UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Caroline Marroni Cremonez

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Caroline Marroni Cremonez

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

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

Ribeirão Preto
2015

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.

Cremones, Caroline Marroni

Isolamento e caracterização estrutural e funcional de neurotoxinas presentes nas frações XIIA e XIIB da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. Ribeirão Preto, 2015. 92p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Arantes, Eliane Candiani

1. *Tityus serrulatus*, 2. Canais iônicos, 3. Ts9, 4. Ts11, 5. Ts1-G

Caroline Marroni Cremonez

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

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha família, de sangue e de
coração. Nada seria possível sem eles.*

Agradecimentos

Quatro anos se passaram... Uma bela jornada. Nesse tempo tive o privilégio de conhecer pessoas sem as quais eu não teria chegado aonde cheguei. Pessoas incríveis que contribuíam e acrescentaram tanto em minha vida profissional quanto no meu crescimento pessoal. Por diferentes motivos e razões, gostaria de agradecer:

À Prof^ª Eliane Candiani Arantes, minha orientadora, minha guia, meu exemplo de pesquisadora e mulher. Todo agradecimento é pouco para expressar o que eu sinto. Agradeço pelos sete anos de confiança, de ensinamentos, de carinho e compreensão, paciência, por sempre me mostrar e me ensinar que eu posso fazer melhor sempre.

Agradeço ao Professor Jan Tytgat e a todos do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da Universidade de Leuven, Bélgica. Obrigada pela colaboração, pelo convívio e pela oportunidade de viver, aprender e crescer neste um ano que pude viver na Bélgica.

Ao querido amigo, ex-professor e orientador e eterno mestre, Prof. Dr. Wilson Roberto Malfará, que me mostrou a grandiosidade da Toxicologia.

Às técnicas do nosso Laboratório de Toxinas Animais, Karla Bordon e Iara Aimê Cardoso, por todo socorro e ajuda, pelo carinho e bons anos de convívio.

Aos companheiros do Laboratório de Toxinas Animais por toda contribuição que recebi e por tornar estes últimos sete anos de pós-graduação muito mais agradáveis e divertidos: Fernando A. Pino Anjolette, Manuela Berto Pucca Cerni, Felipe Augusto Cerni, Fernanda Amorim, Camila Takeno Cologna, Johara Boldrini França, Renata Rodrigues, Karla Bordon, Flávia Pine Leite, Iara Aimê Cardoso, Tibério Perini, Ernesto Lopes, Priscila Shibao, Gisele Wiesel, Mateus Baldo, Elisa Fornari, Isabela Ferreira, Isadora Oliveira, Francielle Cordeiro, Guilherme Oliveira, Heloisa Longhim, Mariana Graf, Charlotte Andriotti.

Aos colegas de do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da KU Leuven- Bélgica por toda atenção, amizade e apoio: Steve Peigneur, Bea G. Mille, Elia Diego-Garcia, Lien Moreels, Eline Lebbe.

Aos Professores da disciplina de Toxicologia, Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, Profa. Dra. Vera Lanchote, Profa. Dra. Regina Queiroz, Prof. Dr. Fernando Barbosa, Prof. Dr. Antônio Cardoso por todo conhecimento transmitido durante meu período de estágio do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino junto à disciplina.

Ao pessoal da informática, Marcelo, Vitor, Diego e Alessandro, que me socorreram nos momentos mais problemáticos.

Agradeço à Maria Aparecida Segato e Regina Albuquerque.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Toxinologia e a Prof. Dra. Suely Vilela.

À Dra. Maria Cristina Nonato e ao Prof. Antônio José Costa-Filho.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP com quem tive o privilégio de conviver durante vários anos da pós-graduação e que sempre bem-dispostos me ajudaram em inúmeros momentos: Joane Rustiguel, Matheus Pinheiro, Ricardo de Pádua, Patrícia Feliciano.

A todos os funcionários da sessão de pós-graduação: Rosana, Eleni, Henrique e Rafael, e em especial à querida Rose Gerolineto, por todo carinho e ajuda de tantos anos.

Ao Luis Henrique Pedrosa pelos anos de amizade e contribuição.

Em especial agradeço àqueles que tiveram participação pessoal nesta minha jornada, e que se fizeram presente na minha vida e trouxeram consigo contribuições inestimáveis.

“Existem pessoas que tornam nossa caminhada mais significativa... pela companhia, pelo apoio, pelo carinho. E por que nos tornam melhores” (Autor desconhecido)

À minha mãe Elizabeth Marroni Cremonez, pela vida, por sempre me incentivar e nunca me deixar desistir. Por olhar por mim a todo o momento, pela paciência, por pegar na minha mão e me ajudar a levantar a cada queda. Obrigada por me ensinar o que é o amor.

Ao meu pai Carlos Eduardo Cremonez, senhorzinho de voz brava e coração gigante. Obrigada pela vida, pelos puxões de orelha, pela paciência, pelo amor e carinho. Você me dá força que eu preciso para seguir em frente. Força para lutar sempre.

Agradeço à querida Paula Rived Garcia, por todo carinho e dedicação, apoio e incentivo. Por também acreditar que eu posso ir além, sempre.

Aos meus queridos amigos e companheiros de jornada e meus irmãos de coração Rodrigo Metzker Pereira Ribeiro, Willys Tristão, Alex Malezan, Thays B. Kassemmodel, Amanda Arnaut, Leonardo Pinto, Marcelo Barros Vilas, Fernando Fumagalli. Agradeço pelos anos de convívio e amizade, pelo riso e carinho. Vocês foram a família que eu ganhei no momento que eu mais precisei. Obrigada por todos

As minhas eternas amigas que mesmo longe sempre estiveram presente e torceram por mim: Camila, Larissa, Ana Carolina, Livia.

À Manuela Pucca e Felipe Cerni, queridos amigos e companheiros de trabalho de tantos anos. Obrigada pelos anos de colaboração e amizade, conselhos, planos e risos.

À Camila Takeno Cologna e Jan Piessens por me receberem de braços abertos na Bélgica, sempre me ajudando.

Aos inúmeros brasileiros que conheci durante meu estágio na Bélgica. Cada um deles contribuindo e fazendo diferença na minha história.

À Greyce Kelly Steinhorst, amiga que se tornou minha irmã de coração. Obrigada por estar ao meu lado sempre, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, obrigada pelas comemorações nos momentos de vitória e pelo ombro nos momentos de tristeza, pelos dias engraçados, enfim obrigado por todos os momentos que passamos juntas e por acrescentar tanto significado em minha vida... lembrando sempre que estar longe não significa estar distante.

Ao meu querido amigo Fernando Antônio Pino Anjolette, por tantos anos de companheirismo, carinho e cumplicidade. As pessoas aparecem na vida das outras no momento certo, e você é um anjo em minha.

Ao Steve Peigneur e à Bea G Mille, dois grandes amigos que tive a oportunidade de fazer durante meu doutorado sanduíche na Bélgica. Amigos que me acolheram, ensinaram muito e se tornaram parte da minha vida.

Agradeço pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Enfim, de forma direta ou indireta, a todos que passaram por mim nesta jornada, e acrescentaram um pouco em minha vida.

A todos vocês,

Muito Obrigada

“Every great story on the planet happened when someone decided not to give up, but kept going no matter what.”

– Spryte Lorian

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ESCORPIÃO <i>TITYUS SERRULATUS</i>	1
1.2. CANAIS IÔNICOS E TOXINAS	4
1.2.1. CANAIS PARA SÓDIO	6
1.2.2. CANAIS PARA POTÁSSIO	8
1.3. ISOLAMENTO DE TOXINAS	13
1.4. <i>TITYUS SERRULATUS</i> : TOXINAS ISOLADAS	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVOS GERAIS	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. PEÇONHA	21
3.2. CROMATOGRAFIA DA PEÇONHA DE <i>T. SERRULATUS</i> EM COLUNA DE CM-CELULOSE-52	21
3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE FASE REVERSA	22
3.4. SEQUENCIAMENTO AMINO-TERMINAL	22

3.5. ANÁLISE DAS FRAÇÕES DA PEÇONHA DE <i>T.SERRULATUS</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	23
3.6. ENSAIOS ELETROFISIOLÓGICOS	24
3.6.1. SELEÇÃO, PREPARAÇÃO E INJEÇÃO DO cRNA NOS OÓCITOS	24
3.6.2. MEDIDAS ELETROFISIOLÓGICAS	26
3.6.3. PROTOCOLOS	27
3.7. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	29
3.7.1. RESTRIÇÕES ESTRUTURAIS	30
3.7.2. CÁLCULOS ESTRUTURAIS	30
3.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
3.8.1. ANÁLISE IN SILICO	31
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>32</u>
4.1. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES XIIA, XIIB E XIII E IDENTIFICAÇÃO DAS TOXINAS ISOLADAS	32
4.1.1. ISOLAMENTO DAS TOXINAS	32
4.2. ANÁLISE PROTEÔMICA DAS FRAÇÕES XIIA E XIIB DA PEÇONHA DE <i>TITYUS SERRULATUS</i>	41
4.2.1. ANÁLISE DAS FRAÇÕES XIIA E XIIB POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
4.2.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DAS FRAÇÕES XIIA E XIIB POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E/OU SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL	45
4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS ISOLADAS	51
4.3.1. Ts11	51
4.3.1.1. Caracterização funcional da Ts11 em canais iônicos	51
4.3.1.2. Caracterização estrutural da Ts11 por Ressonância Magnética Nuclear	56
4.3.2. Ts9	66
4.3.2.1. Caracterização funcional da Ts9 em canais para potássio dependentes de voltagem	66

4.3.3. Ts1 x Ts1-G _____	70
--------------------------	----

4.3.3.1. Caracterização funcional da Ts1-G em canais para sódio dependentes de voltagem	70
---	----

<u>5. CONCLUSÕES</u>	75
-----------------------------	-----------

<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	76
---	-----------

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

CREMONEZ, C. M., **Isolation and structural and functional characterization of neurotoxins present on fractions XIIA and XIIB from *Tityus serrulatus* venom.** Ribeirão Preto, 2015. 92p. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The yellow scorpion *Tityus serrulatus* (Ts) is considered the most dangerous species of Brazil, and several toxins present in its venom have been already isolated and characterized. However, fractions XIIA and XIIB obtained from ion exchange chromatography of Ts crude venom, presented many low molecular weight toxins which have not been characterized yet. Through a combination of RP-FPLC technique using C8 and C18 columns, mass spectrometry and / or amino terminal sequencing, it was possible to isolate and identify the components of these fractions, as well as perform structural characterization thru NMR and electrophysiological characterization using Two Microelectrode Voltage Clamp, of some of the neurotoxins isolated. It was chosen three toxins of interest: Ts11, Ts9 and Ts1-G. Our results show that Ts11 was able to block voltage gated potassium channels (Kv): Kv1.2, Kv1.3, Kv4.2, Kv10.1, hERG, and Shaker IR, blocking 25%, 27%, 25% 15%, 12% and 10% of the potassium currents, respectively. Ts11 has an unique structure (structure obtained thru NRM technique): ICK scaffold without the elements of secondary structure (alpha helix or beta-sheet). Additionally, the differentiated structure and functional characterization, Ts11 shows us an evidence of a new subfamily of toxins, which was named as ϵ -KTX, and therefore, Ts11 is the first member of this subfamily: ϵ -KTx1.1. The functional characterization of Ts9 shows that it has no blocking activity on the tested Kv channels (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.1, Kv4.2, Kv7.2, Kv10.1, hERG and Shaker IR) at a concentration of 100 nM. Despite the Ts9 have not blocked the tested channels, it presents structure and key-amino acid residues that suggest its action on Kvs and previously published study shows that it is a potent ligand for slow conductance calcium-activated potassium channels (SK). It was also conducted a comparative electrophysiological study between the Ts1 and its precursor isoform Ts1-G on voltage gated sodium channels, in order to evaluate the importance of the C-terminal amidation. The mature Ts1 has amidated C-terminal region, whereas Ts1-G isoform is not amidated, and therefore has a Gly at the C-terminal region (last step of post-translational modification, before the action of the enzyme α -amidante). The Ts1-G showed no action on Nav channels at the concentration tested (100 nM), whereas Ts1 (100 nM) acts as β -toxin, lowering the excitation threshold of Nav channels and/or reducing sodium currents, evidencing that the C-terminal amidation is important for the biological activity of the mature toxin. Additionally, the analyses by MALDI/TOF of the fractions XIIA and XIIB showed several molecules whose molar masses do not match the toxins already identified, opening prospects for the identification of new molecules with potential biotechnological use, considering that toxins that act on ion channels can be valuable tools for the elucidation of pharmacological, physiological and structural characteristics of their targets.

