenopus laevis* oocytes using the voltage-clamp technique with two-microelectrodes. The Ts6 toxin (1 μ M) shows to act on 11 types of potassium channels (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4, hERG and *Shaker*), but the blocking of Kv1.2 and Kv1.3 was significantly more intense. Using dose-response experiments, it was possible to confirm this selectivity, in which Ts6 demonstrates to act in both channels in extremely low quantities (IC_{50} Kv1.2 = $6,19 \pm 0,35$ nM / IC_{50} Kv1.3 = $0,55 \pm 0,20$ nM). The Ts7 toxin (1 μ M) shows to act on 11 types of potassium channels (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4, hERG and *Shaker*), but the blocking action on multiple subtypes channels showed no significant differences, showing low selectivity among the channels analyzed. This work was important to improve and facilitate the method of fractionation of Ts venom, as well as evaluate the electrophysiology properties of the toxins Ts6 and Ts7 of interacting with different types of potassium channels. These studies will be essential for future applications of these toxins as drugs to treat channelopathies or as tools to study potassium channels structurally and functionally.

Keywords: *Tityus serrulatus*, neurotoxins, α -KTx, potassium channels, Ts6, Ts7, electrophysiology, fractionation of toxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O escorpião *Tityus serrulatus*.

Figura 2. Figura esquemática da anatomia do escorpião *Tityus serrulatus*.

Figura 3. Representação esquemática de uma subunidade α do canal para potássio.

Figura 4. Procedimentos cirúrgicos para obtenção dos oócitos de *Xenopus laevis*.

Figura 5. Injeção do cRNA nos oócitos de *Xenopus laevis*.

Figura 6. O protocolo de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes de potássio de oócitos de *Xenopus laevis*.

Figura 7. Perfil cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em sistema CLAE com coluna de CM-celulose-52.

Figura 8. Perfil cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-celulose-52.

Figura 9. Perfil eletroforético das frações obtidas da cromatografia da peçonha de *Ts* em coluna de CM-Celulose-52 em sistema CLAE.

Figura 10. Perfil cromatográfico da fração X em sistema CLAE com absorbância em 214 nm.

Figura 11. Perfil cromatográfico da fração XI em sistema CLAE com absorbância em 280 nm.

Figura 12. Perfil eletroforético das subfrações obtidas da CLAE em coluna C-18 da Fração XI.

Figure 13. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio na ausência ou presença (*) de 1 μ M de Ts6.

Figure 14. Influência da dose de Ts6 no bloqueio de canais para potássio dos subtipos Kv1.2 e Kv1.3.

Figure 15. Bloqueio induzido pela toxina Ts6 em diferentes subtipos de canais para potássio.

Figure 16. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio na ausência ou presença (*) de 1 μ M de Ts7.

Figure 17. Bloqueio induzido pela toxina Ts7 em diferentes subtipos de canais para potássio.

Figura 18. Alinhamento das sequências em aminoácidos de toxinas α -KTx (primeiro membro de cada família) com a Ts6 (A) e Ts7 (B).

Figura 19. Alinhamento das sequências em aminoácidos das toxinas da família α -KTx com maior identidade com a Ts7 (A) e Ts6 (B).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação das Frações obtidas na cromatografia da peçonha bruta de *Ts*.

Tabela 2. Recuperação das subfrações obtidas na cromatografia da Fração X.

Tabela 3. Recuperação das subfrações obtidas na cromatografia da Fração XI.

Tabela 4. Sequenciamento N-terminal das subfrações 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 17 obtidas da fração XI da peçonha de *Tityus serrulatus*.

Tabela 5. Toxinas da família α -KTx que apresentam efeito de bloqueio em subtipos de canais para potássio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM-celulose	Carboxi-Metil-Celulose
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IC₅₀	Concentração Inibitória 50%
IL	Interleucina
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	Ácido Trifluoracético
Ts	<i>Tityus serrulatus</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
Kv	Canal para Potássio Sensível à Voltagem

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. História das toxinas naturais	1
1.2. Os escorpiões	2
1.3. <i>Tityus serrulatus</i>	3
1.4. Composição da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	5
1.5. Canais iônicos sensíveis à voltagem, canais para potássio e toxinas de <i>Tityus serrulatus</i> específicas para canais para potássio.....	6
1.6. Isolamento de toxinas da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	10
1.7. Toxinas animais como potenciais drogas terapêuticas	12
2. Objetivos	14
3. Materiais e métodos	15
3.1. A peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	15
3.2. Preparação da amostra	15
3.3. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	16
3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18 da fração XI	17
3.5. Eletroforese para proteínas básicas	17
3.6. Sequenciamento amino-terminal	17
3.7. Determinação da atividade hialuronidásica	18
3.8. Eletrofisiologia	18
3.8.1. Seleção, preparação e injeção do cRNA nos oócitos.....	19
3.8.2. Medidas eletrofisiológicas	21
3.8.3. Protocolo	21
3.8.4. Alinhamento	22
4. Resultados	24
4.1. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	24
4.2. CLAE em coluna C-18.....	29

4.2.1. CLAE em coluna C-18 da fração X.....	29
4.2.2. CLAE em coluna C-18 da fração XI.....	31
4.3. Sequenciamento amino-terminal das toxinas isoladas.....	35
4.4. Eletrofisiologia	35
4.4.1. Toxina Ts6.....	35
4.4.2. Toxina Ts7	39
4.5. Alinhamento das sequências das toxinas.....	41
5. Discussão.....	45
6. Conclusões.....	51
7. Referências	52

Introdução

1. Introdução

1.1. História das toxinas naturais

Desde as épocas mais remotas da humanidade, o homem sempre teve fascinação por venenos naturais (animais e vegetais) e pelos efeitos tóxicos produzidos através de sua interação com organismos vivos. Documentos de origem egípcia encontrados (Papiro de Ebers, 1500 a.C) relatam uma lista com mais de 800 ingredientes ativos, incluindo metais, vegetais tóxicos e venenos animais (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008).

Essas substâncias vêm sendo utilizadas ao longo da história por diferentes culturas (egípcias, gregas, romana, indígenas, etc.) para as mais diversas finalidades: como ferramentas para obtenção de alimentos para sobrevivência, “armas” utilizadas em assassinatos e além de ser um fascinante objeto de estudo. Na Grécia, Sócrates foi condenado à morte com a pena de ingerir extrato proveniente da espécie *Conium maculatum* (cicuta), planta altamente tóxica nativa das regiões temperadas do hemisfério norte, que também teve sua propriedade tóxica empregada com a finalidade de tornar armas mais letais, através da utilização do seu extrato em pontas de flechas e lanças. Os indígenas também utilizavam toxinas na caça, cobrindo suas flechas com curare, um composto orgânico extraído de plantas (principalmente as do gênero *Chondrodendron* e *Strychnos*). Claude Bernard utilizou o mesmo composto em pesquisas com a finalidade de elucidar sua ação em placa terminal de músculos estriados e suas aplicações em pacientes durante a anestesia cirúrgica.

O interesse pelas substâncias tóxicas naturais também despertou a curiosidade e necessidade de estudar a elaboração de antídotos. Maimonides (1135-1204), médico árabe, escreveu o tratado *Poisons and Their Antidotes*, documento que descrevia o tratamento para envenenamento por cobras, insetos e cachorro louco (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008). Em 1984, o médico francês Léon Charles Albert Calmette (1863-1933) desenvolveu o primeiro antiveneno eficiente relatado na literatura, o qual foi denominado soro de Calmette. A ação deste soro demonstrou ser eficaz contra mordidas de cobras do gênero *Naja*,

porém, devido ao fato deste soro ser monovalente, não podia ser empregado para envenenamentos de serpentes ou cobras de outros gêneros (Hawgood, 1999). O médico brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha (1865-1950) produziu um soro polivalente específico para o tratamento de mordidas de serpentes (1889). Desde então, a técnica desenvolvida por Vital Brazil (hiperimunização de equinos) vem sendo utilizada na produção de antivenenos para peçonhas de animais como serpentes, escorpiões, aranhas, etc (Hawgood, 1992).

Assim, a utilização das substâncias tóxicas naturais ao longo da história, seja para o seu uso benéfico ou maléfico, foram de extrema importância para o “cenário” da pesquisa atual. Os efeitos que elas produzem ao entrar em contato com seres vivos despertaram o interesse de estudá-las para uma melhor compreensão de suas estruturas e mecanismos de ação. O melhor entendimento de suas ações quando em contato com os seres humanos é fundamental para aprimorar os protocolos de tratamento das vítimas de envenenamentos, assim como para auxiliar na produção de substâncias com capacidade de antagonizá-las. Além disso, seu uso potencial como ferramenta para o entendimento de diferentes processos fisiológicos, ou como fármacos para o tratamento de diversas patologias, tem despertado o interesse de inúmeros pesquisadores. Dessa maneira, as toxinas naturais são cada vez mais consideradas alvos de estudo, assim como os organismos responsáveis pela sua produção.

1.2. Os escorpiões

Os escorpiões estão presentes na Terra há mais de 400 milhões de anos, constituindo um dos grupos de animais mais antigos remanescentes (Lourenço e Coellar, 1995). Possuem aproximadamente 1700 espécies e subespécies descritas (Scholte *et al.*, 2009), as quais preservaram sua morfologia com poucas alterações ao longo do processo evolutivo (Briggs, 1987). Pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, a ordem Scorpionida possuem 6 superfamílias, que estão divididas em 13 famílias e 55 gêneros. A família Buthidae é considerada a mais importante por possuir os escorpiões mais perigosos para os seres humanos, compreendendo aproximadamente 500 espécies (Balozet, 1971).

Os acidentes ocasionados por escorpiões representam um grande problema de saúde pública em vários países no mundo. No Brasil, em 2008, foram relatados 107.417 casos envolvendo acidentes por envenenamento por animais peçonhentos, sendo que aproximadamente 12% (12.747) desses casos ocorreram apenas no estado de São Paulo. Em 2011, foram relatados no estado de São Paulo, 16.523 casos de acidente com animais peçonhentos, sendo que 7.017 (42,5 %) desses relatos causados por acidentes com escorpião (Centro-de-Vigilância-Epidemiológica, 2011; Portal-da-Saúde, 2012). As espécies *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus* são as principais responsáveis por estes dados, sendo todas pertencentes à família Buthidae.

O *Tityus serrulatus* (Ts) (Lutz e Mello, 1922) é considerado a espécie mais perigosa do país, sendo responsável pelo maior número de acidentes (Petricevich e Lebrun, 2005). Este dado talvez tenha sua explicação no fato dos indivíduos dessa espécie se reproduzir através de partenogênese (reprodução assexuada). Além disso, a gestação ocorre em aproximadamente 3 meses e pode gerar em torno de 20 filhotes (Lourenço e Coellar, 1995; Lourenço, 2007). Adicionalmente, a falta de predadores naturais e a facilidade de abrigos e alimentos que os centros urbanos oferecem, auxiliam na ampliação do seu habitat, que favorece o crescimento desordenado dessa espécie e pode resultar em até severas consequências no equilíbrio ecológico (Burcherl, 1979; Likes, Banner e Chavez, 1984).

1.3. *Tityus serrulatus*

O escorpião *Tityus serrulatus* (Figura 1) pode medir entre 6 e 7 centímetros quando adulto e, assim como os demais escorpiões, possui o corpo dividido em três partes: prossoma, mesossoma e metassoma. Possui quatro pares de pernas torácicas, um par de pedipalpos (utilizadas para segurar e dominar suas presas) e quelíceras (órgãos pré-bucais utilizadas para rasgar e triturar o alimento). Porém algumas características são peculiares da espécie, como a coloração diferenciada do tronco em marrom-escuro e a da “cauda” em amarelo, responsável por tornar a essa espécie conhecida popularmente como escorpião amarelo. A presença de uma serrilha (constituída por pequenos “dentes”) na face dorsal dos segmentos distais da “cauda” é responsável pelo nome *serrulatus* à espécie (Lutz e Mello, 1922).