Keywords: *Tityus serrulatus*, Ionic Channels, Ts9, Ts11, Ts1-G.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escorpião Amarelo <i>Tityus serrulatus</i> .	2
Figura 2. Acidentes por animais peçonhentos notificados entre 2007 e 2014.	3
Figura 3. Representação esquemática da subunidade α do canal para sódio dependente de voltagem e os seus sítios de interação com toxinas animais.	7
Figura 4. Representação tridimensional de um canal para potássio dependente de voltagem. (A) Representação tridimensional do tetrâmero que forma o Kv, visto da porção extracelular. (B) Representação tridimensional do canal integral.	9
Figura 5. Procedimento cirúrgico para a obtenção dos oócitos de <i>Xenopus laevis</i> . (A) Aquatic Facilities- KU Leuven (B-C) Rã <i>Xenopus laevis</i> anestesiada (D-G) Cirurgia de ovariectomia parcial (H) Oócitos isolados em solução de colagenase 2 mg/mL	25
Figura 6. Microinjeção dos oócitos de <i>Xenopus laevis</i> com cRNA correspondente ao canal desejado. (A) Oócitos selecionados em estágios de maturação V e VI (B) Microinjeção de cRNA (C) Oócitos enfileirados na câmara de microinjeção (D) Microinjetor de cRNA (E) <i>Set up</i> das medidas eletrofisiológicas.	26
Figura 7. Protocolo de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes de potássio ou sódio de oócitos de <i>Xenopus laevis</i> . (A) Kv1.1 – Kv1.6, Kv2.x, Kv3.x, Kv4.x e <i>Shaker</i> IR. (B) Kv protocolo da relação de corrente x voltagem. (C) hERG (D) Nav1.1-1.8 e DmNav1 (E) Nav protocolo da relação de corrente x voltagem.	28
Figura 8. Perfil cromatográfico da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> em coluna de CM-Celulose-52.	33
Figura 9. Perfis cromatográficos da fração XIIA em colunas de fase reversa. (A) C4 (B) C8, e (C) C18	35
Figura 10. (A) Perfil cromatográfico da fração XIIA em coluna de fase reversa C8. (B) Perfil cromatográfico da XIIA-2 (Ts11) em coluna de fase reversa C18, e (C) Perfil cromatográfico da XIIA-5 (Ts9) em coluna de fase reversa C18..	36
Figura 11. (A) Perfil cromatográfico da fração XIIB (10 μ g) e (B) da XIIB-10 (Ts1-G, 45 μ g) em coluna de fase reversa C18. .	39
Figura 12. Perfil cromatográfico da fração XIII (100 μ g) em coluna de fase reversa C18.	40
Figura 13. Espectros de massas da fração XIIA, obtidos por espectrometria de massas MALDI-TOF (MALDI-TOF/TOF Ultraflex II, Bruker) nos modos refletido (A) e linear (B).	43
Figura 14. Espectro de massas da fração XIIB. MALDI-TOF/TOF Ultraflex II em matriz DHB, modo linear.	44

Figura 15. (A) Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio (Kv) na ausência ou presença da Ts11 (3 μ M) (B) Relação Corrente x Voltagem em Kv1.3 (C) Curva de dose-resposta em Kv1.3. _____	53
Figura 16. Traçados representativos das correntes iônicas em canais hERG na ausência ou presença da Ts11 (A) 500 nM (B) 1 μ M (C) 5 μ M (D) 10 μ M. _____	54
Figura 17. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para sódio (Nav) na ausência ou presença da Ts11 (1 μ M). _____	55
Figura 18. Sequência e pontes dissulfeto (obtidas pela determinação da estrutura por RMN) da Ts11 juntamente com o sumário de médio e longo alcance de NOEs, acoplamentos $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ ($^3J_{\alpha\text{N}}$) e índice de deslocamentos químicos (CSI) para os prótons H α . _____	57
Figura 19. Estrutura de RMN da toxina Ts11 em solução. (A) Visão estérica de 15 estruturas sobrepostas. (B) Visualização da estrutura em fita. (C) Representação das pontes dissulfeto ICK da toxina Ts11. _____	59
Figura 20. Alinhamento amino-terminal e suas respectivas identidades entre a Ts11 com representantes das classes α - β - γ - κ - δ e λ -KTx, com a ϕ -Liotoxin-Lw1a e clorotoxinas. ____	63
Figura 21. Estrutura tridimensional da toxina Ts11 do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> . (A) Ts11 backbone (B) Pareamento das pontes dissulfeto da Ts11 (C-D) Resíduos positivamente carregados presentes na Ts11. _____	64
Figura 22. Estrutura tridimensional da Ts9. PDB 1TSK. Imagem criada usando o software Pymol. _____	66
Figura 23. Alinhamento da Ts9 com ChTX e KTX-1 que atuam em Kvs, Pi4 e ScyTx que atuam em canais SK, e com uma α -KTx que atua em canais hERG, AmmTX3.. _____	67
Figura 24. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio (Kv) na ausência ou presença da Ts9 (100 nM). _____	68
Figura 25. Traçados representativos das correntes iônicas em Kv1.3 e hERG na ausência ou presença da Ts9 (1 μ M). _____	69
Figura 26. Comparação eletrofisiológica entre a Ts1 e sua isoforma precursora Ts1-G (100 nM). em canais (A) Nav1.1, (B) Nav1.2, (C) Nav1.3, (D) Nav1.4, (E) Nav1.5, (F) Nav1.6, (G) Nav1.8, e (H) DmNav1. _____	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das subfrações obtidas a partir da fração XIIA. _____	47
Tabela 2. Identificação das subfrações isoladas a partir da fração XIIB. _____	49
Tabela 3. Resultados da análise estatística dos parâmetros obtidos da determinação da estrutura por RMN da toxina Ts11 para um conjunto de 15 estruturas. _____	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Ts – *Tityus serrulatus*

Kv – Canais para potássio sensíveis a voltagem

KTx – Toxinas que atuam em canais para potássio

hERG- Subfamília de canais para potássio sensíveis a voltagem *human ether-à-go-go*

SK- Canal para potássio cálcio ativado de baixa condutância (*Small conductance*)

Nav – Canais para sódio sensíveis a voltagem

NaScTx- Toxinas que atuam em canais para sódio

RP – Fase reversa (*Reverse phase*)

FPLC - Cromatografia líquida rápida de proteínas (*Fast Protein liquid chromatography*)

³H-GABA- Ácido gama aminobutírico

³H-DA - Dopamina

CS $\alpha\beta$ scaffold– estrutura tridimensional de uma proteína onde uma α -hélice da porção C-terminal é conectada por duas pontes dissulfeto a uma folha- β antiparalela (2 ou 3 fitas- β) (*Cystein stabilized $\alpha\beta$*)

CS $\alpha\alpha$ scaffold - estrutura tridimensional puramente helicoidal, onde duas α -hélices são conectadas por duas pontes dissulfeto, adotando a conformação α -hairpin (grampo de cabelo) (*Cystein stabilized $\alpha\alpha$*)

ICK- Padrão de conexão das pontes dissulfeto de uma proteína chamado Nó de Cisteína, quando duas pontes dissulfeto juntamente com as cadeias polipeptídicas às quais estão ligadas formam um laço, por onde uma terceira ponte dissulfeto penetra, formando um nó. (*Inhibitory cystein knot*)

2D- Bidimensional

3D- Tridimensional

RMN – Ressonância magnética nuclear

MALDI-TOF/TOF- Espectrômetro de massas com ionização e dessorção laser assistida por matriz acoplada a um analisador por tempo de voo

HCCA- Ácido α – ciano 4-hidroxicinâmico

DHB- 2,5- ácido dihidroxibenzoico

SA - ácido sinapínico

ND96 – solução contendo NaCl 96 mM; KCl 2 mM; MgCl₂ 2 mM; HEPES 5 mM; CaCl₂ 1,8 mM; pH 7,4, ajustado com NaOH.

DQF- Filtro duplo quântico (*Double Quantum Filter*)

NOESY- Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

COSY- Espectroscopia de correlação (*Correlation Spectroscopy*)

TOCSY- Espectroscopia de correlação total (*Total Correlation Spectroscopy*)

NOE –Efeito nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect*)

CSI- Index de deslocamentos químicos (*Chemical Shift Index*)

RMSD- Desvio da raíz quadrada media das posições atômicas (*Root-mean-square deviation of atomic positions*)

IC₅₀- Concentração necessária para inibir 50% um processo biológico

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Escorpião *Tityus serrulatus*

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

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

Figura 1. Escorpião Amarelo *Tityus serrulatus*.

Fonte: Laboratório de Toxinas Animais.

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

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

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

Fonte: Sinan- Ministério da Saúde)

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

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

Os principais sintomas causados pela peçonha, tais como hiperglicemia,

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

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

1.2. Canais iônicos e Toxinas

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

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

A modulação de canais exercida por toxinas animais desperta grande interesse, pois podem ser consideradas modelos para o desenvolvimento de moléculas com potencial uso

terapêutico (LEWIS e GARCIA, 2003; COLOGNA et al., 2009; WULFF; CASTLE e PARDO, 2009).

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

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

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

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

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

1.2.1. Canais para Sódio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.2. Canais para Potássio

São caracterizados pela sua grande diversidade sendo uma família formada por mais de 40 tipos diferentes de canais, classificados em 12 subfamílias (Kv1 – Kv12) de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos (GUTMAN et al., 2005). As subfamílias dos canais Kv são estruturalmente similares, organizando-se em tetrâmeros de 4 subunidades α que se unem formando complexos homo ou heteromultiméricos (Fig. 4). Cada subunidade α do canal Kv possui 6 segmentos transmembranas (S1-S6) e uma alça (P) altamente conservada, localizada entre os segmentos S5 e S6 (CATTERALL et al., 2007).

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

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

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

Um pouco mais de 30 anos se passaram desde que foi descoberta a Noxiustoxina, a primeira toxina isolada do escorpião *Centruroides noxius*, e que demonstrou afetar a permeabilidade de canais Kv em axônios gigantes de lula (POSSANI; MARTIN e SVENDSEN, 1982). A descoberta da *Charybdotoxin*, por Miller e colaboradores (1985), promoveu um grande aumento de estudos nessa área, já que tal peptídeo se mostrou um excelente modelo para o estudo de função e estrutura do canal para potássio (RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004).

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

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

toxinas pertencentes a família α -KTx que interagem tanto com canais Kv, quanto com canais hERG (*human ether-à-go-go related genes*). Para estas toxinas é proposto que dois resíduos básicos R e/ou K, encontrados nas posições 19 e 20 seriam os responsáveis pela interação com os canais hERG (RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004; ABDEL-MOTTALEB et al., 2008).

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

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

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

Dentro da família das γ -KTxs, são conhecidas 29 toxinas, subdivididas em 5 grupos. São toxinas que atuam em canais para potássio do tipo ERG (*ether-à-go-go*), tanto de humanos quanto de ratos. São compostas de 36 a 47 aminoácidos, estabilizados por três a quatro pontes dissulfeto, e também adotam o CS α / β *scaffold* (DIEGO-GARCIA et al., 2008; SAUCEDO et al., 2012; QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013; UNIPROT, 2015).

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

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

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

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

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

1.3. Isolamento de toxinas

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

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

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

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

Na sequência, Coutinho Netto (1975) purificou e caracterizou a Tityustoxina, fração parcialmente caracterizada por Gomez e Diniz em 1966, combinando extração da peçonha com amônia, seguida de gel filtração em coluna Sephadex G-50 e cromatografia de troca iônica em resina CM-celulose-52. A Tityustoxina mostrou ser uma toxina protéica de caráter básico, com

61 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 6.995 Da, N-terminal lisina e sem a presença de metionina em sua composição.

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

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

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

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

Cerni et al (2014) padronizaram o fracionamento do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* através de modificações do método de fracionamento da peçonha de *T. serrulatus* descrito por Arantes et al. (1989) e adaptado para sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC – *Fast Protein liquid chromatography*), no qual a peçonha solúvel é adicionalmente submetida a uma filtração em membrana antes de ser aplicada à coluna de

troca catiônica. O perfil cromatográfico obtido neste método foi semelhante aos obtidos no uso da metodologia de Arantes (1989), com uma melhora na resolução de algumas frações (frações VI, VIII, IX e XI), tornando o método mais rápido e prático, uma vez que tornou a leitura das absorvâncias automatizada (CERNI et al., 2014).

1.4. *Tityus serrulatus*: Toxinas isoladas

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

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

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

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

A toxina Ts5 corresponde a 2% da peçonha solúvel e também é considerada uma α -toxina. Estudos eletrofisiológicos mostraram que essa toxina prolonga o potencial de ação de fibras do nervo vago de coelho (ARANTES et al., 1994), bem como inibe a recaptação de ^3H -

GABA (γ -aminobutyric acid) e ^3H -DA (dopamina) em sinaptosomas isolados de cérebro de rato, de forma dependente de Ca^{2+} , em consequência de despolarização envolvendo canais Nav (CECHINI et al., 2006).

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

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

Ainda é encontrado na peçonha de *T. serrulatus* um peptídeo não tóxico denominado Ts4, incapaz de induzir os sintomas típicos causados por outras toxinas escorpiônicas. Embora considerado não tóxico, induz reações alérgicas, lacrimação, espasmos musculares em experimentos conduzidos em camundongos, além de liberação dose dependente de GABA e glutamato em preparações sinaptosomais (MARANGONI et al., 1990; SAMPAIO et al., 1991). Apesar de não tóxica, a toxina induz a produção de anticorpos policlonais capazes de neutralizar a peçonha através da reação cruzada da Ts4 com outras toxinas tóxicas. Anticorpos criados contra peptídeos correspondentes aos aminoácidos 1-15 e 47-61 da toxina foram capazes de neutralizar uma mistura de todas as toxinas tóxicas da peçonha de *T. serrulatus*, evidenciando que esses epítomos podem estar envolvidos com a ação tóxica da peçonha (CHAVEZ-OLORTEGUI; MOLINA; GRANIER, 2002).

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

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

A Ts15 foi caracterizada por Cologna e colaboradores em 2011, classificada em uma nova subfamília das α -KTxs, e denominada como α -KTx 21.1. Possui 36 aminoácidos

estabilizados por 3 pontes dissulfeto e massa molecular de 3956 Da. Atua preferencialmente em canais Kv1.2 e Kv1.3.

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

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

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

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

Embora várias toxinas já tenham sido descritas, o número é extremamente pequeno comparado à estimativa do número de toxinas existentes na peçonha (aproximadamente 300

toxinas), evidenciando a importância da continuidade do estudo da peçonha de *Tityus serrulatus*.