Localizado na extremidade do metassoma, o ferrão do escorpião é um aparato de extrema importância para sobrevivência do animal, auxiliando na alimentação e defesa do mesmo. O telson é a base do ferrão e nele está contida a vesícula, a qual possui um formato inicialmente globular, terminando em um espinho curvo, denominado acúleo, o qual é semelhante a uma agulha hipodérmica (Figura 2). Dentro da vesícula estão localizados nos pares de glândulas, responsáveis pela produção e armazenamento da peçonha. Cada glândula é conectada através de dois canais a duas aberturas próximas a região terminal do telson, local responsável pela saída da peçonha (Marcussi *et al.*, 2011).

Figura 1. O escorpião *Tityus serrulatus* (Laboratório de Toxinas Animais – FCFRP – USP)

Figura 2. Figura esquemática da anatomia do escorpião *Tityus serrulatus*

[figura modificada do Manual de Controle de Escorpiões (Ministério-da-Saúde, 2009)]

1.4. Composição da peçonha de *Tityus serrulatus*

A peçonha do *T. serrulatus* é constituída de muco insolúvel, mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, moléculas de baixa massa molar (como serotonina e histamina), inibidores de proteases, liberadores de histamina, aminoácidos e outros componentes orgânicos, além de inúmeras proteínas de baixa massa molar com atividade neurotóxica (Vasconcelos *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que fatores externos como condições climáticas e hábitos alimentares podem ser determinantes para pequenas modificações na composição da peçonha (Watt e Simard, 1984).

As neurotoxinas são os componentes mais importantes da peçonha de escorpiões. Elas interferem nos mecanismos de permeabilidade iônica de membranas de células excitáveis, por interagirem especificamente com canais para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- dependentes de voltagem, alterando seus mecanismos de

ativação ou inativação, levando à intensa despolarização celular e liberação de neurotransmissores (Gordon *et al.*, 1998; Possani *et al.*, 1999).

Embora neurotoxinas específicas para canais para sódio sejam consideradas os componentes mais tóxicos da peçonha do escorpião, as neurotoxinas que atuam em canais para potássio são de extrema importância para o quadro do envenenamento, por agir de forma sinérgica com as neurotoxinas para sódio e assim potencializando ainda mais a ação tóxica da peçonha. Atualmente, toxinas que interagem seletivamente com canais para potássio têm sido utilizadas como ferramentas para o estudo das propriedades estruturais e mecanismos de ação destes canais, permitindo a identificação dos tipos de canais normalmente presentes nos diversos tipos celulares, a determinação de suas condutâncias, bem como de seu papel fisiológico (Cologna *et al.*, 2009). Além disso, essas toxinas são extensivamente utilizadas em pesquisas em que os alvos terapêuticos são doenças relacionadas à canais para potássio (canalopatias), como doenças cardíacas (fibrilação atrial), neurológicas (epilepsia) e metabólicas (diabetes tipo I) (Wulff, Castle e Pardo, 2009).

1.5. Canais iônicos sensíveis à voltagem, canais para potássio e toxinas de *Tityus serrulatus* específicas para canais para potássio

Os canais iônicos sensíveis à voltagem são proteínas de membrana que permitem a passagem seletiva de íons de Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e são responsáveis pela geração e propagação de sinais elétricos em neurônios e outras células excitáveis. Os canais iônicos sensíveis à voltagem possuem a capacidade de mudar a sua conformação para aberto, fechado ou inativado, em função do potencial de membrana, permitindo assim, um movimento eficiente e rápido de íons específicos a favor do gradiente eletroquímico. Dessa maneira, correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, resultando na despolarização ou repolarização da membrana (Catterall, 1984).

Os canais para K^+ sensíveis a voltagem (Kv) são muito importantes em vários processos fisiológicos, tais como excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores e ativação de linfócitos (Gutman *et al.*, 2005).

Funcionalmente, os canais para potássio podem ser divididos em duas

regiões: uma região sensível à voltagem, que compreende os segmentos transmembrana S1 a S4, que contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente; e uma região formadora do poro condutor, formada pelos segmentos S5, S6 e pelo *loop* P (Catterall, 1998). O mecanismo de abertura e fechamento (*gating*) do canal localiza-se na região C-terminal do segmento S3 e o segmento S4 formando uma estrutura parecida a um remo, responsável pela abertura e fechamento do canal (Figura 3) (Doyle *et al.*, 1998).

Figura 3. Representação esquemática da subunidade α do canal para potássio. A figura apresenta os 6 segmentos transmembrana de uma única subunidade do canal. [figura modificada de (Cestele e Catterall, 2009)].

Os canais para K^+ possuem uma vasta diversidade, sendo uma família formada por mais de 40 tipos diferentes de canais, classificados em pelo menos 12 subfamílias de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos (Kv1 – Kv12) (Gutman *et al.*, 2005). Estas subfamílias são encontradas em diversos tipos de tecidos do organismo. Dentre elas a Kv1(*Shaker*), que é codificada por oito diferentes genes, expressando oito subtipos de canais para potássio (Kv1.1 – Kv1.8), é a mais estudada e suas isoformas podem ser encontradas mais frequentemente no cérebro, coração, sistema nervoso periférico, rim, pâncreas, pulmão, retina, linfócitos, osteoclastos e células hematopoiéticas (Mouhat *et al.*, 2008).

A subfamília *Shab* (Kv2) possui apenas as isoformas Kv2.1 e Kv2.2, estudos demonstraram que estas possuem ligantes específicos para toxinas de aranhas

(Mouhat *et al.*, 2008) e são encontradas mais frequentemente em neurônio, cérebro, coração, rim, pulmão, retina e pâncreas (Mouhat *et al.*, 2008).

Codificada por 4 genes (Kv3.1 – Kv3.4), a subfamília *Shaw*, que pode ser encontrada principalmente no cérebro, interage com toxinas seletivas provenientes de anêmonas do mar (Mouhat *et al.*, 2008).

A subfamília Kv4 ou *Shal*, possui três isoformas (Kv4.1 – Kv4.3) localizadas no cérebro, musculatura lisa e coração. Estudos demonstraram que toxinas de escorpiões e aranhas possuem característica de bloqueadores específicos para estas isoformas (Mouhat *et al.*, 2008).

Estudos até o presente não encontraram ligantes naturais para a subfamília Kv7, a qual possui cinco isoformas (Kv7.1 – Kv7.5) e estas são encontradas no coração, sistema nervoso central, músculo esquelético (Mouhat *et al.*, 2008).

As subfamílias Kv5, Kv6, Kv8 e Kv9 podem formar canais heteromultiméricos com subunidades α da subfamília Kv2, mas não conseguem formar individualmente canais funcionais para potássio (Mouhat *et al.*, 2008).

Atualmente as isoformas da subfamília *Eag* (Kv10, Kv11 e Kv12) são pouco esclarecidas e essas são encontradas principalmente no sistema nervoso central (Mouhat *et al.*, 2008).

A maioria das toxinas escorpiônicas específicas para canais para potássio são constituídas por aproximadamente de 30 a 40 resíduos de aminoácidos, com uma conformação tridimensional constituída por três fitas-beta antiparalelas ligadas a uma região alfa-helicoidal por pontes dissulfeto (Olamendi-Portugal *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2001). Essas podem atuar nos canais de duas maneiras conhecidas, (a) modulando a porção sensível á voltagem ou (b) através de sua ligação com a porção extracelular do mesmo, causando a obstrução do poro condutor e impedindo a passagem dos íons (Garcia *et al.*, 1991). Atualmente as toxinas de escorpião que atuam com especificidade nos canais para potássio foram classificadas em quatro famílias (α -, β -, γ - e κ -KTx) de acordo com a sua estrutura primária, através do alinhamento dos resíduos de aminoácidos de cisteínas. Dentre as quatro famílias, a α -Ktx tem tido destaque, pois está subdividida em vinte e uma subfamílias e apresenta mais de cento e vinte toxinas (Abdel-Mottaleb *et al.*, 2006). Assim, toxinas com alta especificidade para subtipos de canais para potássio são de extrema importância, pois podem ser utilizadas como ferramentas para o estudo de muitas

características estruturais e funcionais de canais para K^+ e podem também interferir com uma função específica das células-alvo (Kalman *et al.*, 1998).

Dentre as toxinas de *Tityus serrulatus* já descritas que atuam em canais para potássio encontram-se a Ts6 (α -KTx_{12.1}), Ts7 (TsTX-K α), Ts8 (TsTX-K β), Ts9 (Ts Kappa), Ts15 (α -KTx_{21.1}) (Cologna *et al.*, 2011; Marcussi *et al.*, 2011).

A toxina Ts6, nomenclatura atualizada por Cologna (Cologna *et al.*, 2009), foi descrita pela primeira vez como TsTX-IV (Arantes *et al.*, 1989), porém, sua sequência de aminoácido só foi revelada em 1999, caracterizando-a como uma nova toxina com 40 resíduos de aminoácidos que estão interligados através de quatro pontes dissulfeto. Esse mesmo trabalho também demonstrou que a toxina Ts6 bloqueia a condutividade de canais para Ca^{2+} dependente de K^+ em células de *Leydig* (Novello *et al.*, 1999). Devido ao fato de a toxina Ts6 não apresentar alta homologia com neurotoxinas da família α -KTx já descritas, ela foi classificada como a primeira toxina da subfamília 12, denominada como α -KTx_{12.1} (Tytgat *et al.*, 1999). Em 2000, pesquisadores do Alabama isolaram da peçonha de *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus* a Butantina (BuTX), uma neurotoxina que possui 40 resíduos de aminoácidos ligados por quatro pontes dissulfeto. Estes autores também demonstraram que BuTX possui ação de bloqueio reversível em canais para potássio de subtipo *Shaker B*, além de inibir a proliferação de células T e produção de citocina IL-2 (Holaday *et al.*, 2000). Embora ambas as toxinas Ts6 e BuTX sejam consideradas a mesma toxina (Pimenta *et al.*, 2003), elas ainda são classificadas como α -KTx_{12.1} (Ts6) e α -KTx_{12.2} (BuTX), uma vez que elas derivam de espécies provenientes de diferentes regiões (Coronas *et al.*, 2003). Recentemente, outro grupo de pesquisadores realizou experimentos demonstrando que a Ts6 estimula a liberação de NO, IL-6 e TNF- α por macrófagos J7774.1 (Zoccal *et al.*, 2011).

A toxina Ts7, conhecida como TsTX-K α , foi descrita primeiramente como capaz de bloquear o efluxo de ^{86}Rb através da inativação do canal para sódio dependente de voltagem (Cologna *et al.*, 2009). Classificada como α -KTx_{4.1}, Ts7 é considerada uma bloqueadora em potencial de canais em cultura de neurônios de mamíferos (Eccles *et al.*, 1994) e também possui alta afinidade em bloquear correntes de potássio em fibroblastos transformadas a expressar Kv1.2 (Werkman *et al.*, 1993). Adicionalmente, o estudo da coexpressão em pares de membros da

subfamília de *Shaker IR (inactivation-removed)* de canais para potássio (Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.4), expressadas em oócitos de *Xenopus laevis*, demonstrou que o canal múltiplo heterogênico Kv1.1/1.2 é mais sensível para Ts7 do que Kv1.2/1.4 (Hopkins, 1998). Estudos realizados para avaliar a interação da toxina Ts7 com canais de camundongo Kv1.3, utilizando dois sistemas de expressão (*Xenopus laevis* e células *naïve* de mamíferos – L929), demonstraram que Ts7 bloqueia o canal obstruindo o poro sem alterar suas propriedades cinéticas (Rodrigues *et al.*, 2003).

Embora vários estudos tenham sido realizados com as toxinas Ts6 e Ts7, um melhor entendimento do efeito das mesmas em canais para potássio ainda é necessário.

1.6. Isolamento de toxinas da peçonha de *Tityus serrulatus*

O escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* tem sido alvo de vários estudos e muitas de suas toxinas já foram isoladas e caracterizadas através de diferentes metodologias. O trabalho pioneiro de purificação das toxinas provenientes da peçonha de *Ts* foi realizado através da extração da peçonha bruta com água destilada, posteriormente submetida à filtração em gel de Sephadex G-25, sendo em seguida realizada cromatografia em coluna de CM-Celulose (Gomez e Diniz, 1966). Através desse procedimento foram obtidas duas frações tóxicas, sendo que uma dessas foi parcialmente caracterizada e denominada Tityustoxina (TsTX).

A TsTX foi purificada posteriormente por Coutinho-Netto (1975), que realizou a extração peçonha com amônio, seguida de filtração em Sephadex G-50 e posterior cromatografia em CM-Celulose-52. O resultado foi obtenção de uma toxina proteica de caráter básico, que continha 61 resíduos de aminoácidos, massa molar de 6.995, N-terminal lisina e sem a presença de metionina em sua composição (Coutinho-Netto, 1975).

Toledo e Neves (1976) realizaram uma filtração da peçonha de *Ts* em Sephadex G-25, seguida uma cromatografia em CM-Celulose-52, utilizando um gradiente convexo de concentração de acetato de amônio para eluição. Eles obtiveram duas toxinas (TsTX-I e TsTX-II) que foram caracterizadas. A TsTX-I apresentou massa molar de 6.932 e N-Terminal lisina, enquanto que a TsTX-II

apresentou N-terminal glicina e 8.500 de massa molar. Porém ambas as toxinas apresentaram metionina em sua composição (Marcussi *et al.*, 2011).

Em 1981, Possani e colaboradores purificaram 4 toxinas provenientes da peçonha do *Tityus serrulatus* (II-11, III-8, III-10 e IV-5) utilizando de filtração em Sephadex G-50 e cromatografia em CM-Celulose-52 com gradiente de NaCl em tampão de acetato de amônio. Porém 3 dessas toxinas demonstraram possuir composição em aminoácidos muito semelhantes à toxinas já descritas. A II-11 e III-10 apresentaram composição semelhante a TsTX-I, purificada por Toledo e Neves, enquanto que a IV-5 apresentou semelhança à TsTX, obtida por Coutinho-Netto (1975) (Marcussi *et al.*, 2011).

Sampaio e colaboradores em 1983 realizaram a purificação de toxinas utilizando de filtração em Sephadex e cromatografia em CM-Celulose-52, porém desta vez utilizando como tampão o bicarbonato de amônio. Desta maneira conseguiram purificar 5 toxinas provenientes da peçonha de *Ts* (T₁VIII, T₁V₁, T₂III₁, T₂IV e T₁IV), sendo que duas destas (T₁VIII, T₂IV) apresentaram semelhança na composição em aminoácidos com a toxina TsTX-I, já purificada por Toledo e Neves (1976) (Marcussi *et al.*, 2011).

Em 1989, Arantes e colaboradores desenvolveram um método simplificado para fracionamento da peçonha de *Ts* através apenas da cromatografia em CM-celulose-52, utilizando de um gradiente convexo de concentração com tampão de bicarbonato de amônio. Assim foram obtidas 13 frações proteicas, sendo que a XIII (TsTX-I) que representa aproximadamente 15% material eluído da peçonha foi obtida com elevado grau de pureza (Arantes *et al.*, 1989). Esse método aboliu a filtração em gel de Sephadex o qual resultava na eluição de uma mesma proteína em mais de uma fração, provavelmente pela interação entre as toxinas.

Através da recromatografia das frações obtidas nesse método, foi possível purificar e caracterizar novas toxinas presente na peçonha de *Ts*, além de identificar a grande maioria das toxinas já descritas (Marcussi *et al.*, 2011).

Muitas toxinas já foram isoladas e bem caracterizadas, porém, estima-se que o número total de diferentes toxinas produzidas por escorpiões é de aproximadamente de 100.000, sendo apenas 1% dessas são conhecidas (Gazarian *et al.*, 2005). Portanto, metodologias mais sensíveis que sejam capazes de isolar as

toxinas da peçonha precisam ser aprimoradas e/ou desenvolvidas para auxiliar no avanço das pesquisas com as toxinas escorpiônicas.

1.7. Toxinas animais como potenciais drogas terapêuticas

Em geral, toxinas animais são alvos de interesse em todo o mundo, principalmente por promoverem efeitos farmacológicos relevantes em diversos sistemas. O medicamento mais conhecido derivado de peçonha animal é o captopril (Capoten®; Bristol Myers Squibb). Caracterizado como um peptídeo potenciador de bradicinina, o captopril, isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, é utilizado em todo o mundo para o tratamento de hipertensão arterial e pós-infarto do miocárdio. O fármaco eptifibatide (Integrilin®; Millennium Pharmaceuticals) também é bastante popular. Sintetizado a partir da barbourina, isolada da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbour*, é frequentemente utilizado para o tratamento de trombose (Scarborough *et al.*, 1991).

O uso de toxinas escorpiônicas também tem apresentado destaque no tratamento de doenças. A clorotoxina (CTX), uma toxina purificada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (Soroceanu *et al.*, 1998), demonstrou ser específica para canais para cloro presentes na membrana de células da glia, podendo ser considerada uma droga promissora para o tratamento de glioma – testes em fase clínica I (Olsen *et al.*, 2003; Mamelak *et al.*, 2006). A margatoxina, proveniente do escorpião *Centruroides margaritatus*, é capaz de inibir seletivamente canais para potássio dependente de voltagem do tipo 1.3 ($K_v 1.3$) (Garcia-Calvo *et al.*, 1993), sendo assim considerada uma potencial droga para o tratamento de doenças autoimunes (Wulff, Castle e Pardo, 2009; Toldi *et al.*, 2010; Lam e Wulff, 2011).

Diante dos exemplos apresentados, podemos observar que diversos são os fármacos derivados de peçonhas animais em estudo, em fase clínica e/ou até mesmo já aprovados para uso humano pela FDA (*Food and Drug Administration*).

Assim, é evidente a importância de se estudar toxinas animais e, embora várias delas já tenham sido descritas, este número é extremamente pequeno comparado ao total disponível.

Considerando a relevância do uso de toxinas animais, o presente trabalho descreve uma nova metodologia de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e investiga a ação de duas de suas toxinas, Ts6 e Ts7, em vários subtipos de canais para potássio.

Objetivos

2. Objetivos

- I. Padronizar um novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* em coluna de CM-celulose-52, utilizando o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- II. Purificar as toxinas Ts6 e Ts7 da peçonha de *Tityus serrulatus* utilizando o novo método;
- III. Verificar o efeito das toxinas Ts6 e Ts7 em diferentes subtipos de canais para potássio, utilizando a técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos.

Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. A peçonha de *Tityus serrulatus*

Para a obtenção da peçonha de *Tityus serrulatus* foram utilizados escorpiões provenientes do serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, sendo estes coletados em diferentes regiões do estado de São Paulo. A extração da peçonha do escorpião amarelo foi realizada pelo método de estimulação elétrica do telson (Barrio, 1949). Após a extração, a peçonha foi liofilizada e estocada a - 20°C.

3.2. Preparação da amostra

A amostra liofilizada da peçonha de *Tityus serrulatus* foi diluída em 20 µL de água ultra pura (MilliQ®) e, em seguida, colocada em dessecador de vidro por 6 horas. Após esse período a amostra dessecada (50 mg) foi solubilizada em 0,5 mL de tampão NH_4HCO_3 0,05 M, centrifugada a $10.015 \times g$ (Centrifuge® 5415 R) durante 10 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado à 4°C. Ao precipitado, foram adicionados mais 0,5 mL da solução de NH_4HCO_3 0,05 M, o qual foi homogeneizado até completa dispersão e novamente centrifugado. Esta extração foi repetida por mais duas vezes. Ao final deste processo, foi obtida a peçonha solúvel*, que corresponde aos quatro sobrenadantes reunidos (± 2 mL). Essa solução foi deixada em repouso durante 12 horas a 4°C e, posteriormente, centrifugada a $10.015 \times g$ durante 10 minutos e filtrada em membranas de 0,22 µm, tornando a amostra adequada para o fracionamento em CM-Celulose-52.

*A peçonha solúvel é a peçonha isenta de muco. É obtida a partir do sobrenadante da peçonha diluída em tampão e centrifugada a $10.015 \times g$ por 10 minutos. O precipitado, correspondente ao muco, é descartado.

3.3. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de *Tityus serrulatus*

O fracionamento do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* foi realizado através de um novo método. Trata-se de uma modificação do método de fracionamento da peçonha de *Ts* descrito por ARANTES *et al.* (Arantes *et al.*, 1989) e adaptado para sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Foi utilizada uma coluna de CM-celulose-52 microgranular (Whatman) 1.6 x 100 cm. O tratamento da resina foi realizado utilizando uma solução de NaOH 0,5 M e, após 5 minutos, essa foi filtrada em funil de placa sintetizada, sob pressão reduzida, e exaustivamente lavada com água destilada até atingir pH neutro. A seguir, a resina foi suspensa em HCl 0,5 M por mais 5 minutos e novamente lavada com água destilada até atingir pH neutro. Finalmente, essa foi lavada com tampão NH_4HCO_3 (AMBIC) 0,01 M, pH 7,8, e colocada em repouso a 4°C por aproximadamente 14 horas. Em seguida a resina foi deaerada e colocada para empacotar na coluna.

Após o processo de empacotamento, a coluna foi conectada ao aparelho de CLAE e equilibrada por 10 horas com uma solução de NH_4HCO_3 0,05 M (Tampão A), com o fluxo contínuo de 0,5 mL/min.

A amostra (± 2 mL) foi aplicada manualmente à coluna e, após a penetração de toda amostra na resina, a coluna foi conectada ao sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Äkta Purifier UPC-10 system – GE Healthcare®, Uppsala, Sweden). Foram realizadas leituras em 280 nm para a obtenção do cromatograma. A coluna foi inicialmente eluída (140 mL) com uma de solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8 (100% de Tampão A) e, a seguir, iniciou-se um gradiente linear de concentração de NH_4HCO_3 0,6 M (Tampão B) até atingir 100% de Tampão B após 440 mL de eluição. Esta concentração (100% solução B) foi mantida por mais 140 mL, decaindo abruptamente para 0% de Tampão B, atingindo, consequentemente, 100% da solução A, a qual foi mantida por mais 202 mL, para reequilibrar a coluna.

3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18 da fração XI

As frações X e XI obtidas da CM-celulose-52 e contendo as toxinas de interesse (Ts6 e Ts7), foram solubilizadas e cromatografadas separadamente. Cada fração foi dissolvida em solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e centrifugada a 10,015 x g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de fase reversa C-18 de 4.6mm x 25 cm (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), equilibrada e inicialmente eluída com uma solução de TFA a 0,1% (Solução A), com fluxo de 0,8 mL/min. Após 1 volume de coluna ($\pm$ 4 mL) de eluição com a solução de TFA 0,1% iniciou-se uma série de gradientes (quatro etapas para fração X e três etapas para fração XI) de concentração de acetonitrila até atingir 100% de uma solução de TFA 0,1% + acetonitrila 80% (Solução B), permanecendo nessa concentração por 1,5 volumes de coluna, para garantir a eluição de todos os componentes da amostra. Em seguida a coluna foi reequilibrada com a Solução A com mais dois volumes de coluna.

3.5. Eletroforese para proteínas básicas

As subfrações das frações X e XI foram analisadas através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) em condições não-desnaturantes (Reisfeld, Lewis e Williams, 1962) modificado e descrito por Arantes et al. (1989).

3.6. Sequenciamento amino-terminal

A análise da sequência N-terminal das toxinas isoladas foi realizada em sequenciador automático de proteínas Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). A sequência obtida pelo sequenciamento proteico foi através do método de degradação de Edman (Edman e Begg, 1967), que consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. O aminoácido derivado da reação com o PITC é convertido a PTH-aminoácido, que é então cromatograficamente separado por cromatografia de fase reversa em sistema CLAE. A quantificação e identificação das amostras foram

realizadas através da comparação com padrão de 25 pmol de cada aminoácido, analisado no início de cada sequenciamento.