JUSTIFICATIVA

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

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

O primeiro exemplo de sucesso de drogas baseadas em toxinas é o fármaco captopril (Capoten®) da indústria Bristol-Myers Squibb, um anti-hipertensivo sintetizado com base na estrutura de um peptídeo isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* nos anos 60, que é hoje um dos medicamentos mais utilizados em todo o mundo para o tratamento de hipertensão arterial e pós-infarto do miocárdio. Ainda envolvendo doenças cardiovasculares, temos o Ancrod e o Batroxobin das peçonhas de *Agkistrodon rhodostoma* e *Bothrops atrox*, respectivamente, que clivam enzimaticamente o fibrinogênio sanguíneo e reduzem os déficits neurológicos nos primeiros estágios de acidente vascular encefálico (LEWIS e GARCIA, 2003). Outro fármaco já utilizado no tratamento de casos de trombose é o Eptifibatide (Integrilin®), sintetizado a partir da barbourina, isolada da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbouri* (SCARBOROUGH et al., 1991).

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

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

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

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Isolamento e caracterização estrutural e funcional das toxinas Ts9, Ts11 e Ts1-G presentes nas frações XIIA e XIIB da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer método de isolamento e isolar as toxinas Ts9 e Ts11 presentes nas frações XIIA e Ts1-G presente na fração XIIB da peçonha de *Tityus serrulatus* utilizando, inicialmente, cromatografia de troca catiônica, seguida de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa.
- Isolamento da toxina Ts1 presente na fração XIII da peçonha de *Tityus serrulatus*, para ser utilizada como controle positivo na caracterização funcional comparativa em canais para sódio com a sua isoforma Ts1-G
- Caracterização estrutural das toxinas isoladas através da determinação da massa molecular por espectrometria de massas e/ou sequenciamento amino-terminal.
- Determinação da estrutura tridimensional da Ts11 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
- Caracterização funcional das toxinas de interesse sobre canais iônicos, utilizando a técnica eletrofisiológica *Two microelectrode voltage clamp* em oócitos de *Xenopus laevis* que hiperexpressam isoformas de canais para sódio ou potássio.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peçonha

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, provenientes da região de Ribeirão Preto-SP e alimentados com baratas, extraída por estímulo elétrico do télson do animal, liofilizada e armazenada a - 20 °C foi adquirida do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto.

3.2. Cromatografia da peçonha de *T. serrulatus* em coluna de CM-celulose-52

A cromatografia do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* foi realizada como descrito por Cerni et al. (2014) em coluna de troca catiônica CM-Celulose-52 (microgranular Whatman 1.6 x100) cm adaptada a um sistema de FPLC (Äkta Purifier UPC-10 system – GE Healthcare®, Uppsala, Sweeden). A peçonha bruta dessecada foi previamente submetida a uma etapa de preparação a fim de tornar a amostra adequada para o fracionamento. A peçonha (100 mg) foi dispersa em 500 µL de solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8, e posteriormente centrifugada a 10.015 x g (Centrifuge® 5415 R), a 4°C por 10 minutos. O muco e o sobrenadante foram separados. O sobrenadante foi armazenado a 4°C e ao muco foi adicionado de mais 500 µL de solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Esta etapa de preparo da amostra foi repetida por mais duas vezes, até a obtenção de aproximadamente 2 mL de sobrenadante (peçonha solúvel). A peçonha solúvel foi então armazenada por 12 horas a 4°C e posteriormente centrifugada a 10.015 x g, a 4°C por 10 minutos e filtrada em membrana de 0,22 µm, visando a eliminação do muco insolúvel da peçonha. A amostra solúvel foi aplicada manualmente à coluna, e, após a penetração de toda amostra na resina, a coluna foi conectada ao sistema FPLC. As leituras de absorbância foram realizadas em 280 nm.

A coluna foi previamente equilibrada e inicialmente eluída (140 mL) com uma de solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8 (fase móvel A) em vazão contínua de 0,5 mL/min e, a seguir, iniciou-se um gradiente linear de concentração de bicarbonato de amônio até 100% de fase móvel B (bicarbonato de amônio 0,6 M; aproximadamente 440 mL

de eluição). A concentração 100% de fase móvel B foi mantida por mais 140 mL, decaindo abruptamente para 0%. Foi mantida a eluição da coluna com fase móvel A por aproximadamente mais 200 mL, a fim de reequilibrar a coluna.

3.3. Cromatografia líquida rápida de proteínas em coluna de fase reversa

As frações XIIA, XIIB e XIII, obtidas a partir da primeira etapa cromatográfica da peçonha em coluna de troca catiônica CM-celulose-52, foram liofilizadas em Liofilizador Flex-DryTMMP – FTS Systems. Foram testadas diversas colunas de fase reversa, sendo elas: C18 Vydac (4,6 mm x 25 cm, 5 µm), C18 Vydac (2,1 mm x 25 cm, 5 µm), C8 Phenomenex (Aeris widepore, 4,6 mm x 25 cm, 3,6 µm) e C4 Vydac (4,6 mm x 25 cm, 5 µm) para a padronização do método de isolamento dos componentes destas frações, acopladas a um sistema de FPLC Äkta Purifier UPC-10 (GE Healthcare®, Uppsala, Sweeden). As colunas foram inicialmente equilibradas com TFA 0,1% (V/V, fase móvel A), sob vazão de 1mL/min. As amostras foram aplicadas à coluna e inicialmente eluída com fase móvel A, seguindo-se um gradiente segmentado de concentração de acetonitrila, chegando a 100% de fase móvel B (Acetonitrila 80% em TFA 0,1%). As frações XIIA e XIIB foram submetidas a cromatografias nas diversas colunas até que fosse estabelecido o perfil mais adequado para o isolamento das toxinas de interesse.

3.4. Sequenciamento amino-terminal

A determinação da sequência N-terminal das toxinas isoladas foi realizada no Laboratório de Toxinas Animais, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em um sequenciador automático de proteínas Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). A sequência foi obtida pelo sequenciamento proteico através do método de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967).

3.5. Análise das frações da peçonha de *T.serrulatus* por espectrometria de massas

As frações XIIA e XIIB da peçonha foram analisadas por espectrometria de massas no utilizando o aparelho de ionização e dessorção laser assistida por matriz acoplada a um analisador por tempo de voo (MALDI-TOF/TOF Ultraflex II, Bruker Daltonics). As amostras foram ressuspensas em uma solução contendo 80% (v/v) de acetonitrila e 0,2% (v/v) de ácido trifluoroacético e misturadas na proporção de 1:1 com as matrizes HCCA (ácido α – ciano 4-hidroxicinâmico, 5 mg/mL) ou DHB (ácido 2,5-dihydroxibenzóico, 20 mg/mL). Os espectros de massa foram adquiridos nos modos linear (matriz DHB) ou refletido (HCCA) positivo, após a calibração do aparelho com um padrão de proteínas (Bruker peptide calibration standard II, para a HCCA ou Pep Mix 3 Laser biolab Ave para a DHB).

As toxinas isoladas da fração XIIA e XIIB foram submetidas à espectrometria de massas no Laboratory of Protein Phosphorylation and Proteomics, University of Leuven (KU Leuven), Leuven, Belgium, utilizando o espectrômetro de massas com ionização e dessorção laser assistida por matriz acoplada a um analisador por tempo de voo MALDI-TOF (4800 Analyzer, Applied Biosystems, USA). Os espectros de massa foram adquiridos nos modos linear e refletido, em matrix DHB (ácido 2,5-dihydroxibenzóico, 20 mg/mL).

Algumas toxinas isoladas da fração XIIA foram submetidas à espectrometria de massas no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, utilizando o espectrômetro de massas com ionização e dessorção laser assistida por matriz acoplada a um analisador por tempo de voo (MALDI-TOF/TOF Axima Performance, Shimadzu Biotech). Os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo. As amostras foram ressuspensas em água e misturadas na proporção de 1:1 com as matrizes SA (ácido sinapínico) 5 mg/mL ou 10 mg/mL ou HCCA (ácido α – ciano 4-hidroxicinâmico) 5mg/mL, dispersas em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila e 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. O calibrante utilizado foi ProteoMass Peptide and protein MALDI-MS Calibrante Kit, Sigma (MSCAL1-KT).

3.6. Ensaios eletrofisiológicos

Os ensaios eletrofisiológicos utilizaram-se da técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos em oócitos de *Xenopus laevis*, como descrito em Cerni (2014). Estes foram realizados sob a supervisão do professor Dr. Jan Tytgat, no Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da Universidade de Leuven (KU Leuven), Bélgica, de acordo com os padrões éticos para experimentação animal na pesquisa do país (Anexo 1).

A técnica *voltage-clamp* com dois microeletrodos em oócitos de *Xenopus laevis* é a mais amplamente utilizada e considerada importante ferramenta de análise eletrofisiológica das correntes iônicas que fluem por canais iônicos. Constitui um método simples, e um sistema de baixo custo e bem controlado para a expressão de proteínas heterólogas em grande quantidade. O tamanho dos oócitos em estágio V e VI considerado grande (aproximadamente 1,2 mm de diâmetro) e sua forma esférica facilita a inserção de eletrodos e bom controle da voltagem. Permite o estudo da fisiologia de canais iônicos em diversos campos, bem como de receptores e transportadores de membrana, como: suas propriedades de permeabilidade, farmacologia, investigação de mutações em subtipos de canais iônicos, investigação da relação estrutura-função de ligantes, modulação do canal por receptores e ligantes, screenings funcionais por genes codificadores de canais iônicos e transportadores (BIANCHI e DRISCOLL, 2006)

Em resumo, o método permite que o fluxo de íons através da membrana celular seja medido como uma corrente elétrica, enquanto o potencial da membrana é mantido sob controle experimental constante (para revisão (HILLE, 1978; HILLE, 2001; BIANCHI e DRISCOLL, 2006) .

3.6.1. Seleção, preparação e injeção do cRNA nos oócitos

As rãs da espécie *Xenopus laevis* são previamente selecionadas no *Aquatic Facilities* da KU Leuven (Fig. 5A) e submetidas à ovariectomia parcial para retirada dos oócitos a serem utilizados no experimento. As rãs foram anestesiadas em um recipiente contendo triclaína (1g/L), onde permaneceram submersas por aproximadamente 15 minutos (Fig. 5 B e C). Após a cirurgia de retirada dos oócitos (Fig. 5 D – G), os mesmos foram tratados com a solução de collagenase (2mg/mL) em solução ND96 - livre de cálcio em pH 7,5 durante 2 horas a 16°C, com o objetivo de serem defoliculados (Fig. 5H).

Figura 5. Procedimento cirúrgico para a obtenção dos oócitos de *Xenopus laevis*. (A) Aquatic Facilities- KU Leuven (B-C) Rã *Xenopus laevis* anestesiada (D-G) Cirurgia de ovariectomia parcial (H) Oócitos isolados em solução de colagenase 2 mg/mL Fotos obtidas durante o estágio no Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da KU Leuven. Créditos à Caroline M. Cremonez..

Os oócitos que se encontravam nos estágios V e VI da maturação foram selecionados (Fig. 6 A) e posteriormente injetados com cRNA correspondente às proteínas que formam os diferentes canais para potássio (Fig. 6B e C). 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 formando canais perfeitamente funcionais. A predominância de uma isoforma de canal iônico na membrana do oócito permite a medida eletrofisiológica especificamente para a isoforma desejada. A injeção dos oócitos foi realizada com o auxílio de um microinjetor (Fig. 6 D) (Drummond Scientific®, USA), sendo o volume injetado em cada oócito de 4 a 120 nL de cRNA e o tempo de espera para a expressão do canal foi de 1 a 8 dias (volume e tempo de expressão variam de acordo com o canal desejado a ser expresso). Os seguintes subtipos de canais para potássio foram testados: Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.2; Kv7.2; Kv10.1; hERG e *Shaker IR*. Os canais para sódio testados foram: Nav1.1; Nav1.2; Nav1.3; Nav1.4; Nav1.5; Nav1.6; Nav1.8; DmNav1.

Figura 6. Microinjeção dos oócitos de *Xenopus laevis* com cRNA correspondente ao canal desejado. (A) Oócitos selecionados em estágios de maturação V e VI (B) Microinjeção de cRNA (C) Oócitos enfileirados na câmara de microinjeção (D) Microinjetor de cRNA (E) Set up das medidas eletrofisiológicas. Fotos obtidas durante o estágio no Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da KU Leuven, créditos à Caroline M. Cremonez e Steve Peigneur.

3.6.2. 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* Camplex10 (Axon Instruments®, USA), responsável pela aquisição e armazenamento dos dados (Fig. 6 E). As micropipetas de vidro utilizadas foram produzidas através de capilares de vidro (borossilicato WPI 1B120-6) e estiradas em um estirador manual da WPI (Word Precision Instruments®). As micropipetas utilizadas possuíam resistência entre 0,5 a 1,5 MΩ, preenchidas com KCl 3M. A solução de banho e perfusão ND-96 consistiu em: NaCl 96 mM; KCl 2 mM; MgCl₂ 2 mM; HEPES 5 mM; CaCl₂ 1,8 mM; pH 7,4, ajustado com NaOH. As correntes de sódio e de potássio foram amostradas a 20 kHz e 10 kHz, respectivamente, e filtradas a 2 kHz para Navs, 1 kHz para hERG e 0,5 kHz para Kvs, usando um filtro *low-pass* Bessel de quatro pólos. Para a relação corrente-voltagem, os valores de I_{Na} normalizada (I_{Na}/I_{max}) foram plotados em função da voltagem, e a curva de ativação foi ajustada usando a equação de Boltzman: $I_{Na}/I_{max} = [1 - C/(1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k))]$, onde: I_{Na} é a corrente de sódio, I_{max} é o

valor máximo da corrente de sódio, C é a constante representando a fração não-ativada, $V_{1/2}$ é o ponto médio de voltagem de ativação, V_m é a voltagem da membrana, e k representa o *slope fator*. A avaliação da relação dose-resposta, os valores foram ajustados usando a equação de Hill: $y=100/[1 + (IC50/[toxina]^h)]$, onde y é a amplitude do efeito induzido pela toxina, $IC50$ é a concentração de toxina capaz de inibir 50% da corrente, $[toxina]$ é a concentração da toxina, e h é o coeficiente de Hill.