3.7. Determinação da atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi determinada turbidimetricamente através de modificações do método de Di Ferrante (1956), segundo Pukrittayakamee e colaboradores (1988), como descrito a seguir.

A mistura de ensaio continha tampão acetato de sódio 200 mmol/L, adicionado de NaCl 150 mmol/L, pH 6, 10 µL de hialuronan (0,5 mg/mL em tampão acetato) e as amostras em tampão acetato em um volume final de 0,25 mL. A mistura foi incubada por 15 minutos, a 37 °C. As reações foram interrompidas pela adição de 500 µL de brometo de cetiltrimetilamônio a 2,5 % (m/v) dissolvido em hidróxido de sódio a 2% (m/v). A turbidez foi monitorada a 400 nm (durante 10 minutos), contra um branco contendo 0,25 mL de tampão acetato e 0,5 mL de brometo de cetiltrimetilamônio a 2,5 % (m/v) dissolvido em NaOH a 2 % (m/v).

A atividade hialuronidásica foi expressa como a porcentagem de hialuronan hidrolisado, que foi calculada com base em uma curva padrão traçada com diferentes quantidades de hialuronan (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 µL), na ausência de enzima. A absorbância do tubo sem o hialuronan foi considerada como 100% de hidrólise e absorbância do tubo contendo 10 µL de hialuronan foi plotada como 0% de hidrólise.

3.8. Eletrofisiologia

Os ensaios eletrofisiológicos utilizaram-se da técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos em oócitos de *Xenopus laevis*. Estes foram realizados com a supervisão do professor Dr. Jan Tytgat, no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

3.8.1. Seleção, preparação e injeção do cRNA nos oócitos

As rãs da espécie *Xenopus laevis* foram submetidas à cirurgia de ovariectomia parcial para retirada dos oócitos. Estas foram anestesiadas em um recipiente contendo gelo e tricáína (1g/L), onde permaneceram submersas por aproximadamente 15 minutos. Em seguida foram colocadas em um recipiente contendo gelo com a finalidade de prolongar a anestesia e ali permaneceram durante todo o processo cirúrgico. Após a retiradas dos oócitos, os mesmo foram tratados com a solução de collagenase (2,5mg/mL) em solução ND96 - livre de cálcio em pH 7,5 durante 2 horas a 16°C, com o objetivo de serem defoliculados (procedimentos ilustrados na Figura 4).

Figura 4. Procedimento cirúrgico para a obtenção dos oócitos de *Xenopus laevis*. (A) *Xenopus laevis*. (B) Ovariectomia parcial para retirada dos oócitos. (C) Tratamento dos oócitos com collagenase (2,5mg/mL) em solução ND96 - livre de cálcio. (D) Animal Suturado. Fotos obtidas durante o estágio no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

Os oócitos que se encontravam nos estágios V e VI da maturação foram selecionados e utilizados posteriormente para injeção do cRNA correspondente às proteínas que formam os diferentes canais para potássio. Os cRNAs utilizados foram transcritos e sintetizados a partir de plasmídeos linearizados, ensaio no qual se utilizou o kit de transcrição T7 ou SP6 (mMESSAGE mMACHINE, Ambion®, USA). Os oócitos traduzem o cRNA injetado em sua respectiva proteína que, posteriormente, insere-se na membrana celular. Os oócitos expressando os canais para potássio podem ser utilizados em ensaios eletrofisiológicos.

A Injeção dos oócitos foi realizada com o auxílio de um microinjetor (Drummond Scientific®, USA), sendo o volume injetado em cada oócito de 4 a 50 nL de cRNA e o tempo de espera para a expressão do canal foi de 1 a 5 dias (volume e tempo de expressão variam de acordo com o canal desejado a ser expresso). Os seguintes subtipos de canais para potássio foram utilizados: Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.3; Kv7.1; Kv7.2; Kv7.4; hERG e *Shaker IR* (procedimentos ilustrado na Figura 5).

Figura 5. Injeção do cRNA nos oócitos de *Xenopus laevis*. (A) Injetor de cRNA. (B) Seleção dos oócitos nos estágios de maturação V e VI. (C) Preenchimento do capilar com cRNA e posicionamento dos oócitos. (D) Injeção do cRNA nos oócitos. Fotos obtidas durante o estágio no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

3.8.2. Medidas eletrofisiológicas

As medidas eletrofisiológicas foram obtidas através da técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos. Os dados foram obtidos através da utilização do amplificador GeneClamp 500 (Axon Instruments®, USA) conectado a um computador munido com sistema operacional Windows XP (Microsoft®, USA) e *software* Complex9 (Axon Instruments®, USA), responsável pela aquisição e armazenamento dos dados. As micropipetas de vidro utilizadas foram produzidas através de capilares de vidro (borosilicato WPI 1B120-6) e estiradas em um estirador manual da WPI (Word Precision Instruments®). Foram utilizadas micropipetas com resistência entre 0,5 a 1 MΩ, estas foram preenchidas com KCl 3 M. A solução de banho e perfusão (ND-96) consistiu em mM: NaCl 96; KCl 2; MgCl₂ 2; HEPES 5, CaCl₂ 1,8, pH 7,4, ajustado com NaOH.

Para os ensaios, foi utilizado 1μM da toxina purificada (Ts6 ou Ts7) previamente diluída em ND-96. A seguir esta solução foi adicionada na câmara contendo o oócito e imediatamente homogeneizada, obtendo assim a concentração final desejada.

3.8.3. Protocolo

O protocolo de pulsos de voltagem utilizados para o registros das correntes de potássio de oócitos de *Xenopus laevis* variam de acordo com a isoforma do canal analisado.

Para as Isoformas Kv1.1 – Kv1.6 e *Shaker IR* o potencial de membrana dos oócitos foi mantido em -90 mV, despolarizados rapidamente para 0 mV, seguindo-se uma repolarização para -50 mV e, posteriormente, retornando ao potencial inicial de -90 mV. A duração total do protocolo foi de 1 segundo (Figura 6A).

Para as isoformas Kv2.1, Kv3.1 e Kv4.3 os oócitos foram mantidos a um potencial de membrana de -90 mV, despolarizados a +20 mV durante 500ms e, em seguida, repolarizados a -90 mV (Figura 6B).

No protocolo utilizado para a isoforma hErg, os oócitos foram mantidos a um potencial de membrana de -90 mV, despolarizados a +40 mV durante 2 segundos e,

em seguida, hiperpolarizados a -120 mV durante mais 2 segundos, retornando ao potencial inicial de -90 mV (Figura 6C).

Para as Isoformas Kv7.1, Kv7.2 e Kv7.4 os oócitos mantidos a um potencial de membrana -90mV foram despolarizados a +40 mv durante 3 segundos e repolarizados logo em seguida ao potencial inicial de -90 mV (Figura 6D).

Figura 6. Protocolo de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes de potássio de oócitos de *Xenopus laevis*. (A) Kv1.1 – Kv1.6 e *Shaker* IR. (B) Kv2.1, Kv3.1 e Kv4.3. (C) hERG. (D) Kv7.1, Kv7.2 e Kv7.4.

3.8.4. Alinhamento

As toxinas utilizadas possuem as sequências e os números de depósito disponíveis no banco de dados da SwissProt. As sequências de aminoácidos dos membros da subfamília alpha-Ktx foram obtidas a partir da *Universal Protein Resource Knowledgebase* (www.uniprot.org). O alinhamento e a porcentagem de identidade da sequência primária da toxina Ts6 comparada com outras toxinas

alpha-Ktx foram criados utilizando o ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), as figuras foram geradas pelo ESPript (Gouet *et al.*, 1999) e esteticamente modificadas através do software CorelDraw (versão13).

Resultados

4. Resultados

4.1. Cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de *Tityus serrulatus*

A purificação da peçonha bruta de *Tityus serrulatus* realizada através do novo método de purificação, utilizando o sistema CLAE, apresentou um perfil cromatográfico (Figura 7) semelhante ao já descrito na literatura (Arantes *et al.*, 1989) (Figura 8). A cromatografia da peçonha, utilizando o novo método, apresentou treze frações como já observadas em relatos da literatura, porém cinco dessas (VI, VIII, IX, XI e XII) foram subdivididas em duas frações cada (VIA-VIB, VIIIA-VIIIB, IXA-IXB, XIA-XIB e XIIA-XIIB).

A hialuronidase da peçonha foi eluída principalmente nas frações IXA e IXB. Através da estimativa em absorbância em 280 nm, foi possível calcular que 38 mg (76%) da peçonha foi solúvel, dos 50 mg de peçonha total utilizada na purificação. A análise da fração XIII do cromatograma demonstrou que a mesma corresponde à toxina Ts1 (toxina majoritária da peçonha), confirmando dados da literatura. O tempo total desse processo de purificação foi de 24 horas.

Figura 7. Perfil cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em sistema CLAE com coluna de CM-celulose-52. Coluna de 2,5 x 63,0 cm, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (AMBIC – Solução A) 0,05 mol/L, pH 7,7. Fluxo de 0,5 mL/min. A linha verde representa o gradiente linear de concentração da Solução B (AMBIC 0,6 M). A linha pontilhada vermelha representa o ensaio de atividade hialuronidásica.

Figura 8. Perfil cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-celulose-52. Coluna de 2,5 x 63,0 cm, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (AMBIC – Solução A) 0,05 mol/L, pH 7,7. As setas indicam o início das soluções A e B respectivamente, foi utilizado um gradiente curvilíneo para a solução B (AMBIC à 1M). Fluxo de 0,5 mL/min.

A tabela 1 apresenta a porcentagem da recuperação das treze frações presentes na cromatografia da peçonha bruta de *Tityus serrulatus* em sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna de CM-celulose-52.

Tabela 1. Recuperação das Frações obtidas na cromatografia da peçonha bruta de Ts.

Fração	Porcentagem do Eluído* (%)
I	29,09
II	7,45
III	2,43
IV	2,36
V	4,02
VI-A	3,46
VI-B	2,02
VII	7,02
VIII-A	4,81
VIII-B	3,12
IX-A	4,63
IX-B	2,86
X	4,85
XI-A	1,89
XI-B	1,64
XII-A	1,61
XII-B	1,10
XIII	15,64

*Recuperação calculada pela absorbância em 280nm e auxílio do *software* (Unicorn) do próprio sistema CLAE.

As treze frações obtidas na purificação foram submetidas à eletroforese (gel de poliacrilamida à 10%) em condições não-desnaturantes, com a finalidade de auxiliar na identificação das toxinas na análise da composição das amostras (Figura 9).

Figura 9. Perfil eletroforético das frações obtidas da cromatografia da peçonha de *Ts* em coluna de CM-Celulose-52 em sistema CLAE. Gel de poliacrilamida a 10% para proteínas básicas em condições não desnaturantes. Tampão β -alanina/ácido acético 0,035 mol/L, pH 4,5. Pré-corrida de 30 min a 90 V, 1 W e 40 mA. Corrida de 70 min a 90V e 15 W e 40 mA. Corado por 3 horas com Coomassie Brilliant Blue R-350 (0,2% em água:metanol, 1:1, v/v), e descorado com ácido acético a 7% (v/v). **A.** Poço 1: Peçonha Bruta; Poço 2: Fração I; Poço 3: Fração II; Poço 4: Fração III; Poço 5: Fração IV; Poço 6: Fração V; Poço 7: Fração VIA; Poço 8: Fração VII; Poço 9: Fração VIIIA; Poço 10: Fração VIIIB. **B.** Poço 1: Peçonha Bruta; Poço 2: Fração IXA; Poço 3: Fração IXB; Poço 4: Fração X; Poço 5: Fração XIA; Poço 6: Fração XIB; Poço 7: Fração XIIA; Poço 8: Fração XIIB; Poço 9: Fração XIII.