3.6.3. Protocolos

Os protocolos de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes de potássio e de sódio em oócitos de *Xenopus laevis* variam de acordo com a isoforma do canal analisado, como apresentados na figura 7.

Figura 7. Protocolo de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes de potássio ou sódio de oócitos de *Xenopus laevis*. (A) Kv1.1 – Kv1.6, Kv2.x, Kv3.x, Kv4.x e *Shaker* IR. (B) Kv protocolo da relação de corrente x voltagem. (C) hERG (D) Nav1.1-1.8 e DmNav1 (E) Nav protocolo da relação de corrente x voltagem.

3.7. Determinação da estrutura tridimensional por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A determinação da estrutura tridimensional da Ts11 foi realizada no Laboratório de Química Medicinal (Rega Institute for Medical Research) da Universidade de Leuven (KU Leuven), Bélgica, com a colaboração dos pesquisadores Dr. Mohitosh Maiti, Dra. Eveline Lescrinier e Dr. Piet Herdewijn.

Os espectros de NMR foram obtidos a partir de uma solução 1,7 mM (200 μ L, pH 3.5) do peptídeo (Ts11) enovelado em mistura de H₂O:D₂O (9:1) a 5°C em um espectrômetro Bruker Avance II de 600 MHz equipado com crioprobe TCI HCN Z-gradiente de 5 mm. Os espectros foram processados usando-se Topspin 2.1 (Bruker Biospin) e analisados através do programa CARA (versão 1.8.4) (KELLER, R., 2004).

Nos espectros unidimensional e bidimensional, o sinal da água foi suprimido usando excitação *sculpting* com gradiente (Hwang, T.L., Shaka, 1995). O NOESY bidimensional em H₂O (tempo de mistura 200 e 300 ms) foi adquirido com amplitude de varredura de 7210 Hz em ambas dimensões, 64 scans, 2048 pontos em t_2 e 1024 FIDs em t_1 .

Espectros bidimensionais de espectroscopia de correlação (2D-TOCSY) (SHAKA, A.J.; LEE, C.J. e PINES, A. 1988) em 90% de H₂O foram obtidos com a sequência DIPSI2 por mistura (tempo de mistura 80 ms). Um espectro de correlação dupla *quantum-filtered* (DQF-COSY) (Derome, A.E., Williamson, M.P., 1990) em H₂O foi adquirido usando-se excitação *sculpting* com gradientes por supressão de sinais da água com amplitude de varredura de 7210 Hz em ambas as dimensões, 64 scans, 2048 pontos em t_2 e 1024 FIDs em t_1 . No processamento dos espectros bidimensionais os dados foram apodizados por uma função quadrática do tipo *sine-bell* em ambas as dimensões. Os deslocamentos químicos de próton e carbono foram calibrados utilizando sinal DSS como referência (0.000ppm)

O espectro de correlação ¹H-¹³C HSQC foi adquirido com sensibilidade aumentada e seleção por coerência de gradiente para seleção de grupos CH alifáticos (J_{CH} = 135 Hz) usando 64 scans, 1024/2048 pontos de dados complexos e 12072/7210 Hz amplitude de varredura em t_1 e t_2 , respectivamente. Para a seleção dos grupos aromáticos, 170 Hz foi usado para J_{CH} juntamente com 32 scans, e 64/2048 pontos de dados complexos.

3.7.1. Restrições estruturais

As distâncias das restrições foram derivadas a partir do volume dos picos cruzados do NOESY adquirido com 200 ms de tempo de mistura. As distâncias interpróton estimadas foram derivadas usando a aproximação de pares de *spin* isolados, $r_{ij} = r_{\text{ref}} (v_{\text{ref}}/v_{ij})^{1/6}$, onde r_{ij} é a distância interpróton estimada, r_{ref} é a distância interna fixa referência, e v_{ref} e v_{ij} são os volumes de picos cruzados da NOE referência e o volume dos picos cruzados estimados. O volume de pico cruzado referência médiodos pares de próton de metileno foi usado como referência de volume, que corresponde à distância fixa de 1.8 Å. O erro experimental de $\pm 20\%$ no cálculo das distâncias interpróton foi usado como limites superior e inferior. As constantes de acoplamento $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{N}^{\alpha}}$ foram medidas a partir do espectro de próton unidimensional adquirido em H₂O e posteriormente convertido para as restrições diédricas, como descrito: $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{N}^{\alpha}} > 8$ Hz, $j = -120 \pm 30^\circ$; $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{N}^{\alpha}} < 6$ Hz; $j = -60 \pm 30^\circ$; $w = 180 \pm 30^\circ$ para definir a conformação trans X-pro, como confirmado pela forte interação NOE entre $\text{Ha}(n)$ e HD2, HD3 ($n+1$) Pro.

3.7.2. Cálculos estruturais

Todos os cálculos estruturais foram realizados utilizando o programa Xplor-NIH, versão 2.25 (SCHWIETERS et al., 2003). Um *set* de 100 estruturas foi gerado por dinâmica molecular dos ângulos de torção, começando por *extended strand* e usando apenas vínculos derivados do RMN, excluindo qualquer restrição dissulfeto. Após a dinâmica molecular dos ângulos de torção (STEIN, E.G.; RICE, L.M. e BRUNGER, A.T., 1997), a maior parte das estruturas foi convertida a estruturas similares com energias totais similares e sem violações de NOE e restrições diédricas.

Nas estruturas inicialmente derivadas, todas as pontes de dissulfeto puderam ser identificadas sem ambiguidade através da observação da proximidade das cadeias laterais dos oito resíduos de Cys. Um *round* de dinâmica molecular dos ângulos de torção foi realizado pela segunda vez, incluindo tanto as pontes dissulfeto quanto as restrições derivadas da RMN. Quinze estruturas de baixa energia obtidas no segundo *round* foram usadas para refinamento futuro durante o *round* de “dinâmica molecular sutil” em água explícita (SPRONK, C.A.E.M. et al., 2002). Uma caixa d’água foi construída e otimizada ao redor das estruturas selecionadas obtidas no segundo *round* do passo de dinâmica molecular de ângulos de torção. O estágio

final do refinamento começou com simulações de dinâmica molecular de 20 ps a temperatura constante de 300 K (20.000 passos de 0.001 ps) e seguido por 200 passos de minimização de energia por gradientes conjugados da estrutura média obtida a partir das últimas 10 ps de 20 ps simuladas. As estruturas foram analisadas utilizando PROCHECK (LASKOWSKI, R.A. et al., 1993). A representação visual da molécula foi criada usando o programa UCSF Chimera (versão 9.1)

3.8. Análise dos resultados

3.8.1. Análise in silico

A sequência amino-terminal das toxinas foi usada para comparação com sequências depositadas nos principais bancos de dados utilizando os programas FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos foram realizados no programa MultAlin (CORPET, 1988) e CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A figura referente ao alinhamento foi criada no programa ESPript (GOUET et al., 1999). Parâmetros físico-químicos teóricos foram preditos e analisados pelo programa ProtParam (www.expasy.org).

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção das frações XIIA, XIIB e XIII e identificação das toxinas isoladas

4.1.1. Isolamento das toxinas

Em 1989, Arantes et al. desenvolveram um método simplificado para fracionamento inicial da peçonha de *Tityus serrulatus* através de cromatografia em CM-celulose-52, onde a peçonha bruta solúvel (500 mg) era aplicada à coluna e eluída por gravidade com bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, iniciando-se um gradiente convexo de concentração de solução bicarbonato de amônio 0,05 M a 1,0 M após aproximadamente 300 mL de eluição. Desta forma eram obtidas 13 frações proteicas (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII), sendo que a XIII (Ts1), que representa aproximadamente 15% material eluído da peçonha, foi obtida com elevado grau de pureza. A Ts1 é a toxina mais abundante da peçonha de *T. serrulatus* e a de maior toxicidade. Esse método aboliu a filtração em gel de Sephadex, utilizada por vários autores, a qual resultava na eluição de uma mesma proteína em mais de uma fração, provavelmente pela interação entre as toxinas.

Cerni et al. (2014) descreveu o fracionamento do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* por uma modificação do método descrito por Arantes et al. (1989), no qual a quantidade de peçonha foi reduzida e a mesma foi submetida a uma filtração em membrana 0,22 µm, e adaptado para sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC). Para isso, foi utilizada uma coluna de CM-celulose-52 1.6 x 100 cm. A coluna foi conectada ao sistema FPLC, equilibrada por 10 horas com uma solução de bicarbonato de amônio 0,05 M (fase móvel A), com a vazão contínua de 0,5 mL/min.

O método descrito por Cerni et al. (2014), e utilizado nesse estudo (Fig. 8), demonstrou ser mais eficiente que o de Arantes et al. (1989), por ser mais rápido, apresentar maior resolução dos componentes e excelente reprodutibilidade. Com a adaptação ao sistema FPLC foi possível eliminar as medidas de absorvâncias manuais bem como a reduzir o tempo de corrida. Neste procedimento a cromatografia se estende por 24 horas, enquanto que no método de Arantes (1989) são necessários 3 dias para ser realizada (desde o equilíbrio até o reequilíbrio da coluna).

Figura 8. Perfil cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em coluna de CM-Celulose-52. O VTs (100 mg) foi filtrado em membrana 0,22 μm e fracionado em coluna de troca catiônica CM-Celulose-52 usando sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10*. A coluna foi equilibrada com bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,7. Vazão 0,5 mL/min. A linha roxa representa gradiente linear de fase móvel B (NH_4HCO_3 , 0,6 mol/L, pH 7,7). Volume coletado por tubo: 4 mL.

Após o fracionamento inicial da peçonha de *Tityus serrulatus*, as frações XIIA, XIIB e XIII foram submetidas a uma segunda etapa cromatográfica em coluna de fase reversa com o objetivo de obter toxinas com alto grau de pureza

A fração XIIA foi, portanto, submetida ao fracionamento em 3 diferentes colunas de fase reversa: C4 (Vydac - 4,6 mm x 25 cm, 5 μ m), C8 (Phenomenex Aeris widepore - 4,6 mm x 25 cm, 3,6 μ m), e C18 (C18 Vydac -4,6 mm x 25 cm, 5 μ m), para a comparação dos perfis de fracionamento e padronização do método (Fig. 9). Foi observado que houve melhor separação das toxinas nas cromatografias realizadas nas colunas C4 e C8, quando comparadas ao fracionamento das toxinas em coluna C18.

A coluna que mostrou melhor perfil de eluição dos componentes da fração foi a C8, não só por possuir um grupamento apolar de cadeia com tamanho intermediário, mas também pelo tamanho das partículas (3,6 μ m para a C8 e 5 μ m para a C4 e C18). O método e a coluna foram escolhidos para a realização dos fracionamentos subsequentes. A partir da fração XIIA foram obtidas 17 subfrações denominadas de XIIA-1 a XIIA-17 (Fig. 10 A)

Figura 9. Perfis cromatográficos da fração XIIIa em colunas de fase reversa. (A) C4 (4,6 mm x 25 cm, com partículas de 5 μ m, Vydac), **(B) C8** (4,6 mm x 25 cm, com partículas de 3,6 μ m, Aeris widepore- Phenomenex), e **(C) C18** (4,6 mm x 25 cm, com partículas de 5 μ m, Vydac). O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna analítica, previamente equilibrada com TFA 0,1% (V/V; fase móvel A), sob vazão de 1mL/min. A amostra (4 mg/mL) foi inicialmente eluída com fase móvel A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (fase móvel B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha pontilhada. Volume coletado por tubo: 0,3 mL

Figura 10. (A) Perfil cromatográfico da fração XIIA em coluna de fase reversa C8. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* em coluna analítica C8 (4,6 mm x 25 cm, com partículas de 3,6 μ m, Aeris widepore- Phenomenex), previamente equilibrada com TFA 0,1% (v/v; fase móvel A), sob vazão de 1mL/min. A amostra (4mg/mL) foi inicialmente eluída com fase móvel A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (fase móvel B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha verde. Volume coletado por tubo: 0,3 mL. **(B) Perfil cromatográfico da XIIA-2 (Ts11) em coluna de fase reversa C18,** e **(C) Perfil cromatográfico da XIIA-5 (Ts9) em coluna de fase reversa C18.** Os fracionamentos foram realizados em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna analítica em coluna analítica C18 (2,1 mm x 25 cm, com partículas de 5 μ m, Vydac), previamente equilibrada com TFA 0,1% (v/v; fase móvel A), sob vazão de 0,5 mL/min. As amostras foram inicialmente eluídas com fase móvel A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (fase móvel B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pelas linha cinza e vermelha, respectivamente. Volume coletado por tubo: 0,3 mL.

As subfrações obtidas a partir da fração XIIA foram posteriormente submetidas à espectrometria de massa e/ou sequenciamento amino-terminal (Tabela 1) para identificação das toxinas isoladas. As subfrações XIIA-2 e XIIA-5 foram identificados como sendo a Ts11 e Ts9, respectivamente.