Após a cromatografia, as frações de interesses (X e XI) foram liofilizadas e ressuspendidas para serem submetidas a um novo passo de purificação. As suas concentrações foram estimadas pelo método de Peterson (1983), utilizando leituras de absorbância (UV - 205 / 280 nm) em espectrofotômetro.

O rendimento das Frações X e XI, referente ao fracionamento da peçonha solúvel pelo método modificado (software UNICORN®), foi de aproximadamente 4,85% (1,84 mg) e 3,53% (1,34 mg), respectivamente (Tabela 1). Devido ao baixo rendimento, foram necessárias duas cromatografias da peçonha bruta para obtenção da Fração X (3,68 mg) necessária para o segundo passo de purificação, utilizando a coluna C-18 em sistema CLAE. Enquanto que para a purificação da Fração XI (10,72 mg) em CLAE com coluna C-18, foram necessárias oito cromatografias da peçonha bruta.

4.2. CLAE em coluna C-18

4.2.1. CLAE em coluna C-18 da fração X

Cada cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18 da fração X foi realizada com 2 mg de amostra e resultou em nove picos distintos. Estas subfrações (Figura 10) foram submetidas a análises de eletroforese e sequenciamento com intuito de identificá-las. O pico 4 demonstrou ser a Ts6, toxina de interesse para este estudo e majoritária da fração. Utilizando um software (UNICORN®) foi possível calcular sua proporção na amostra, demonstrando que a mesma corresponde a 38,53% do material eluído. As subfrações 3, 4, 6 e 7 são as de maior relevância na Fração X e correspondem às toxinas Ts15, Ts6, Ts5 e Ts3, respectivamente. As recuperações dessas subfrações também foram calculadas e podem ser observadas na tabela 2.

Figura 10. Perfil cromatográfico da fração X em sistema CLAE com absorbância em 214 nm. Coluna analítica de fase reversa C-18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 μ m), previamente equilibrada com TFA 0,1 % (v/v), fluxo de 0,8 mL/min. A linha verde representa o gradiente de concentração da Solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%).

Tabela 2. Recuperação das subfrações obtidas na cromatografia da Fração X.

Subfração	Porcentagem do Eluído* (%)
3	5,48
4	38,53
6	9,99
7	4,83

*Recuperação calculada pela absorbância em 214nm e auxílio do *software* (Unicorn) do próprio sistema CLAE.

4.2.2. CLAE em coluna C-18 da fração XI

Para a purificação das toxinas presentes na fração XI em coluna C-18 foram utilizados 10 mg da mesma. Esta cromatografia resultou em 21 subfrações, conforme cromatograma apresentado na Figura 11. Estas subfrações foram analisadas quanto à sua massa molar e sequência, com o objetivo de identifica-las. A Subfração 16 corresponde à Ts5, toxina majoritária da fração XI, e representa 40,04 % do material eluído, a Ts7 encontra-se na subfração 10 representando 3,64 do material eluído (Tabela 3).

Figura 11. Perfil cromatográfico da fração XI em sistema CLAE com absorbância em 280 nm. Coluna analítica de fase reversa C-18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 μ m), previamente equilibrada com TFA 0,1 % (v/v), fluxo de 0,8 mL/min. A linha verde representa o gradiente de concentração da Solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%).

Tabela 3: Recuperação das subfrações obtidas na cromatografia da Fração XI.

Subfração	Porcentagem do Eluído* (%)
6	2,16
7	5,02
10	3,64
12	2,91
16	40,04

*Recuperação calculada pela absorbância em 280nm e auxílio do *software* (Unicorn) do próprio sistema CLAE.

As subfrações da fração XI foram avaliadas quanto a sua “pureza” através de eletroforese de poliacrilamina a 10% em condições não desnaturantes. O perfil eletroforético das mesmas está representado na figura 12.

Figura 12. Perfil eletroforético das subfrações obtidas da CLAE em coluna C-18 da Fração XI. Gel de poliacrilamida a 10% para proteínas básicas em condições não desnaturantes. Tampão β -alanina/ácido acético 0,035 mol/L, pH 4,5. Pré-corrida de 30 min a 90 V, 1 W e 40 mA. Corrida de 70 min a 90V e 15 W e 40 mA. Corado por 3h com Coomassie Brilliant Blue R-350 (0,2% em água:metanol, 1:1, v/v), e descorado com ácido acético a 7% (v/v). **A.** Poço 1: Peçonha Bruta; Poço 2: fração XI; Poço 3: Subfração 18; Poço 4 e 5: Subfração 17; Poço 6: Subfração 12; Poço 7: Subfração 10; Poço 8: Subfração 7; Poço 9: Subfração 2; Poço 10: Subfração 1. **B.** Poço 1: Fuccina; Poço 2: Peçonha Bruta; Poço 3: Subfração 16; Poço 4: Subfração 14; Poço 5: Subfração 13; Poço 6: Subfração 11; Poço 7: Subfração 9; Poço 8: Subfração 8; Poço 9: Subfração 6; Poço 10: Subfração 4.

4.3. Sequenciamento amino-terminal das toxinas isoladas

As subfrações das frações X e XI foram submetidas ao sequenciamento N-terminal para verificar se as mesmas se identificavam ou não com toxinas já descritas na literatura, cujas sequências já foram depositadas em bancos de dados.

Após a determinação dos resíduos de aminoácidos das toxinas isoladas, suas sequências foram comparadas no banco de dados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) com as sequências de toxinas descritas na literatura, para verificar as similaridades entre as mesmas. Os resultados de maior relevância obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Sequenciamento N-terminal das subfrações 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 17 obtidas da fração XI da peçonha de *Tityus serrulatus*.

Subfração	Sequencia	Toxina
X-3	GKFGK CK PNI CAKTCQ TEKG KGMGY CN KTE CVC SEW!	Ts15
X-4	WCSTCLDLAC GASRE CYDPC FKA F GRAHGK CMNNKCR CYT!	Ts6
X-6	KKDGYPVEGD NCAFA CF GYD NAY CDKLCKD KKADDGY CVW SPD CYCYGLP EHILKEPTKT SGRC !	Ts5
X-7	KKDGYPVEYD NCAYICWNYD NAY CDKLCKD KKADSGY CYW VHIL CYCYGL PDSEPTKTNG KC !	Ts3
XI-6	GCMKEYCAGQ CRGKVSQDYC LKH CKC IPR!	Ts16
XI-7	GCMKEYCAGQ CRGKVSQDYC LKH CKC IPR!	Ts16
XI-10	VFINAK CRGS PE CLPKC KEA IGKAAGK CMN GK CKCYP !	Ts7
XI-12	WCSTCLDLAC GASRE CYDPC FKA F GRAHGK CMNNKCR CYT!	Ts6
XI-16	KKDGYPVEGD NCAFA CF GYD NAY CDKLCKD KKADDGY CVW SPD CYCYGLP EHILKEPTKT SGRC !	Ts5

* ! - Indica o término do sequenciamento, ou seja, foi realizado a sequência completa da toxina.

4.4. Eletrofisiologia

4.4.1. Toxina Ts6

Os ensaios de eletrofisiologia realizados com a toxina Ts6 em quatorze diferentes tipos de canais para potássio demonstraram que a mesma apresenta alta

capacidade de bloqueio de canais dos subtipos Kv1.2, Kv1.3 e *Shaker IR* com 86%, 98% e 79% de bloqueio, respectivamente (Figura13). As porcentagens de bloqueio da Ts6 estão representadas na Figura 15. A curva de dose resposta (Figura14) foi realizada somente com os dois canais que apresentaram maior bloqueio na presença da toxina (Kv1.2 e Kv1.3). O valor da IC50 (concentração inibitória 50%) foi de $6,19 \pm 0,35$ nM para o Kv1.2 e de $0,55 \pm 0,20$ nM para o Kv1.3.

Figure 13. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio na ausência ou presença de 1 μ M de Ts6. Os canais Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.3; Kv7.1; Kv7.2; Kv7.4; hERG e *Shaker*) foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços vermelhos indicam a presença da toxina. Os protocolos utilizados para cada canal estão detalhados no item Material e Métodos.

Figure 14. Influência da dose de Ts6 no bloqueio de canais para potássio dos subtipos Kv1.2 e Kv1.3. (A) Curva de dose-resposta usando a equação de Hill e **(B)** Bloqueio induzido pela Ts6 em canal para potássio do subtipo Kv1.2 em diferentes concentrações. **(C)** Curva de dose-resposta usando a equação de Hill e **(D)** Bloqueio induzido pela Ts6 em canal para potássio do subtipo Kv1.3 em diferentes concentrações. Utilizou-se $n \geq 3$ para cada concentração em todos os ensaios.

Figure 15. Bloqueio induzido pela toxina Ts6 em diferentes subtipos de canais para potássio. Os canais Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.3; Kv7.1; Kv7.2; Kv7.4; hERG e *Shaker I*) foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Utilizou-se $n \geq 3$ em todos os ensaios.

4.4.2. Toxina Ts7

A figura 16 apresenta as correntes obtidas nos ensaios com os quatorze diferentes subtipos de canais para potássio em que a toxina Ts7 foi testada. O maior bloqueio foi observado nos canais Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6 e *Shaker IR*, com 85%, 91%, 89%, 95% e 97% de bloqueio, respectivamente. As porcentagens de bloqueio dos canais estão representadas na figura 17. Devido ao fato de a Ts7 ter apresentado ação em diversos canais, a mesma não foi considerada pouca específica e, por isso, não foi determinada a IC₅₀.

Figure 16. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio na ausência ou presença de 1 μM de Ts7. Os canais Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv7.1; Kv7.2; hERG e *Shaker*) foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços vermelhos indicam a presença da toxina. Os protocolos utilizados para cada canal estão detalhados no item Material e Métodos.

Figure 17. Bloqueio induzido pela toxina Ts7 em diferentes subtipos de canais para potássio. Os canais Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv7.1; Kv7.2; hERG e *Shaker I*) foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Utilizou-se $n \geq 3$ em todos os ensaios.

4.5. Alinhamento das sequências das toxinas

As sequências de aminoácidos das toxinas Ts6 e Ts7 foram comparadas com outras toxinas α -KTx que possuem sequência depositada em banco de dados (Figura 18). O alinhamento mostrou que a Ts6 e Ts7 apresentaram identidade maior ou igual a 30% para várias toxinas comparadas, homologia aceitável para modelagem molecular (D'Alfonso, Tramontano e Lahm, 2001; Vitkup *et al.*, 2001). As toxinas Ts6 e Ts7 apresentaram identidade $\geq 30\%$ com 11 e 13 toxinas diferentes, respectivamente. A Ts6 apresentou alta identidade com as toxinas: Charybdotoxin (40%), toxin Tc1 (47%), Tamulotoxin (47%) e Bmk37 (41%). Enquanto a toxina Ts7 apresentou identidade com várias toxinas, destacando as: Noxiustoxin (56%), Kaliotoxin-1 (59%) e a Tc1 (56%). O alinhamento também mostrou que a toxina Ts7 apresentou alta identidade com as toxinas que também foram similares a Ts6 (Charybdotoxin, toxin Tc1, Tamulotoxin e Bmk37). Na Figura 19 foram apresentados os alinhamentos da Ts6 e Ts7 com as toxinas que

demonstraram ter maior identidade estrutural com as mesmas. Na tabela 5 destacam-se as ações conhecidas dessas mesmas toxinas em canais para potássio.