As toxinas de interesse foram submetidas ainda a uma terceira etapa cromatográfica em outra coluna analítica C18 (Vydac, 2,1 mm x 25 cm, com partículas de 5 μ m), recomendada para o isolamento de peptídeos menores e com maior poder de resolução, devido ao seu menor diâmetro, garantir elevado teor de pureza da toxina isolada.

Foram obtidas a partir da fração XIIA as toxinas Ts11 (Fig. 10B) e Ts9 (Fig. 10C); a partir da fração XIIB, a toxina Ts1-G (Fig. 11B); e da fração XIII, a toxina Ts1 (Fig. 12).

O trabalho com a fração XIIB iniciado pelo grupo foi descrito por Coelho e colaboradores (COELHO et al., 2014), no qual foi identificado nessa fração uma isoforma precursora da toxina majoritária da peçonha, a Ts1. A isoforma precursora da Ts1 isolada neste trabalho foi denominada Ts1-G, sendo a mesma correspondente aos 61 resíduos de aminoácidos da Ts1, conservando em sua estrutura o resíduo Gly na sua região C-terminal.

A Ts1, o principal componente tóxico da peçonha de *Tityus serrulatus*, é uma β -toxina composta por um peptídeo com 61 aminoácidos e pI teórico de 8,67 (COLOGNA et al., 2009; BORDON; COLOGNA e ARANTES, 2015). A partir da clonagem de cDNA, foi revelado que o precursor da Ts1, com 84 resíduos de aminoácidos, apresenta um peptídeo sinal de 20 resíduos, 61 resíduos da toxina madura e um segmento extra de Gly-Lys-Lys na região C-terminal. Assim, para a formação da toxina madura são necessárias transformações pós-traducionais, que consistem na remoção do peptídeo sinal por uma peptidase, além da clivagem dos resíduos Lys por endopeptidase e uma carboxipeptidase (MERKLER, 1994) e a conversão do peptídeo final contendo a Gly por uma enzima α -amidante, resultando em um peptídeo contendo um grupo NH_2^+ , doado pela Glycina, ligado ao resíduo de Cys, último aminoácido da Ts1 madura (BRADBURY; FINNIE e SMYTH, 1982; MARTIN-EAUCLAIRE et al., 1992; MERKLER, 1994).

O isolamento desta toxina nos permitiu conduzir um estudo sobre a importância da amidação C-terminal na Ts1, utilizando a técnica de Patch Clamp (COELHO et al., 2014).

Tem sido demonstrado que a amidação C-terminal das toxinas escorpiônicas desempenha papel significativo na toxicidade e/ou na estabilidade contra exopeptidases. A carga adicional conferida pela amidação C-terminal parece ser necessária para a atividade biológica máxima das toxinas. O resíduo Gly é um doador de grupo amida para a região C-terminal da toxina madura, e é requerido para a ação da enzima peptidilglicina monooxigenase α -amidante (BENKHADIR et al., 2004).

No trabalho publicado pelo grupo foi mostrado que a Ts1-G tem sua atividade diminuída quando comparada a Ts1 madura (COELHO et al., 2014). Com o objetivo de estender e aprofundar o estudo sobre a importância da amidação C-terminal, o método de fracionamento da fração XIIB foi modificado, com o intuito de realizar isolamento da Ts1-G sem a necessidade de uma terceira etapa cromatográfica. Para isso a coluna usada, C18 Vydac (2,1 mm), foi escolhida visando o isolamento de peptídeos, visto possuir menor diâmetro que a coluna C18 Shimadzu (4,6 mm) usada no trabalho anterior do grupo, sabendo-se que quanto menor o diâmetro da coluna melhor é a resolução dos picos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). O gradiente de eluição também foi modificado, sendo alongado entre 36%

a 38% de fase móvel B, faixa de eluição da Ts1-G (37% de fase móvel B, dados observados durante o processo de refinamento do método). Com este protocolo foram obtidos 15 subfrações, e a fração XIIB-10 foi identificada como a Ts1-G (Fig. 11A). Para assegurar a pureza do precursor da Ts1 para caracterização funcional posterior, o mesmo foi submetido à terceira etapa cromatográfica, sob as mesmas condições que a anterior (Fig. 11B). Ainda é possível observar a presença de um pequeno pico antes da Ts1-G.

Figura 11. (A) Perfil cromatográfico da fração XIIB (10 µg) e (B) da XIIB-10 (Ts1-G, 45 µg) em coluna de fase reversa C18. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna analítica C18 (2,1 mm x 25 cm, com partículas de 5 µm, Vydac), equilibrada com TFA 0,1% (v/v), sob vazão de 0,5 mL/min. A amostra foi inicialmente eluída com fase móvel A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (fase móvel B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linhas verde e azul, respectivamente. Volume coletado por tubo: 0,5 mL.

A figura 12 representa o isolamento da toxina Ts1 madura a partir da fração XIII obtida da peçonha de *Tityus serrulatus*. A Ts1 é a toxina majoritária da peçonha do escorpião, representando aproximadamente 15% da peçonha solúvel (PESSINI et al., 2001; CERNI et al., 2014). Ela é eluída pura na fração XIII da primeira etapa cromatográfica.

Figura 12. Perfil cromatográfico da fração XIII (100µg) em coluna de fase reversa C18. O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna analítica C18 peptídeo (2,1 mm x 25 cm, com partículas de 5 µm, Vydac), equilibrada com TFA 0,1% (v/v), sob vazão de 0,5 mL/min. A amostra foi inicialmente eluída com fase móvel A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (fase móvel B – Acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha roxa. Volume coletado por tubo: 0,5 mL.

4.2. Análise proteômica das frações XIIA e XIIB da peçonha de *Tityus serrulatus*

4.2.1. Análise das frações XIIA e XIIB por espectrometria de massas

A peçonha de *Tityus serrulatus* é uma mistura complexa de moléculas, em sua maioria peptídeos neurotóxicos, que atuam como um arsenal de defesa e captura de presas do animal, se ligando principalmente a canais iônicos. Nos últimos anos, diversos estudos foram publicados a respeito da diversidade de toxinas quem compõem a peçonha. O desenvolvimento de estratégias metodológicas para a análise proteômica de peçonhas e venenos animais em busca de compostos bioativos, tem crescido dentro da toxinologia. Pequenos peptídeos foram por muito tempo negligenciados pelos toxinologistas, devido ao fato de aparecerem em baixas concentrações nas peçonhas animais, e dada as dificuldades inerentes das técnicas analíticas convencionais para isolá-los em quantidades suficientes para as caracterizações estruturais e funcionais (PIMENTA e DE LIMA, 2005). Cerca de 380 componentes foram identificados através da combinação de técnicas espectrometria de massas na peçonha de Ts, sendo eles, predominantemente, toxinas com ação em canais para sódio (moléculas de 6500 a 7500 Da), em menor proporção, toxinas com ação em canais para potássio (2500 a 5000 Da) (RATES et al., 2008).

As frações XIIA e XIIB obtidas da cromatografia da peçonha em coluna de CM-Celulose-52 foram submetidas à análise por espectrometria de massas. Este estudo foi utilizado como referência para comparar a massa molecular da fração submetido à espectrometria de massas com as toxinas de *Tityus serrulatus* previamente isoladas e disponíveis na literatura (para revisão ver BORDON, K.F.C.; COLOGNA, C.T. e ARANTES, E.C., 2015; COLOGNA et al., 2009). É importante salientar que os dados de massa molecular apresentados nesta revisão foram baseados apenas na sequência de aminoácidos (soma da massa molecular de todos os aminoácidos) sem considerar a presença de pontes dissulfeto (redução de 2 Da por cada ponte presente na proteína).

Podem ser observadas pequenas diferenças entre as massas moleculares teóricas das toxinas identificadas nos espectros, justificadas principalmente pelo modo como é conduzida a análise, modo linear (considera a massa média das toxinas) ou modo refletido (considera a massa monoisotópica da toxina, massa da molécula contendo apenas carbono 12), calibração dos equipamentos, ou devido a alterações na cadeia lateral de alguns aminoácidos da toxina

(hidroxilação da prolina, amidação C-terminal, ácido piroglutâmico N-terminal, gama-carboxilação do ácido glutâmico, bromação triptofano, glicosilações, oxidações, perda de água, etc.). Vale lembrar que os dados de espectrometria de massas são para o íon da proteína ou peptídeos (protonada), portanto apresenta massa molecular com 1 Da (MH^+) a mais que a molécula não ionizada (M). Adicionalmente, deve-se considerar que a determinação de massas por MALDI-TOF MS é de alta precisão, principalmente quando se usa calibração interna (padrões de massas moleculares e a amostra são aplicados no mesmo spot), mas nós empregamos calibração externa (padrões e amostras são aplicados em spots distintos), onde o erro pode ser significativamente maior.

A figura 13A mostra o espectro de massas da fração XIIA analisada em matriz HCCA (ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico) em modo refletido (massa monoisotópica), mais apropriado para peptídeos até 5 kDa. Neste espectro o pico de massa 3940,9 Da corresponde à massa monoisotópica da Ts7, cuja massa molecular teórica é 3938,9 Da (dados considerando a soma da massa dos aminoácidos da sequência e a formação de 3 pontes dissulfeto, ou seja, a massa monoisotópica oxidada), com uma diferença de 2 Da. Observa-se também a presença da Ts11 em sua forma oxidada 2936,2 (massa monoisotópica oxidada teórica 2936,1 Da, 4 pontes dissulfeto).

A figura 13B mostra a fração XIIA analisada em matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) em modo linear, próprios para determinação de peptídeos de massa molecular até 10 kDa. Nesse espectro pode ser identificado um pico predominante de 3957,1 Da, que corresponde à Ts7 (massa molecular teórica monoisotópica oxidada de 3938,9 Da), com uma diferença de 18,1 Da. Deve-se considerar que o íon é protonado e o modo de análise é o linear, ou seja, a massa observada corresponde à massa média de todos os isótopos da toxina e não à monoisotópica (obtida no modo refletido). Este íon é realmente a Ts7 e a diferença de massa entre o dado observado no modo linear (3957,12 Da; Fig. 13B) e o dado de massa obtido pelo modo refletido (3940,9 Da; Fig. 13A), podem ser justificadas pelo ensaio ser realizado no modo linear (massa média), pelos erros inerentes do ensaio (calibração externa, interferência da matriz usada), ou alterações químicas de algum aminoácido, como oxidação da metionina ou triptofano (+16 Da).

No espectro de massas da fração XIIA no modo linear (Fig. 13B) também foram identificadas a Ts9 (massa monoisotópica oxidada teórica de 3775,7 Da, 3 pontes dissulfeto) e a Ts6 (massa monoisotópica oxidada teórica de 4502,8 Da, 4 pontes dissulfeto) pelos picos de massa 3778,4 e 4508,7 Da (baixa intensidade e não destacado na figura, mas detectável com a ampliação do espectro), respectivamente. As diferenças de massa de 2,7 e 5,9 Da quando

comparados com a massa molecular teórica, são justificadas pela carga adicional do íon H^+ (+1 Da) e pelo ensaio ser realizado no modo linear (massa média) com calibração externa. Infelizmente suas massas não foram identificadas no modo refletido.

Figura 13. Espectros de massas da fraçãoXIIA, obtidos por espectrometria de massas MALDI-TOF (MALDI-TOF/TOF Ultraflex II, Bruker) nos modos refletido (A) e linear (B). Para o ensaio no modo refletido usou-se matriz HCCA (200 a 5.000 Da) e para o modo linear a matriz DHB (3.000 a 12.000 Da).

O espectro de massas da fração XIIB obtido com matriz DHB em modo linear (Fig. 14) mostra a presença da toxina Ts1 (massa molecular monoisotópica oxidada teórica 6878,1 Da), correspondente ao íon de massa 6883,4 Da, e da Ts1-G, identificado no espectro com massa 6940,9 Da (faixa do espectro ampliado e inserido na própria figura 14). Segundo Cologna (2009), o precursor íntegro da Ts1 possui massa molecular de 9382,2 Da, contendo o peptídeo sinal e 3 aminoácidos a mais na região carboxi-terminal, Gly, Lys e Lys (GKK) (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 1992). Nosso grupo isolou e sequenciou um componente precursor da Ts1, que foi denominado Ts1-G, por possui ainda a Gly C-terminal intacta (COELHO et al., 2014). A sequência obtida corresponde ao da toxina Ts1 sem o peptídeo sinal e apenas com a Gly na região C-terminal (massa da toxina madura somada a 57,0 Da da glicina A diferença de massa molecular entre o pico correspondente a massa da Ts1 6883,4 Da e da Ts1-G 6940,9 Da é de exatamente 57,4 Da, correspondente a massa da Gly C-terminal e confirmando a identidade da toxina.

As toxinas Ts9 e Ts6 também são identificadas no espectro obtido com matriz DHB em modo linear, com íon de massa média de 3780,3 Da correspondente a Ts9 (massa monoisotópica oxidada teórica de 3775,7 Da) com diferença de 4,6 Da, e íon de massa média de 4506,7 Da correspondente a Ts6 (massa monoisotópica oxidada teórica de 4502,8 Da) e

diferença de 3,9 Da. Estas diferenças de massa quando comparados com a massa molecular teórica, são justificadas pelos mesmos fatores citados anteriormente.

Neste espectro da fração XIIB também foram detectados os íons de massas 3600,9 e 4156,8 que não correspondem à massa de nenhuma das toxinas já caracterizadas desta peçonha e constituem, portanto, novas moléculas a serem estudadas.

Figura 14. Espectro de massas da fração XIIB. MALDI-TOF/TOF Ultraflex II em matriz DHB, modo linear.

4.2.2. Identificação dos componentes das frações XIIA e XIIB por espectrometria de massas e/ou sequenciamento N-terminal

As tabelas 1 e 2 mostram as massas obtidas a partir dos espectros das subfrações isoladas a partir da fração XIIA e XIIB, respectivamente. Os componentes encontrados em ambas as frações variam entre 900 a 7700 Da, e muitos deles ainda não foram identificados ou descritos na literatura (para revisão ver BORDON, K.F.C; COLOGNA, C.T. e ARANTES, E.C., 2015).

Foram encontradas 26 massas diferentes na análise proteômica da fração XIIA (Tabela 1), sendo, cinco delas toxinas ativas em canais para sódio (Ts1 com metionina oxidada, Ts1-G, Ts3, Ts3-KS e Ts5), nove delas bloqueadoras de canais para potássio (Ts6, Ts7, Ts9, Ts11, Ts15, Ts15 fragmento (-EW), Ts16 e Ts16 isoforma (-K+R), e 12 componentes com massas ainda não identificadas (destacados em amarelo). Dentre os componentes encontrados, apenas dois possuem massa menor que 1000 Da, dois com massa até 3000, 12 com massa entre 3000 e 5000 Da, e 10 com massa acima de 5000 Da. A maior parte das massas não identificadas estão entre 900 e 3715 Da (apenas duas com massa acima de 5 kDa). Na fração XIIA-13 foi detectado apenas um íon com massa de 7250,7 Da e o sequenciamento dos primeiros 29 resíduos de aminoácidos mostrou 100% de identidade com a Ts5 (massa média oxidada teórica de 7192,0 Da). A diferença entre a massa experimental do íon e a massa teórica da Ts5 é de 58,7 Da. Considerando que a massa molecular da glicina é de 57,0 Da e que a massa experimental conta com 1 Da a mais pela ionização, dá espaço para especulação de que o peptídeo detectado nesta fração XIIA-13 possa vir a ser uma isoforma precursora da Ts5, contendo um resíduo de glicina adicional na região C-terminal, por não ter sofrido ainda a ação da enzima α -amidante (última modificação pós-traducional usual em toxinas de escorpião). a exemplo da Ts1-G. Se faz necessário um sequenciamento amino-terminal completo para confirmar a identidade desta possível isoforma.

A análise proteômica da fração XIIB (Tabela 2) nos mostrou uma maior quantidade de componentes detectados, 48. Das massas encontradas, seis são ativas em canais para sódio (Ts1, Ts1 com metionina/triptofano oxidada, Ts1-G, Ts1-G com metionina/triptofano oxidada, Ts3 e Ts5), sete bloqueadoras de canais para potássio (Ts6, Ts9, Ts11, Ts15 e dois fragmentos de Ts β), um peptídeo potencializador de bradicinina (Ts10), um fragmento de peptídeo rico em prolina (PAPE), e 33 componentes ainda não identificados. Dentre os componentes encontrados nesta fração: quatro possuem massa menor que 1000 Da, 18 entre

1000-3000 Da, 16 entre 3000 e 5000 Da, e 12 acima de 5000 Da. A maior parte das massas não identificadas estão entre 900 e 4500 Da (apenas quatro com massa acima de 5 kDa).

Vale salientar que a quantidade de massas apresentadas na tabela é superior as descritas acima, pois muitas das toxinas aparecem em diversos subfrações em uma mesma fração, devido a proximidade destes subfrações e pelo fato de que muitas delas coeluírem (são altamente carregadas, e interagem fortemente entre si e com a resina da coluna).

Esta análise proteômica parcial da peçonha de *Tityus serrulatus* nos mostra a enormidade de toxinas ainda a ser identificadas e descritas (totalizando 45 componentes não identificados apenas nestas duas frações). A identificação destes componentes é de grande importância para o melhor entendimento do envenenamento e possível uso dessas toxinas como ferramentas de estudo na toxinologia.

Tabela 1. Identificação das subfrações obtidas a partir da fração XIA.

FRAÇÃO	MODO LINEAR Massa Média	MODO REFLETIDO Massa Monoisotópica	IDENTIDADE MASSA OXIDADA ¹ Monoisotópica/Média	SEQUÊNCIA N- TERMINAL
XIA-1	2938.2	2938.2	Ts11 (2936/2938 Da)*	
XIA-2	2938.9	2938.2	Ts11 (2936/2938 Da)*	<KPKCGLCRYRC...> 100%
XIA-3	2938.5 3956.9	2938.2 3957.9	Ts11 (2936/2938 Da) Ts15 (3953/3956 Da)	
XIA-4	2937.4 3599.0 3779.1 3943.5	2938.2 3599.6 3941.9	Ts11 (2936/2938 Da) Ts9 (3776/3778 Da) Ts7 (3939/3942 Da)	
XIA-5	3598.6 3780.8	3600.6 3778.7	Ts9 (3776/3778 Da)	<VVIGQRCYRSPDCY SACKKLVGKATGKC TNGRC> 100%
XIA-6	3332.7 3782.1	2938.2 3303.5 3331.5	Ts16 isof.(3328/3331 Da) Ts9 (3776/3778 Da) Ts11 (2936/2938 Da) Ts16 (3300/3303 Da)	
XIA-7	3332.8 3946.3	3941.9	Ts16 isof. (3328/3331 Da) Ts7 (3939/3942 Da)	
XIA-8	3932.7 ²		Ts7 (3939/3942 Da) *	<VPINAKCRGSPECLP KCKEAIGKAAGKCM NGKCKCYP> 100%
XIA-9	3635.3 ³		Ts15 Frag. (-EW) (3637/3640 Da)	<GKFGKCKPNICAKT CQTEKGKGMGYCNK TECVCS> 100%
XIA-10	4499.7 ²		Ts6 (4503/4506 Da)*	<WCSTRLDLACGAS RECYDPCFKAFGRA HGKCMNNKCRCYT> 100%
XIA-11	3296.0 4523.7	3295.4	Ts6 (4503/4506Da)+18H ₂ O	

XIIA-12	7431.0 7441,4 ² 7425,3 ²	994.0 3715.1 7430.1	Ts3-KS (7442/7447Da)-18H ₂ O	<KKDGYPVEY...> 100%
XIIA-13	7250.7 ²		Ts5(7187/7192 Da)	<KKDGYPVEGDNCA FACFGYDNAYCDKL CK... > 100%
XIIA-14 p1	7270.5 7316.4 7476.7	7270.0 7310.3	Ts3 (7227/ 7232 Da) Ts3-KS (7442/7447 Da)	<KKDGYPVEYDNCA YICWNYDNAYCDKL CKDKKADSGYCYW VHILCYCYGLPD...> 100%
XIIA-14 p2	7242.8 7444.2	7447.1		
XIIA-15	6906.2	2938.2 3941.9	Ts1 Oxid (6882+16=6901 Da) Ts11 (2936/2938 Da) Ts7 (3939/3942 Da)	
XIIA-16 P1	6984.7 7242.7	909.1 1082.1	Ts3 (7227/ 7232 Da) Ts1-G (6935/6940 Da)*	<KEGYLMDHEGCKL SCFIRPSGYCGREC... >100%
XIIA-16 P2	6942.6	6940.5		
XIIA- 17	6932.3 7248.4	-	Ts1-G (6935/6940 Da)	

* Elevado teor de pureza.

¹ Massa predita pelo software SequenceEditor.

² matriz HCCA, modo linear, determinado no laboratório de química de proteínas, FMRP, Ribeirão Preto, SP- Brasil.

³ matriz SA, modo linear, determinado no laboratório de química de proteínas, FMRP, Ribeirão Preto, SP- Brasil.

Destaques em amarelo: componentes não identificados

Tabela 2. Identificação das subfrações isoladas a partir da fração XIIB.

FRAÇÃO	MODO LINEAR Massa média	MODO REFLETIDO Massa monoisotópica	IDENTIDADE MASSA OXIDADA ¹ Monoisotópica/Média
XIIB- 1	2411.4 2937.2	2414.0 2938.1	Ts11 (2936/2938 Da)
XIIB- 2	3597.2 3778.7	1890.4 3599.6 3778.7	Ts9 (3776/3778 Da)
XIIB- 3	3612.0 3779.4	1889.9 3779.7	Ts9 (3776/3778 Da)
XIIB- 4	3779.00 4045.7 4157.4 4502.1 7632.0	1286.7 1414.8 3778.6	Ts9 (3776/3778 Da) Ts6(4503/4506 Da) Tsβ frag. (1414.78 Da)
XIIB- 5	3784.0 3950.5 4048.6 4160.5 4507.0 5023.9 7639.7	1286.8 1413.9 4156.2	Ts9 (3776/3778 Da) Ts6 (4503/4506 Da) Ts15 (3953/3956 Da) Tsβ frag.(1413.95 Da)
XIIB- 6	4047.6 4159.0 4314.5 4525.5 4541.3	1172.8 1286.8 1413.9	Ts6 (4503/4506 Da) Tsβ frag. (1413.92 Da) PAPE frag. (1291.82 Da)
XIIB- 7	3779.1 6996.4 7246.7	937.6 1821.2 3619.7 3778.9 3958.0 6942.9 7246.0	Ts9 (3776/3778 Da) Ts2 (6985/6990 Da) Tsβ frag.(1823.0-1828.2 Da) Ts15 (3953/3956 Da) Ts1-G (6935/6940 Da) Ts3 (7227/ 7232 Da)
XIIB- 8	6163.0 6902.4 7079.9	1609.1 3894.7 3941.9	Ts1-Oxid (6882+16=6901Da) Ts10 (1603 Da) Ts7 (3939/3942 Da)

XIIB- 9	6890.0 6903.3	994.0	Ts1 (6878/6882 Da) Ts1-Oxid (6882+16=6901Da) Ts10 (1603 Da) Ts11 (2936/2938 Da) Ts9 (3776/3778 Da)
		1608.0	
		2938.2	
		3441.6	
		3522.6	
		3778.8	
		6883.7	
XIIB- 10 P1	2938.6	6900.5	Ts11 (2936/2938 Da)
		909.1	
		1060.2	
		1680.8	
XIIB- 10 P2	6947.4 6962.7 6974.6	2938.3	Ts1-G (6935/6940 Da) Ts1-G Oxid. (+ 16Da = 6963 Da)
		6939.5	
XIIB- 11	3326.1 3779.5 3959.0 4157.2	909.8	Ts16 isoforma (-K+R, 3329/3332) Ts9 (3776/3778 Da) Ts15 (3953/3956 Da)
		1082.1	
		3327.6	
		3959.1	
XIIB- 12	3780.2 6950.6	937.7	Ts9 (3776/3778 Da)
		994.0	
		3778.9	
XIIB- 13	3779.6 4157.5	909.1	Ts9 (3776/3778 Da)
		1051.8	
		1165.8	
		3778.9	
XIIB- 14	1109.2 1138.2 1325.8 2937.7 3779.5 3960.9 4156.9	4156.2	Ts11 (2936/2938 Da) Ts9 (3776/3778 Da) Ts15 (3953/3956 Da)
		909.1	
		1082.1	
		1098.1	
XIIB- 15	1114.5	921.5	

¹ Massa predita pelo software SequenceEditor.

Destaques em amarelo: componentes não identificados

4.3. Caracterização das toxinas isoladas

4.3.1. Ts11

A Ts11 foi primeiramente isolada pelo grupo de Pimenta e colaboradores em 2003, e denominada TsPep1. Juntamente com ela foram isoladas mais duas toxinas, TsPep2 e TsPep3 (atualmente denominada por Ts12 e Ts13 por Cologna e cols., 2009) e suas massas variam de 2900 a 3000 Da e apresentam estruturas primárias semelhantes a da Ts11. A Ts11 apresenta igualmente identidade de 58,62% com a Ts12 e Ts13, as únicas toxinas com a qual apresenta identidade maior que 50%. Baseados em evidência de tamanho e identidade, a Ts11, Ts12 e Ts13 foram classificadas como KTx, entretanto nenhum outro estudo de caracterização funcional confirmou este dado. Os dados preliminares confirmam que a toxina é de fato uma bloqueadora de canais para potássio, uma KTx, e que a mesma não possui ação em canais para sódio, como é esperado para uma KTx.

A Ts11 despertou interesse devido a sua estrutura única entre as demais toxinas isoladas do escorpião *Tityus serrulatus*, na qual apresenta 29 resíduos estabilizados por 4 pontes dissulfeto, na qual duas Cys encontram-se nas posições 11 e 12. Juntamente com a Ts12 e Ts13, a Ts11 é considerada a toxina derivada de peçonha de escorpião estruturalmente mais constrita conhecida até hoje, devido a sua curta cadeia de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto (PIMENTA et al., 2003).

Esta toxina é encontrada principalmente na fração XIIA da peçonha de *T. serrulatus*, representando aproximadamente 17% desta fração. A recuperação da Ts11 a partir da peçonha bruta é de aproximadamente 0,2 %.

4.3.1.1. Caracterização funcional da Ts11 em canais iônicos

A toxina foi testada em 13 diferentes canais para potássio (Fig. 15 A), sendo eles Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.2; Kv7.2; Kv10.1; hERG e Shaker IR. A mesma apresentou atividade para Kv1.2, Kv1.3, Kv4.2, Kv10.1, hERG, e Shaker IR com 25%, 27%, 25%, 15%, 12%, e 10% de bloqueio, respectivamente. Foram utilizadas no mínimo 3 células ($n \geq 3$) para obtenção da percentagem média de bloqueio para cada canal e confirmação da ação da toxina.