A

Acesso#	Toxina	Ktx	Sequencia	Id(%)
			1 10 20 30 40	
P59936	Ts6	12.1	WCSTGLDLACGASRECYDFCFKAFGRAHG.KCMN.NKCRCYT...	100
P46114	Ts7	4.1	...VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAG.KCMN.GKCKCYP...	45
P13487	Charybdotoxin	1.1	...QFTNVSCITTSKECWSVCQRLHNTSRG.KCMN.KKCRCS...	40
P08815	Noxiustoxin	2.1	...TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMN.GKCKCYNN...	38
P24662	Kaliotoxin-1	3.1	..GVEINVKCSGSPQCLKPKCKDA.GMRFG.KCMN.RKCHCTPK...	39
P16341	Leiurotoxin I	5.1	AFCNL.RMCQLSCRS.LGLL.G.KCIG.DKCECVKH...	19
Q10726	PiTX-K-gamma	6.1	LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNS.KCIN.RMCKCYGC...	31
P55927	Pandinoxin-alpha	7.1	TISCTNPKQCYPHCKKETGYFNA.KCMN.RKCKCFGR...	37
P56215	Neurotoxin P01	8.1	VSC...EDCPEHCS...TQKAQAKCDN.DKCVCEPI...	31
Q9NJP7	BmKK6	9.1	VGC...EECPMHCK...GKNAKPTCDD.GVCNEN.V...	14
O46028	Cobatoxin-1	10.1	AVCVY.RTCDKDKR.RGYRSG.KCIN.NACKCYPYK...	38
P60164	Parabutoxin-1	11.1	..DEEPKESCD.EMCVIYCKG.EEYSTG.VCDGPQCKCKSD...	08
P83243	Toxin Tc1	13.1	AC...GSCRKKCK...GSG.KCIN.GRCKCY...	47
Q967F9	BmKK1	14.1	..TPFAIKCATDADCSRKCP...GNP...SCRN.GFCAC...	22
P60233	Peptide Aa1	15.1	..QNETNKKCQG.GSCASVCRRVIGVAAG.KCIN.GRCVCYP...	29
P0C173	Tamulotoxin	16.1	..DLIDVKCISSQECWIAKKVTGRFEG.KCQN.RQCRCY...	47
Q95NJ8	BmKK4	17.1	QTQCQSVRDCQQYCL...TPD.RCSY.GTCYCKTTGK...	18
P60211	Toxin Tc32	18.1	..TGPQTTCQA.AMCEAGCKG.LGKSME.SCQG.DTCCKKA...	25
P83407	BmK37	19.1	AACYS.SDCRVKVA.MGFSSG.KCIN.SKCKCYK...	41
P0C183	Toxin Tl28	20.1	GCTP.EYCSMWCK...VKVSN.YCVK...NCKCPGR...	13
P86270	Ts15	21.1	GKFGKCKP.NICAKTCQTEKGKGMG.YCNK.TECVCSEW...	19

B

Acesso#	Toxina	Ktx	Sequencia	Id(%)
			1 10 20 30	
P46114	Ts7	4.1	...VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAG.KCMN.GKCKCYP...	100
P59936	Ts6	12.1	WCSTGLDLACGASRECYDFCFKAFGRAHG.KCMN.NKCRCYT...	45
P13487	Charybdotoxin	1.1	...QFTNVSCITTSKECWSVCQRLHNTSRG.KCMN.KKCRCS...	43
P08815	Noxiustoxin	2.1	...TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMN.GKCKCYNN...	56
P24662	Kaliotoxin-1	3.1	..GVEINVKCSGSPQCLKPKCKDA.GMRFG.KCMN.RKCHCTPK...	59
P16341	Leiurotoxin I	5.1	AFCNL.RMCQLSCRS.LGLL.G.KCIG.DKCECVKH...	19
Q10726	PiTX-K-gamma	6.1	LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNS.KCIN.RMCKCYGC...	40
P55927	Pandinoxin-alpha	7.1	TISCTNPKQCYPHCKKETGYFNA.KCMN.RKCKCFGR...	40
P56215	Neurotoxin P01	8.1	VSC...EDCPEHCS...TQKAQAKCDN.DKCVCEPI...	37
Q9NJP7	BmKK6	9.1	VGC...EECPMHCK...GKNAKPTCDD.GVCNEN.V...	35
O46028	Cobatoxin-1	10.1	AVCVY.RTCDKDKR.RGYRSG.KCIN.NACKCYPYK...	29
P60164	Parabutoxin-1	11.1	..DEEPKESCD.EMCVIYCKG.EEYSTG.VCDGPQCKCKSD...	08
P83243	Toxin Tc1	13.1	AC...GSCRKKCK...GSG.KCIN.GRCKCY...	56
Q967F9	BmKK1	14.1	..TPFAIKCATDADCSRKCP...GNP...SCRN.GFCAC...	32
P60233	Peptide Aa1	15.1	..QNETNKKCQG.GSCASVCRRVIGVAAG.KCIN.GRCVCYP...	51
P0C173	Tamulotoxin	16.1	..DLIDVKCISSQECWIAKKVTGRFEG.KCQN.RQCRCY...	44
Q95NJ8	BmKK4	17.1	QTQCQSVRDCQQYCL...TPD.RCSY.GTCYCKTTGK...	21
P60211	Toxin Tc32	18.1	..TGPQTTCQA.AMCEAGCKG.LGKSME.SCQG.DTCCKKA...	17
P83407	BmK37	19.1	AACYS.SDCRVKVA.MGFSSG.KCIN.SKCKCYK...	48
P0C183	Toxin Tl28	20.1	GCTP.EYCSMWCK...VKVSN.YCVK...NCKCPGR...	10
P86270	Ts15	21.1	GKFGKCKP.NICAKTCQTEKGKGMG.YCNK.TECVCSEW...	22

Figura 18. Alinhamento das sequências em aminoácidos de toxinas α -KTx (primeiro membro de cada família) com a Ts6 (A) e Ts7 (B). O alinhamento e a porcentagem de identidade[Id(%)] com as 21 sequências primárias foram criadas através do ClustalW. A figura foi gerada utilizando o ESPrpt e adaptada com o auxílio do *software* CorelDrawn13. O número de acesso do UniPro (Acesso#) estão acompanhados dos nomes das toxinas. As cisteínas encontram-se sombreadas em preto.

Figura 19. Alinhamento das sequências em aminoácidos das toxinas da família α -KTx com maior identidade com a Ts7 (A) e Ts6 (B).

O alinhamento foi criado no MultAlin (Multiple Sequence Alignment by Florence Corpet), indicando os resíduos de maior consenso (sombreado em azul), menor consenso (fonte em vermelho) e os neutros (fonte em preto). As estruturas secundárias representadas da toxina Ts7 (A) e Ts6 (B) foram realizadas de acordo com dados do PDB (Protein Data Bank) e utilizou-se do ClustalW para a obtenção da porcentagem de identidade.

Tabela 5. Toxinas da família α -KTx que apresentam efeito de bloqueio em subtipos de canais para potássio.

A						
Acesso	Toxina	Classe	Subtipo de canal para Potássio com efeito de bloqueio $\geq 40\%$	Subtipo de canal para Potássio com efeito de bloqueio $< 40\%$	Id(%)	Referência
P46114.1	Ts7	α -KTx_4.1	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6 e <i>Shaker</i>	hERG, Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1, Kv7.1, Kv7.2	100	*
P0CB56.1	Tst26	α -KTx_4.6	Kv1.2 e Kv1.3	hERG, Kv1.1, Kv1.4 e Kv1.5	97	1
P60210.1	To30	α -KTx_4.4	Kv1.3 e <i>Shaker</i>	-----	86	2
P59925.1	Tdk1	α -KTx_4.3	<i>Shaker</i>	-----	78	3
P0DJ32.1	Vm23	α -KTx_21.2	Kv1.3	hERG, Kv1.4, Kv1.5 e Kv2.1	73	4

B						
Acesso	Toxina	Classe	Subtipo de canal para Potássio com efeito de bloqueio $\geq 40\%$	Subtipo de canal para Potássio com efeito de bloqueio $< 40\%$	Id(%)	Referência
P59936.2	Ts6	α -KTx_12.1	Kv1.2, Kv1.3 e <i>Shaker</i>	hERG, Kv1.1, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.1, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2 e Kv7.4	100	*
P0C185.1	Tco30	α -KTx_12.3	<i>Shaker</i>	-----	98	5
P0CH12.1	LmKTx10	α -KTx_12.5	Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3	-----	58	6
ACJ2315.1	Tx608	α -KTx_3.10	<i>Shaker</i>	hERG, Kv1.3, Kv3.4, Kv4.2	56	7

Referencias: **1** (Papp *et al.*, 2009), **2** (Batista *et al.*, 2002), **3** (D'Suze *et al.*, 1999), **4** (Possani *et al.*, 2011), **5** (Diego-Garcia *et al.*, 2005), **6** (Liu *et al.*, 2009), **7** (Kozminsky-Atias, Somech e Zilberberg, 2007). *Resultados obtidos nessa dissertação. A linha tracejada indica que não há dados disponíveis no artigo.

Discussão

5. Discussão

Em células excitáveis e não-excitáveis, canais para potássio (Kv) apresentam grande importância na sinalização induzida por cálcio, regulação do volume celular, secreção, proliferação e migração (Wulff, Castle e Pardo, 2009). Assim, toxinas com alta especificidade para subtipos de canais para potássio são de extrema importância, devido ao fato de influenciarem funções específicas em células alvo, podendo auxiliar no tratamento de uma variedade de doenças como câncer, autoimunidade, doenças metabólicas, neurológicas e cardiovasculares. Adicionalmente, estudos de toxinas isoladas podem contribuir para um melhor entendimento da síndrome do envenenamento escorpiónico e para o desenvolvimento de melhores antivenenos.

O presente trabalho aborda uma nova metodologia para o fracionamento de proteínas e a caracterização eletrofisiológica de duas toxinas α -KTx, Ts6 e Ts7, da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (Ts). O novo método utilizado na purificação de toxinas de Ts apresentado nesse estudo demonstrou ser mais prático, com maior resolução e excelente reprodutibilidade. A praticidade pode ser justificada pelas medidas automatizadas das absorbâncias, já que se eliminaram as medidas manuais; além do tempo poupado, uma vez que o novo método se estende por 24 horas, enquanto a purificação clássica demora 3 dias para ser realizada (desde o equilíbrio até o reequilíbrio da coluna). A alta resolução pode ser observada no cromatograma, já que o novo método permitiu a obtenção de novas subfrações dos picos VI, VIII, IX e XI, cada um sendo subdividido em A e B. Além disso, o novo método foi capaz de ser reproduzido várias vezes em nosso laboratório, resultando em um padrão cromatográfico. Diante disso, a partir da padronização desse novo

método, nosso grupo aconselha o uso do CLAE-CM-celulose-52 para futuras purificações da peçonha de *Tityus serrulatus*.

Com relação à eletrofisiologia, a toxina Ts6 foi capaz de bloquear, com baixa eficiência, uma grande variedade de canais para potássio (Kv1.1, Kv1.5, Kv1.6, Kv4.3, Kv7.1, Kv7.2, Kv7.4 e hERG). Por outro lado, a Ts6 apresentou alta capacidade de bloqueio dos canais Kv1.2, Kv1.3 e *Shaker IR*, sendo capaz de bloquear o canal Kv1.3 em pequenas quantidades (picomoles).

Kv1.2 é expresso no SNC (Sistema Nervoso Central). Nenhuma canalopatia envolvendo este canal foi descrita até o momento (Wulff, Castle e Pardo, 2009), mas animais *knockout* de Kv1.2 morrem no 17º dia após o nascimento de convulsões generalizadas (Brew *et al.*, 2007). Estudos adicionais serão necessários para o melhor entendimento da função do canal Kv1.2 e, nesse sentido, a toxina Ts6 poderá ser utilizada como ferramenta nesses futuros estudos.