Foi realizada para a Ts11 a determinação da curva de relação corrente x voltagem, a fim de avaliar as características do bloqueio e da IC_{50} através da curva de dose-reposta. Ambos os testes foram realizados no canal Kv1.3, por se apresentar um dos mais sensíveis a ação da toxina (Fig. 15 B e C).

A relação corrente x voltagem não revelou modulação significativa da dependência de voltagem de ativação do canal Kv1.3 na concentração testada de 5 μ M (Fig. 15B), o que indica que esta toxina altera as correntes de potássio por bloqueio físico do poro do canal e não por modular a dependência de voltagem do mesmo. A IC_{50} calculada a partir da curva de dose resposta foi de $17,1 \pm 3,3 \mu$ M (Fig. 15C).

Figura 15. (A) Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio (Kv) na ausência ou presença da Ts11 (3 μ M) **(B)** Relação Corrente x Voltagem em Kv1.3 **(C)** Curva de dose-resposta em Kv1.3. Os canais foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços com asterisco indicam a presença da toxina, e os círculos pretos e círculos vazios indicam a ausência ou presença de toxina, respectivamente. Foram utilizadas pelo menos 3 células para obtenção das porcentagens média de bloqueio e confirmação da ação da toxina para cada canal.

A Ts11 (3 μM) apresentou cerca de 15% de bloqueio de canais hERG, e este canal também foi selecionado a fim de avaliar os efeitos da toxina em maiores concentrações. A toxina foi testada a 500 nM, 1 μM , 5 μM e 10 μM , mostrando atividade bloqueadora de 3,7%, 11,7%, 16,5% e 21,7%, respectivamente (Fig. 16 A, B, C, e D, respectivamente). Existe uma subfamília de KTx que agrupa toxinas com atividade específica para canais hERG, a subfamília γ -KTx (brevemente mencionadas na introdução), e, assim como a Ts11, também possuem em sua estrutura secundária cisteínas vicinais, justificando a avaliação mais detalhada da Ts11 nos canais hERG. O objetivo desta avaliação foi determinar se a mesma poderia ser classificada como γ -KTx. No entanto, a fraca atividade nestes canais, bem como a sua estrutura desfavorecem a classificação da toxina dentro desta subfamília.

A toxina também foi testada em 5 subtipos de canais para sódio: Nav1.1, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e DmNav1 sobre os quais não apresentou atividade (Fig. 17)

Figura 16. Traçados representativos das correntes iônicas em canais hERG na ausência ou presença da Ts11 (A) 500 nM (B) 1 μM (C) 5 μM (D) 10 μM . Os canais foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços com asterisco indicam a presença da toxina, respectivamente. Foram utilizadas pelo menos 3 células para obtenção das porcentagens média de bloqueio.

Figura 17. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para sódio (Nav) na ausência ou presença da Ts11 (1 μM). Os canais Nav foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços com asterisco indicam a presença da toxina. Utilizou-se $n \geq 3$ para cada concentração em todos os ensaios.

4.3.1.2. Caracterização estrutural da Ts11 por Ressonância Magnética Nuclear

A determinação da estrutura terciária da toxina Ts11 por ressonância magnética nuclear foi realizada através da colaboração com Dr. Mohitosh Maiti, Prof. Eveline Lescrinier, e Prof. Piet Herdewijn, do Laboratory of Medicinal Chemistry, Rega Institute for Medical Research, Dept. of Pharmaceutical & Pharmacological Sciences, KU Leuven (Leuven, Belgium).

A estrutura está depositada no RCSB Protein Data Bank (RCSB-ID code rcsb103995 e PDB-ID code 2msf) e BMRB Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB accession number: 25122), bem como as coordenadas para as 15 estruturas, restrições de RMN e seus deslocamentos químicos.

Em um trabalho anterior realizado por Pimenta et al (2003), foi relatado que o método químico de mapeamento das pontes dissulfeto da Ts11 não foi bem-sucedido, em virtude à existência de dois resíduos Cys vizinhos e de sua estrutura muito compacta (quatro ligações dissulfeto em um peptídeo de 29 resíduos de aminoácidos). Estas ligações dissulfeto tornam esta estrutura tão compacta que impede o acesso de reagentes. Nosso estudo não só visava elucidar a estrutura tridimensional desta toxina, como também determinar a conectividade destas quatro ligações dissulfeto da Ts11.

A análise espectral mostra a formação de um *set* único de ressonância para a Ts11, indicando que a mesma adota apenas um tipo de forma estrutural em solução. Os ensaios de ressonância foram realizados conforme os procedimentos padrões descritos por Wüthrich e colaboradores (1986). As atribuições da sequência completa específicas de prótons foram realizadas através da análise bidimensional (2D) dos espectros homo-nuclear (DQF-COSY, TOCSY e NOESY). Inicialmente, as ressonâncias dos sistemas de spins individuais de NH e Ha (exceto Pro) foram identificados pela análise da região *fingerprint* dos espectros de DQF-COSY e TOCSY, e as ressonâncias restantes dos sistemas de spin foram identificadas seguindo a “TOCSY-tower”. A sequência específica foi elucidada através da ligação dos sistemas de spin individuais via *sequential inter-residue Han-HN(n+1) cross-peaks* da região *fingerprint* do espectro NOESY. A elucidação de carbono parcial foi realizada usando espectros de ^1H - ^{13}C HSQC, que posteriormente confirmaram a maior parte dos prótons homo-nucleares e evidenciaram as cadeias laterais de outros resíduos que não haviam sido determinados pelo espectro homo-nuclear 2D. Os prótons de metileno geminados não foram determinados estereo-especificamente, e as restrições de distância NOE envolvendo esses

prótons foram utilizadas de forma ambígua durante o cálculo estrutura no programa Xplor-NIH.

A Figura 18 mostra os alcances NOEs médio e longo observados que foram utilizados para a determinação da estrutura, $^3J_{\text{HNH}\alpha}$, e o índice de descolamento químico (CSI) juntamente com a sequência de aminoácidos da toxina Ts11. O CSI e os valores de acoplamento $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ sugerem a provável ausência de qualquer α -hélice e/ou fita β na estrutura da Ts11.

Figura 18. Sequência e pontes dissulfeto (obtidas pela determinação da estrutura por RMN) da Ts11 juntamente com o sumário de médio e longo alcance de NOEs, acoplamentos $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ ($^3J_{\alpha N}$) e índice de deslocamentos químicos (CSI) para os prótons $\text{H}\alpha$. ● $^3J_{\text{HNH}\alpha} < 6$ Hz, ○ $^3J_{\text{HNH}\alpha} = 6-8$ Hz, ○ $^3J_{\text{HNH}\alpha} > 8$ Hz. Os quadrados preenchidos abaixo e acima da linha horizontal representam os valores de CSI de +1 e -1, respectivamente.

Figura 19 mostra as representações estruturais estereoscópica do conjunto de 15 estruturas sobrepostas (Fig. 19 A) e a estrutura de menor energia mais próxima da média (Fig. 19 B) da toxina Ts11 do escorpião *Tityus serrulatus*. As estruturas do peptídeo estão bem definidas com *backbone* e átomos pesados RMSD de 0.44 e 1.03, respectivamente, ao longo

de toda cadeia. A avaliação da estrutura pelo PROCHECK demonstra que todas as estruturas resultantes não apresentam maus contatos não ligados e a maior parte do *backbone* angular dihédrico encontra-se dentro das regiões permitidas do gráfico de Ramachandran (94,6% dos resíduos estão dentro das regiões permitidas do gráfico). Dados resultantes da análise estatística detalhada dos parâmetros relacionados à determinação da estrutura da Ts11 são apresentados na Tabela 3.

Figura 19. Estrutura de RMN da toxina Ts11 em solução. (A) Visão estérica de 15 estruturas sobrepostas. Backbone N, CA, C'. (B) Visualização da estrutura em fita. As pontes dissulfeto estão representadas em amarelo. (C) Representação das pontes dissulfeto ICK da toxina Ts11. Cys4-Cys12, Cys7-Cys28, Cys11-Cys21, e Cys16-Cys26

Tabela 3. Resultados da análise estatística dos parâmetros obtidos da determinação da estrutura por RMN da toxina Ts11 para um conjunto de 15 estruturas.

PARÂMETROS ANALISADOS	DADOS OBTIDOS*
Total de restrições de distância NOE	224
Intra resíduos	69
Sequencial ($ i-j =1$)	84
Alcance médio ($2 \leq i-j \leq 4$)	29
Alcance longo ($ i-j \geq 5$)	42
Restrições ângulo diedro	13 ($\varphi=12$, $\omega_{X-Pro}=1$)
RMSD da estrutura média (Å)	
Átomos do <i>backbone</i> (N, C ^α , C')	0.44 ± 0.08
Todos os átomos pesados	1.03 ± 0.08
Desvios RMS da geometria covalente idealizada	
Ligação (Å)	0.000007 ± 0.000000
Ângulo (°)	2.918 ± 0.110
Impróprio (°)	2.907 ± 0.311
Análise Ramachandran (%)	
Resíduos em regiões favoráveis	43.8
Resíduos em regiões permitidas adicionais	42.5
Resíduos em regiões generosamente permitidas	8.3
Resíduos em regiões não permitidas	5.4 (C4 & N23)

*Valores médios $\pm$ desvio padrão

Um olhar mais atento para as estruturas (Fig. 19 A e B) da Ts11 revela que o esqueleto do peptídeo adota ICK *scaffold* (Inhibitory Cystein Knot) muito compacto, como tendo três loops e um β -turn (Val22-Ala25) na porção C-terminal. A estrutura é reforçada por quatro ligações dissulfeto Cys4-Cys12, Cys7-Cys28, Cys11-Cys21, e Cys16-Cys26 (Fig 19 C). Os cinco resíduos de glicina estão posicionados no β -turn e nas alças. Os resíduos finais da porção N- terminal até Cys 4, contém dois resíduos Arg positivamente carregados, que se posicionam salientes como uma cauda de parafuso do restante da compacta região C-terminal. Esta extremidade saliente pode ter algum envolvimento na ligação a receptor, uma vez que é facilmente acessível e armada com cadeias laterais carregadas positivamente, Lys1, Lys3, Arg8 e ArgR10. Embora a topologia molecular ICK-*like* contendo 3 a 4 ligações dissulfeto tem em comum o α - β *scaffold*, visto em estruturas previamente relatadas para toxinas de escorpião, *Conus* e aranhas, (PIMENTA et al., 2003; SAUCEDO et al., 2012), a Ts11 traz de novo e especial em estrutura tridimensional a conectividade dissulfeto ICK. Além disso, o seu esqueleto peptídico não possui as unidades estruturais secundárias do tipo α hélices e / ou folhas β , como comumente observado nas demais toxinas já descritas.

Várias subfamílias (α - β - γ - κ - δ e λ -KTx) de toxinas da peçonha de escorpião são conhecidas até o presente momento, e o número de toxinas pertencentes a estas subfamílias continuam a crescer. O alinhamento da Ts11 com diversas toxinas seletivas para canais para potássio dependentes de voltagem de todas as subfamílias atualmente conhecidas (α - β - γ - κ - δ e λ -KTx), com a ϕ -Liotoxin-Lw1a e com as clorotoxinas nos mostra identidade inferior a 50% com as demais classes de KTx (Fig. 20).

Dentro da grande família das KTxs, algumas subfamílias apresentam maior similaridade com as características estruturais e/ou funcionais da Ts11. As α -KTx, por sua atividade biológica como bloqueadora de canais para potássio voltagem dependentes, γ -KTxs que possuem cisteínas vicinais e atividade bloqueadora de canais hERG, e as λ -KTx que são o único grupo com estrutura do tipo ICK contendo cisteínas vicinais e que bloqueiam Kvs. Adicionalmente, a Ts11 foi alinhada com as demais subfamílias (β - κ - δ - KTxs), bem como com clorotoxinas (que também possuem cisteínas vicinais) e com a ϕ -Liotoxin-Lw1a, uma toxina com um tipo estrutural único DDH (disulfide direct β -hairpin), que é considerada a estrutura ancestral do motivo ICK.

A figura 20 representa o alinhamento da Ts11 com exemplares de todos os grupos acima citados, mostrando apenas a porcentagem máxima de identidade entre a Ts11 com as demais toxinas de cada grupo.

Uma análise estrutural e funcional preliminar de cada subfamília nos mostra maior compatibilidade da Ts11 com as λ -KTx (estrutura ICK e ativa em Kvs), entretanto, o alinhamento nos apresenta a baixa identidade entre a Ts11 e os exemplares desta subfamília (abaixo de 22%). A causa provável desta baixa identidade estaria relacionada com a estrutura das toxinas analisadas: a Ts11 possui 4 pontes dissulfeto e estrutura única sem elementos de estrutura clássicos- α -hélice e fita- β , e as toxinas do grupo das λ -KTx possuem estrutura terciária contendo α -hélice e/ou fita- β e apenas 3 pontes dissulfeto.

A comparação da Ts11 com as γ -KTXs mostrou porcentagem máxima de identidade de 48%. Entretanto, a Ts11 não poderia ser agrupada nesta subfamília, visto que exerce baixa atividade em hERG e possui estrutura terciária completamente diferente das demais toxinas do grupo.

Figura 20. Alinhamento amino-terminal e suas respectivas identidades entre a Ts11 com representantes das classes α - β - γ - κ - δ e λ -KTx, com a ϕ -Liotoxin-Lw1a e clorotoxinas. Alinhamento realizado com auxílio do programa MultAlin e ClustalW, e imagem criada no programa ESPript.