O canal Kv1.3 é expresso em linfócitos T e B, macrófagos, células da micróglia, osteoclastos, plaquetas e SNC (Wulff, Castle e Pardo, 2009). Em linfócitos, os canais dependentes de voltagem Kv1.3 e IKCa1 (canal para potássio ativado por cálcio) são essenciais para a regulação do potencial de membrana, sinalização celular e proliferação. Estudos demonstram que a expressão de Kv1.3 altera dramaticamente a diferenciação de células T e B *naïves* para células de memória (Ghanshani *et al.*, 2000; Wulff, Castle e Pardo, 2009). Baseado nesses dados, devido a toxina Ts6 apresentar alta capacidade de bloqueio no canal Kv1.3, a mesma pode ser considerada uma droga promissora para o tratamento de doenças autoimunes como esclerose múltipla e diabetes tipo 1. Surpreendentemente, a toxina Ts6 também foi capaz de bloquear com alta eficiência o canal *Shaker IR*, porém não afetou o canal Kv1.1. Este fato não é

comum, uma vez que o canal de mamífero Kv1.1 é homólogo ao canal expresso em drosófila *Shaker IR* (Tempel *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988).

Os resultados eletrofisiológicos com a toxina Ts6 demonstrados nesse trabalho, corroboram com os resultados obtidos no alinhamento das α -KTxs. A Charybdotoxina (ChTx), uma toxina purificada do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, apresenta 40% de identidade com a Ts6 e é considerada um agente imunossupressor em potencial. Foi verificado que ChTx despolariza linfócitos T periféricos deixando-os não responsivos ao mitógeno, especialmente por bloquear o canal Kv1.3 (Leonard *et al.*, 1992).

A toxina Tc1, do escorpião *Tityus cambridgei* (47 % de identidade), é capaz de bloquear canais do tipo *Shaker*; e a Tamulotoxina, proveniente do escorpião *Mesobuthus tamulus* (47 % de identidade) é capaz de bloquear canais hKv 1.6 (Strong *et al.*, 2001).

A Ts7 foi capaz de bloquear com baixa eficiência os canais Kv 1.5, Kv 2.1, Kv 3.1, Kv 7.1 e hERG, mas apresentou alta capacidade de bloqueio nos canais Kv 1.1, Kv 1.2, Kv 1.3, Kv 1.6 and *Shaker*. A Ts7, ao contrário da Ts6, bloqueou os canais Kv1.1 e *Shaker IR*. Devido a toxina Ts7 apresentar alto efeito de bloqueio em uma variedade de canais (total de 5), ela pode ser caracterizada como uma toxina não específica, promíscua e, portanto, de baixo potencial terapêutico. Baseado nessa promiscuidade, combinada com a baixa quantidade da Ts7 na peçonha (aproximadamente 0,24% comparada a 1,82% de Ts6), não foram realizados os experimentos de dose-resposta, justificando também a menor quantidade de canais testados.

O alinhamento das sequências das α -KTx demonstrou que a toxina Ts7 tem alta identidade com várias toxinas. Embora a Ts7 e Ts6 apresentem 45 % de

identidade, elas mostram afinidades distintas para os canais para potássio, em particular os Kv1.1 e *Shaker IR*.

Toxinas capazes de interagir com subtipos de canais para K dependente de voltagem apresentam determinantes moleculares em comum (Jouirou *et al.*, 2004). Estudos de evolução indicam que diversos grupos de peptídeos apresentam preferência para alguns subtipos de canais. A díade funcional (*function dyad*) é um rearranjo estrutural em que um par de aminoácidos chave presente na estrutura da toxina é responsável pela interação da mesma com os canais para potássio do tipo Kv1.x. Caracteriza-se pela presença de um resíduo de lisina (K) e um resíduo hidrofóbico, usualmente tirosina (Y), fenilalanina (F) ou leucina (L) na porção final da molécula. Estes aminoácidos ainda são separados por uma distância de 6-7 Å (Dauplais *et al.*, 1997). Ambas as toxinas (Ts6 e Ts7) apresentam a díade e, conforme esperado, ação nos canais para potássio do tipo Kv1.x.

Trabalhos anteriores (Rodriguez de la Vega e Possani, 2004) também já haviam considerado, com base em suas sequencias, que a Ts6 e Ts7 deveriam apresentar efeito farmacológico em canais Kv1.x, o que foi confirmado por este trabalho. A toxina Tst26, proveniente do escorpião *Tityus stigmurus*, também apresenta a díade e demonstrou 97% de homologia com a toxina Ts7. Apesar dessa alta homologia, a Tst26 apresentou maior afinidade apenas para os canais Kv1.2 e kv1.3.

Embora a díade seja importante para a ligação seletiva em canais para potássio, ela não é determinante para esta interação. O complexo toxina-canal necessita de múltiplos contatos para se efetivar, permitindo que a toxina realize sua ação bloqueadora (Papp *et al.*, 2009). Além disso, outros trabalhos demonstram que a teoria da díade não funciona exatamente como o modelo predito (Tong *et al.*,

2000; Batista *et al.*, 2002; Dhawan *et al.*, 2003). Dessa maneira, mais estudos focando a relação estrutura-atividade de toxinas serão necessários para elucidar detalhadamente essa interação toxina-canal.

Nesse trabalho a toxina Ts6 mostrou ser mais específica para canais Kv1.2, Kv1.3, e pode ser considerada uma droga alvo para o desenvolvimento de um medicamento imunossupressor. A Ts7, por outro lado, demonstrou capacidade de bloquear vários canais para potássio com alta efetividade, sendo, portanto menos específica e de menor interesse para o desenvolvimento de medicamentos para tratar canalopatias. Observa-se pelos dados apresentados que apesar de as toxinas Ts6 e a α -KTx3.1 apresentarem elevada identidade suas ações em Kv1.3 são muito diferentes, apesar de ambas possuírem ação em *Shaker*. Observa-se também diferenças entre a Ts6 e a α -KTx12.5, a qual bloqueia canais para Kv1.1 com elevada afinidade, diferindo da toxina Ts6. No entanto, apresentam ações semelhantes no que se refere ao bloqueio dos canais Kv1.2 e Kv1.3. Por outro lado, é possível observar que a ação da Ts7 é muito semelhante às ações das toxinas com as quais apresenta elevada identidade. O bloqueio de canais Kv1.3 e *Shaker* é bastante evidente neste grupo de toxinas.

Apesar de muito semelhantes as α -KTx podem apresentar especificidades distintas para diferentes canais. Portanto, estudos mais detalhados das estruturas tridimensionais dessas toxinas ainda são necessários para evidenciar aminoácidos determinantes na interação com os diferentes subtipos de canais para potássio. Mesmo assim, o estudo atual de ambas as toxinas é de importância ímpar para o melhor entendimento do envenenamento escorpiónico e das estruturas moleculares envolvidas no bloqueio dos canais para potássio. Ainda, essas informações combinadas com técnicas de biologia molecular podem ser úteis na produção de

toxinas recombinantes com alta seletividade e afinidade para canais para potássio com efeito terapêutico desejado (Papp *et al.*, 2009).

Conclusões

6. Conclusões

- A metodologia de fracionamento adaptada para sistema CLAE da peçonha bruta de *Tityus serrulatus*, apresentou um perfil semelhante ao descrito na cromatografia clássica, porém com resolução, reprodutibilidade e praticidade superiores.
- A purificação dos componentes da fração X através de cromatografia em coluna C18 de fase reversa no sistema CLAE realizada como já descrito por Cologna (2011), mostrou-se muito eficiente, permitindo a obtenção da Ts6, componente majoritário da fração XI, conforme relatos na literatura, e de outras toxinas com elevado teor de pureza.
- A purificação dos componentes da fração XI realizada por um novo procedimento utilizando dados de cromatografia em coluna C18 de fase reversa no sistema CLAE, mostrou-se muito eficiente, permitindo a obtenção da Ts5, componente majoritário da fração XI confirmando a literatura, da toxina Ts7 e de outras toxinas com elevado teor de pureza.
- Os experimentos eletrofisiológicos utilizando a técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos, demonstraram que as toxinas Ts6 e Ts7 são potentes bloqueadoras de canais Kv1.x.
- A toxina Ts6 demonstrou ser seletiva para os subtipos de canais Kv1.2 e Kv1.3, bloqueando estes canais mesmo em baixa concentração, podendo ser considerada uma molécula com potencial terapêutico.
- A toxina Ts7 demonstrou afinidade para diversos canais para potássio do tipo Kv1.x, descartando a possibilidade de sua aplicação em terapias canal-dirigidas.

Referências

7. Referências

- Abdel-Mottaleb, Y., F. V. Coronas, A. R. de Roodt, L. D. Possani and J. Tytgat (2006). "A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new alpha-KTX subfamily." FEBS Lett **580**(2): 592-596.
- Arantes, E. C., W. A. Prado, S. V. Sampaio and J. R. Giglio (1989). "A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin." Toxicon **27**(8): 907-916.
- Balozet, L. (1971). "Scorpions in the old world." Venomous Animal and Their Venoms **3**: 349-371.
- Barrio, A. V. B. (1949). "Ein neues Verfahren der Giften Nahme ber Spinnem." Experientia **6**: 112-113.
- Batista, C. V., F. Gomez-Lagunas, R. C. Rodriguez de la Vega, P. Hajdu, G. Panyi, R. Gaspar and L. D. Possani (2002). "Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+) channels with distinctly different affinities." Biochim Biophys Acta **1601**(2): 123-131.
- Brew, H. M., J. X. Gittelman, R. S. Silverstein, T. D. Hanks, V. P. Demas, L. C. Robinson, C. A. Robbins, J. McKee-Johnson, S. Y. Chiu, A. Messing and B. L. Tempel (2007). "Seizures and reduced life span in mice lacking the potassium channel subunit Kv1.2, but hypoexcitability and enlarged Kv1 currents in auditory neurons." J Neurophysiol **98**(3): 1501-1525.
- Briggs, D. E. G. (1987). "Scorpions take to the water." Nature **326**: 645-646.
- Burcherl, W. (1979). "Acúleos que matam." Revistas dos Tribunais: 153.

- Catterall, W. A. (1984). "The molecular basis of neuronal excitability." Science **223**(4637): 653-661.
- Catterall, W. A. (1998). "Structure and Function of voltage-sensitive ion channels." Science: 50-61.
- Centro-de-Vigilância-Epidemiológica (2011). Acidentes por Animais Peçonhentos.
- Cestele, S. and W. A. Catterall (2009). Toxins Targeting Mammalian Sodium Channels. Animal Toxins: State of the Art. M. E. de Lima. Belo Horizonte, UFMG: 100-117.
- 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 Pept Lett **16**(8): 920-932.
- Cologna, C. T., S. Peigneur, J. C. Rosa, H. S. Selistre-de-Araujo, W. A. Varanda, J. Tytgat and E. C. Arantes (2011). "Purification and characterization of Ts15, the first member of a new alpha-KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*." Toxicon **58**(1): 54-61.
- Coronas, F. V., A. R. de Roodt, T. O. Portugal, F. Z. Zamudio, C. V. Batista, F. Gomez-Lagunas and L. D. Possani (2003). "Disulfide bridges and blockage of Shaker B K(+)-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*." Toxicon **41**(2): 173-179.
- Coutinho-Netto, J. (1975). Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina., Universidade de São Paulo.

- D'Alfonso, G., A. Tramontano and A. Lahm (2001). "Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling." J Struct Biol **134**(2-3): 246-256.
- D'Suze, G., F. Zamudio, F. Gomez-Lagunas and L. D. Possani (1999). "A novel K⁺ channel blocking toxin from Tityus discrepans scorpion venom." FEBS Lett **456**(1): 146-148.
- Dauplais, M., A. Lecoq, J. Song, J. Cotton, N. Jamin, B. Gilquin, C. Roumestand, C. Vita, C. L. de Medeiros, E. G. Rowan, A. L. Harvey and A. Menez (1997). "On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures." J Biol Chem **272**(7): 4302-4309.
- Dhawan, R., A. Varshney, M. K. Mathew and A. K. Lala (2003). "BTK-2, a new inhibitor of the Kv1.1 potassium channel purified from Indian scorpion Buthus tamulus." FEBS Lett **539**(1-3): 7-13.
- Di Ferrante, N. (1956). "Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. ." Journal of Biological Chemistry **220**: 303-306.
- Diego-Garcia, E., C. V. Batista, B. I. Garcia-Gomez, S. Lucas, D. M. Candido, F. Gomez-Lagunas and L. D. Possani (2005). "The Brazilian scorpion Tityus costatus Karsch: genes, peptides and function." Toxicon **45**(3): 273-283.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.

- Eccles, C. U., R. S. Rogowski, X. Gu, B. E. Alger and M. P. Blaustein (1994). "Tityustoxin-K alpha, from scorpion venom, blocks voltage-gated, non-inactivating potassium current in cultured central neurons." Neuropharmacology **33**(12): 1523-1528.
- Edman, P. and G. Begg (1967). "A protein sequenator." Eur J Biochem **1**(1): 80-91.
- Garcia-Calvo, M., R. J. Leonard, J. Novick, S. P. Stevens, W. Schmalhofer, G. J. Kaczorowski and M. L. Garcia (1993). "Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels." J Biol Chem **268**(25): 18866-18874.
- Garcia, M. L., A. Galvez, M. Garcia-Calvo, V. F. King, J. Vazquez and G. J. Kaczorowski (1991). "Use of toxins to study potassium channels." J Bioenerg Biomembr **23**(4): 615-646.
- Garcia, M. L., Y. Gao, O. B. McManus and G. J. Kaczorowski (2001). "Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure." Toxicon **39**(6): 739-748.
- Gazarian, K. G., T. Gazarian, R. Hernandez and L. D. Possani (2005). "Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines." Vaccine **23**(26): 3357-3368.
- Ghanshani, S., H. Wulff, M. J. Miller, H. Rohm, A. Neben, G. A. Gutman, M. D. Cahalan and K. G. Chandy (2000). "Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences." J Biol Chem **275**(47): 37137-37149.

- Gomez, M. V. and C. R. Diniz (1966). "Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom." Mem Inst Butantan **33**(3): 899-902.
- Gordon, D., P. Savarin, M. Gurevitz and S. Zinn-Justin (1998). "Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels." J. Toxicol. (Toxin Rev.) **17**: 131-159.
- Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart and F. Metoz (1999). "ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript." Bioinformatics **15**(4): 305-308.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stuhmer and X. Wang (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 473-508.
- Hawgood, B. J. (1992). "Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950)." Toxicon **30**(5-6): 573-579.
- Hawgood, B. J. (1999). "Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination." Toxicon **37**(9): 1241-1258.
- Holaday, S. K., Jr., B. M. Martin, P. L. Fletcher, Jr. and N. R. Krishna (2000). "NMR solution structure of butantoxin." Arch Biochem Biophys **379**(1): 18-27.
- Hopkins, W. F. (1998). "Toxin and subunit specificity of blocking affinity of three peptide toxins for heteromultimeric, voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes." J Pharmacol Exp Ther **285**(3): 1051-1060.

- Jouirou, B., S. Mouhat, N. Andreotti, M. De Waard and J. M. Sabatier (2004). "Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels." Toxicon **43**(8): 909-914.
- Kalman, K., M. W. Pennington, M. D. Lanigan, A. Nguyen, H. Rauer, V. Mahnir, K. Paschetto, W. R. Kem, S. Grissmer, G. A. Gutman, E. P. Christian, M. D. Cahalan, R. S. Norton and K. G. Chandy (1998). "ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide." J Biol Chem **273**(49): 32697-32707.
- Kozminsky-Atias, A., E. Somech and N. Zilberberg (2007). "Isolation of the first toxin from the scorpion *Buthus occitanus israelis* showing preference for Shaker potassium channels." FEBS Lett **581**(13): 2478-2484.
- Lam, J. and H. Wulff (2011). "The Lymphocyte Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1 as Targets for Immunosuppression." Drug Dev Res **72**(7): 573-584.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. MacGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins (2007). Bioinformatics.
- Leonard, R. J., M. L. Garcia, R. S. Slaughter and J. P. Reuben (1992). "Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10094-10098.
- Likes, K., W. Banner, Jr. and M. Chavez (1984). "Centruroides exilicauda envenomation in Arizona." West J Med **141**(5): 634-637.
- Liu, J., Y. Ma, S. Yin, R. Zhao, S. Fan, Y. Hu, Y. Wu, Z. Cao and W. Li (2009). "Molecular cloning and functional identification of a new K(+) channel blocker, LmKTx10, from the scorpion *Lychas mucronatus*." Peptides **30**(4): 675-680.

- Lourenço, W. R. (2007). "Parthenogenesis in scorpions: some history - new data." Venom Animals Toxins **14**: 19-44.
- Lourenço, W. R. and O. Coellar (1995). "Scorpions, scorpionism, life, history, strategies and parthenogenesis." The Journal of Venomous Animals and Toxins **2**: 52.
- Lutz, A. and O. Mello (1922). "Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros Tityus e Rhopalurus." Folha Médica **3**: 26.
- Mamelak, A. N., S. Rosenfeld, R. Bucholz, A. Raubitschek, L. B. Nabors, J. B. Fiveash, S. Shen, M. B. Khazaeli, D. Colcher, A. Liu, M. Osman, B. Guthrie, S. Schade-Bijur, D. M. Hablitz, V. L. Alvarez and M. A. Gonda (2006). "Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma." J Clin Oncol **24**(22): 3644-3650.
- Marcussi, S., E. C. Arantes, A. M. Soares, J. R. Giglio and M. V. Mazzi (2011). Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. São Paulo, FUNPEC.
- Ministério-da-Saúde (2009). Manual de Controle de Escorpiões. D. d. V. Epidemiológica. Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde. **1**: 8.
- Mouhat, S., N. Andreotti, B. Jouirou and J. M. Sabatier (2008). "Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels." Curr Pharm Des **14**(24): 2503-2518.
- Novello, J. C., E. C. Arantes, W. A. Varanda, B. Oliveira, J. R. Giglio and S. Marangoni (1999). "TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels." Toxicon **37**(4): 651-660.

- Oga, S., M. M. A. Camargo and J. A. O. Batistuzzo (2008). Introdução à Toxicologia. Fundamentos de Toxicologia. A. S. Paulo.
- Olamendi-Portugal, T., F. Gomez-Lagunas, G. B. Gurrola and L. D. Possani (1996). "A novel structural class of K⁺-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*." Biochem J **315** (Pt 3): 977-981.
- Olsen, M. L., S. Schade, S. A. Lyons, M. D. Amaral and H. Sontheimer (2003). "Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells." J Neurosci **23**(13): 5572-5582.
- Papp, F., C. V. Batista, Z. Varga, M. Herceg, S. A. Roman-Gonzalez, R. Gaspar, L. D. Possani and G. Panyi (2009). "Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*." Toxicon **54**(4): 379-389.
- Petricevich, V. L. and I. Lebrun (2005). "Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro." Mediators Inflamm **2005**(1): 39-49.
- Pimenta, A. M., P. Mansuelle, C. R. Diniz and M. F. Martin-Eauclaire (2003). "Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved alpha-KTx12-1, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus* venom." J Pept Sci **9**(2): 132-140.
- Pongs, O., N. Kecskemethy, R. Muller, I. Krahjentsgens, A. Baumann, H. H. Kiltz, I. Canal, S. Llamazares and A. Ferrus (1988). "Shaker Encodes a Family of Putative Potassium Channel Proteins in the Nervous-System of *Drosophila*." Embo Journal **7**(4): 1087-1096.
- Portal-da-Saúde. (2012). "Acidentes por animais peçonhentos - Escorpiões." Retrieved 01/03/2012, 2012, from http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1537.

- Possani, L. D., B. Becerril, M. Delepierre and J. Tytgat (1999). "Scorpion toxins specific for Na⁺-channels." Eur J Biochem **264**(2): 287-300.
- Possani, L. D., G. Gurrola-Briones, S. P. Salas-Castillo, C. V. Batista, Z. Varga, G. Panyi and R. Gaspar (2011). VM23 AND VM24, TWO SCORPION PEPTIDES THAT BLOCK HUMAN T-LYMPHOCYTE POTASSIUM CHANNELS (SUB-TYPE KV1.3) WITH HIGH SELECTIVITY. US.
- Pukrittayakamee, S., D. A. Warrell, V. Desakorn, A. J. McMichael, N. J. White and D. Bunnag (1988). "The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms." Toxicon **26**(7): 629-637.
- Reisfeld, R. A., U. J. Lewis and D. E. Williams (1962). "Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels." Nature **195**: 281-283.
- Rodrigues, A. R., E. C. Arantes, F. Monje, W. Stuhmer and W. A. Varanda (2003). "Tityustoxin-K(alpha) blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3." Br J Pharmacol **139**(6): 1180-1186.
- Rodriguez de la Vega, R. C. and L. D. Possani (2004). "Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels." Toxicon **43**(8): 865-875.
- Scarborough, R. M., J. W. Rose, M. A. Hsu, D. R. Phillips, V. A. Fried, A. M. Campbell, L. Nannizzi and I. F. Charo (1991). "Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*." J Biol Chem **266**(15): 9359-9362.
- Scholte, R. G., R. L. Caldeira, M. C. Simoes, W. H. Stutz, L. L. Silva, S. Carvalho Odos and G. Oliveira (2009). "Inter- and intrapopulational genetic variability of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae)." Acta Trop **112**(2): 97-100.

- Soroceanu, L., Y. Gillespie, M. B. Khazaeli and H. Sontheimer (1998). "Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors." Cancer Res **58**(21): 4871-4879.
- Strong, P. N., G. S. Clark, A. Armugam, F. A. De-Allie, J. S. Joseph, V. Yemul, J. M. Deshpande, R. Kamat, S. V. Gadre, P. Gopalakrishnakone, R. M. Kini, D. G. Owen and K. Jeyaseelan (2001). "Tamulustoxin: a novel potassium channel blocker from the venom of the Indian red scorpion *Mesobuthus tamulus*." Arch Biochem Biophys **385**(1): 138-144.
- Tempel, B. L., D. M. Papazian, T. L. Schwarz, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1987). "Sequence of a Probable Potassium Channel Component Encoded at Shaker Locus of *Drosophila*." Science **237**(4816): 770-775.
- Toldi, G., B. Vasarhelyi, A. Kaposi, G. Meszaros, P. Panczel, N. Hosszufalusi, T. Tulassay and A. Treszl (2010). "Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels." Immunol Lett **133**(1): 35-41.
- Tong, Q. C., Y. Zhang, D. P. Li, Z. N. Zhou and Y. H. Ji (2000). "The blocking effect of BmP02, one novel short-chain scorpion peptide on transient outward K(+) channel of adult rat ventricular myocyte." Regul Pept **90**(1-3): 85-92.
- 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 Pharmacol Sci **20**(11): 444-447.
- Vasconcelos, F., V. L. Lanchote, L. M. Bendhack, J. R. Giglio, S. V. Sampaio and E. C. Arantes (2005). "Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **141**(1): 85-92.

- Vitkup, D., E. Melamud, J. Moult and C. Sander (2001). "Completeness in structural genomics." Nat Struct Biol **8**(6): 559-566.
- Watt, D. and J. M. Simard (1984). "Neurotoxic proteins in scorpion venom." J. Toxicol. (Toxin Rev.) **3**: 181-221.
- Werkman, T. R., T. A. Gustafson, R. S. Rogowski, M. P. Blaustein and M. A. Rogawski (1993). "Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1.2 K⁺ channel." Mol Pharmacol **44**(2): 430-436.
- Wulff, H., N. A. Castle and L. A. Pardo (2009). "Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov **8**(12): 982-1001.
- Zoccal, K. F., S. Bitencourt Cda, A. Secatto, C. A. Sorgi, C. Bordon Kde, S. V. Sampaio, E. C. Arantes and L. H. Faccioli (2011). "*Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators." Toxicon **57**(7-8): 1101-1108.

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cerni, Felipe Augusto

Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7 –
Ribeirão Preto, 2012.

86p.:il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. *Tityus serrulatus*. 2. Canais para potássio. 3. Neurotoxinas