A novidade do nosso trabalho não é a descoberta de mais um membro dessas subfamílias, mas a evidência de uma nova subfamília, com destaque para um tipo de ICK *scaffold*, que não inclui a presença das estruturas secundárias clássicas (alfa-hélice e fita-beta), que com o melhor do nosso conhecimento para as toxinas presentes em peçonha de escorpião, não foi descrita até agora.

Além disso, mostramos que a Ts11 interage com os canais para potássio dependentes da voltagem, sendo os canais Kv1.3 os mais sensíveis ($IC_{50} = 17,1 \mu M \pm 3,3$). Dos mecanismos de interação toxina-Kvs atualmente conhecidos, podemos especular duas possibilidades de interação da Ts11 com Kvs: 1) Díade funcional, K e Y/F, dispostos a uma distância de aproximadamente 7Å; 2) Basic- Ring, presença de resíduos positivamente carregados ao redor da díade, que seriam os responsáveis por criar contatos com resíduos importantes no poro do canal. A Ts11 possui apenas um dos elementos da díade funcional - uma Lys na posição 20, considerada o resíduo da díade responsável por ocluir o poro do canal (MOUHAT et al., 2004; RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004; YU et al., 2005), porém, a toxina possui um N-terminal com quatro resíduos positivamente carregados, que provavelmente formariam um *Basic Ring*. Para confirmar esta hipótese, seriam necessários mais estudos estruturais para elucidar a interação toxina-canal. A figura 21 mostra a Ts11 representada de diferentes formas destacando estes resíduos considerados importantes para sua ação em Kvs.

Figura 21. Estrutura tridimensional da toxina Ts11 do escorpião *Tityus serrulatus*. (A) Ts11 backbone (B) Pareamento das pontes dissulfeto da Ts11 (C-D) Resíduos positivamente carregados presentes na Ts11. Os resíduos foram representados em *sticks* e em esferas, respectivamente. As lisinas em azul claro e argininas em azul mais escuro, os possíveis elementos do *Basic Ring*, e a lisina na posição 20, elemento da díade funcional, representado em rosa. Imagem criada usando o software Pymol.

Em um estudo conduzido por outro grupo de pesquisa colaborador, entretanto com dados não publicados até o momento, evidencia a atividade da Ts12, uma toxina homóloga (59% de identidade e pareamento de cisteínas idêntico ao da Ts11) presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, também mostra atividade bloqueadora em canais para potássio voltagem dependentes. Estes resultados vêm de encontro ao da Ts11 e nos confirma a existência de uma família de toxinas que interagem com os canais para potássio, e que pode agora ser expandida com outra e nova subfamília.

Com base nesses resultados funcionais e estruturais, bem como uma extensa comparação de sequências primárias entre a Ts11 e outros membros das α - β - γ - κ - δ e λ -KTx, podemos sugerir que a Ts11 seria o primeiro membro de uma nova subfamília, que designamos como ε -KTX, seguindo a nomenclatura existente de α - β - γ - κ - δ e λ -KTx. Portanto, a Ts11 foi denominada como ε -KTX 1.1.

4.3.2. Ts9

A Ts9 originalmente denominada Tsk (Ts Kappa; Neurotoxin Ts-kappa; 1TSK) foi primeiramente isolada e caracterizada por Legros e colaboradores (1996) se mostrando um potente ligante de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância (SK), sensíveis à apamina. Ela é capaz de competir eficientemente com a apamina pela ligações nesses canais em sinaptosomas de ratos. É classificada como uma α -KTx4.2, e possui 35 aminoácidos estabilizados por 3 pontes dissulfeto (LEGROS et al., 1996; BLANC et al., 1997; LECOMTE et al., 1999; COLOGNA et al., 2009).

Sua estrutura foi determinada por 2D-RMN (BLANC et al., 1997) e mostra a presença de uma pequena α -hélice e três β -fitas antiparalelas. A Ts9 é uma toxina bastante interessante, embora sua conformação CS α/β seja conservada, como é por toda família das α -KTx, sua organização pode conter diversas especificidades.

A Ts9 é encontrada predominantemente na fração XIIA, onde representa 3,3% da fração. Sua recuperação na peçonha bruta é por volta de 0,036%.

Figura 22. Estrutura tridimensional da Ts9. PDB 1TSK. Imagem criada usando o software Pymol.

4.3.2.1. Caracterização funcional da Ts9 em canais para potássio dependentes de voltagem

A Ts9 é a primeira toxina completamente caracterizada com três fitas beta antiparalelas com atividade em canais para potássio ativados por Ca^{2+} (SK). Apesar de sua arquitetura ser similar às de toxinas que atuam em canais para potássio sensíveis a voltagem (Kv), como a *charybdotoxin*, sua ação farmacológica e especificidade descrita em literatura é

relacionada com toxinas escorpiônicas que contêm duas fitas beta em sua estrutura, como a *scyllatoxin* ou a P05 (toxinas isoladas dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (BLANC et al., 1997; LECOMTE et al., 1999).

Além desta característica estrutural-farmacológica interessante que a Ts9 possui, sua estrutura secundária apresenta elementos estruturais característicos de toxinas que atuam em Kv e hERG, como: Lys 27 da díade funcional e hERG-*hot spot* (RODRIGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2004; ABDEL-MOTTALEB et al., 2008), o que fortemente sugere que esta toxina também possa agir em canais para potássio voltagem dependentes (Fig. 23).

Figura 23. Alinhamento da Ts9 com ChTX e KTX-1 que atuam em Kvs, Pi4 e ScyTx que atuam em canais SK, e com uma α -KTx que atua em canais hERG, AmmTX3. Os resíduos da díade funcional estão destacados em verde; os resíduos do basic ring em azul, e o hot-spot destacado em vermelho. Referência Uniprot: ChTX (P13487), KTX-1 (P24662); ScyTx (P16341) e AmmTX3 (P60208).

A Ts9 foi testada em 13 subtipos de canais Kvs (Fig. 24), na concentração de 100 nM. Na dose utilizada, a Ts9 não apresenta atividade bloqueadora destes canais. Adicionalmente, os canais Kv1.3 e hERG foram testados na concentração de 1 μ M (Fig. 25), e observou-se fraca atividade bloqueadora, entre 10 e 12% de bloqueio, respectivamente.

Apesar da toxina Ts9 possuir estrutura tridimensional mais parecida com toxinas que atuam em Kvs, conter resíduos que sugerem sua atividade também em Kvs, nossos resultados diferem dos previamente publicados (LEGROS et al., 1996; BLANC et al., 1997; LECOMTE et al., 1999).

Ts9 100 nM

Figura 24. Traçados representativos das correntes iônicas em diferentes subtipos de canais para potássio (Kv) na ausência ou presença da Ts9 (100 nM). Os canais Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv7.2; hERG e Shaker IR foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços com asterisco indicam a presença da toxina. Foram utilizadas pelo menos 3 células para obtenção das porcentagens média de bloqueio e confirmação da ação da toxina para cada canal.

Figura 25. Traçados representativos das correntes iônicas em Kv1.3 e hERG na ausência ou presença da Ts9 (1 μ M). Os canais foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Os traços pretos indicam o controle, ou seja, ausência da toxina e os traços com asterisco indicam a presença da toxina. Utilizou-se $n \geq 3$ para cada concentração em todos os ensaios.

4.3.3. *Ts1 x Ts1-G*

A Ts1, o principal componente tóxico da peçonha de *Tityus serrulatus*, é uma β -toxina composta por um peptídeo com 61 aminoácidos (TOLEDO e NEVES, 1976; BARHANIN et al., 1984; ARANTES et al., 1989, BECERRIL et al., 1993), e é o componente majoritário da peçonha de *Tityus serrulatus*, representando 15% da peçonha bruta (COLOGNA et al., 2009; PESSINI et al., 2001). Onze resíduos são positivamente carregados (Arg, Lys); cinco são carregados negativamente (Asp, Glu), resultando uma carga +6 para a toxina; e há oito resíduos aromáticos (Trp, Tyr). Martin-Eauclaire (1992), determinaram a sequência de nucleotídeos da toxina Ts1 a partir da clonagem de seu cDNA. A análise da sequência dos nucleotídeos revelou que esta toxina é sintetizada como um precursor de 84 resíduos de aminoácidos, sendo um peptídeo sinal de 20 resíduos, 61 resíduos da toxina madura e um segmento extra de Gly-Lys-Lys na região C-terminal. Assim, a formação da Ts1 necessita transformações pós-traducionais, que consistem na remoção do peptídeo sinal por uma peptidase, além da clivagem dos resíduos Lys por carboxipeptidases e a conversão do resíduo de Gly, realizada por uma enzima α -amidante, deixando o grupo NH_2^+ ligado ao grupo carboxi do resíduo de Cys, último aminoácido da Ts1 madura (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 1992; MERKLER, 1994).

A toxina nomeada Ts1-G isolada neste trabalho, apresentou-se como um peptídeo correspondente aos 61 resíduos de aminoácidos da Ts1 madura, mais o resíduo de Gly na região C-terminal. Portanto, a toxina é uma isoforma precursora da toxina madura Ts1, que já sofreu três transformações pós-traducionais: a remoção do peptídeo sinal e a remoção dos dois resíduos de Lys terminal. Assim, a isoforma apresenta carga mais negativa na região C-terminal ($-\text{COO}^-$) em relação à Ts1, conferida pela presença da glicina, enquanto a Ts1 madura apresenta carga menos negativa na região C-terminal, em razão da amidação do resíduo Cys ($-\text{CONH}_2$). A Ts1-G pode ser encontrada tanto na fração XIIA como na XIIB, sendo predominante na fração XIIB onde representa por volta de 18% da fração. Sua recuperação na peçonha bruta é de aproximadamente 0,4%.

4.3.3.1. *Caracterização funcional da Ts1-G em canais para sódio dependentes de voltagem*

Tem sido demonstrado que a amidação C-terminal das toxinas escorpiônicas desempenha papel significativo na toxicidade e/ou na estabilidade contra exopeptidases. A

carga adicional conferida pela amidação parece ser necessária para a atividade biológica máxima das toxinas. O resíduo Gly é um doador de grupo amida para a região C-terminal da toxina madura, e é requerido para a ação da enzima peptidilglicina monooxigenase α -amidante (BENKHADIR et al., 2004).

Em ensaio eletrofisiológico, realizado pelo nosso grupo (COELHO et al., 2014), por meio da técnica de *Patch Clamp*, demonstrou que o precursor isolado apresenta menor alteração das correntes de sódio e menor afinidade pelos canais para sódio de células do gânglio da raiz dorsal de rato, quando comparado com a Ts1. As determinações das concentrações plasmáticas de glicose e creatina quinase também revelaram que a Ts1 é ligeiramente mais tóxica que seu precursor. Isso nos leva a concluir que as transformações pós-traducionais sofridas pela proteína são relevantes para lhe conferir maior afinidade pelos canais para sódio sensíveis à voltagem e, conseqüentemente, maior toxicidade.

Os estudos sobre a importância da amidação C-terminal para toxinas escorpiônicas começaram em 1989, com Bougis e colaboradores, estudo no qual chegaram à conclusão de que as estruturas dos precursores de toxinas passavam por um processo de modificações pós-traducionais. Estudo no qual foram isolados precursores e toxinas maduras do escorpião *Androctonus australis*. Os precursores possuíam peptídeo sinal na porção N-terminal e resíduo Gly na porção C-terminal. A partir do sequenciamento dos precursores foi possível identificar que os mesmos continham sítios para clivagem proteolítica e sítio para α -amidação. Na análise da toxina nativa AaH-II, resultante de um dos precursores, além da remoção do peptídeo sinal, ocorria também a remoção de dois resíduos Gly-Arg C-terminais juntamente com a α -amidação do resíduo de His final.

O trabalho de Auguste et al. (1990) reporta a relação estrutura-função da *Leiurotoxin I* (*scyllatoxin*), um polipetideo de 31 aminoácidos da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, bem como as propriedades de ligação e similaridade da ação fisiológica entre a toxina e a apamina. A *Leiurotoxin I* nativa, contém sua porção C-terminal amidada, dado confirmado por sequenciamento. O estudo confirma a importância da amidação da região C-terminal desta toxina, pois compara a capacidade de inibir a ligação da 125 I-apamina de um análogo sintético da *scyllatoxin* com a porção C-terminal amidada (CONH₂-*scyllatoxin*), com um análogo da *scyllatoxin* sem esta amidação (COOH-*scyllatoxin*), em preparação de membranas de cérebro de ratos, que resultou em menor afinidade para o análogo da toxina não amidada (COOH-*scyllatoxin*).

Benkhadir et al. (2004) isola a α -toxina mais tóxica BotIII da peçonha do escorpião *Buthus occitanus tunetanus*, que difere em apenas 3 aminoácidos da anteriormente citada

AahII do escorpião *Androctonus australis*. Ambas as toxinas nativas possuem amidação C-terminal. Os autores expressaram recombinantes com C-terminal carboxilados para ambas as toxinas (rBotIII-OH e rAahII-OH), que mostraram valores de DL₅₀ de 4 e 10 vezes maiores que os das toxinas nativas, respectivamente, confirmando a perda de atividade das toxinas recombinantes pela ausência da amidação C-terminal (BENKHADIR et al., 2004).

O isolamento desta toxina Ts1-G, ainda com sua porção C-terminal não amidada e contendo uma Gly adicional, nos permitiu conduzir um estudo comparativo entre a toxina madura Ts1 e sua isoforma precursora, a Ts1-G.

A figura 26 (A-H) mostra o perfil eletrofisiológico em diferentes subtipos de canais para sódio voltagem dependente, tanto de mamíferos (Nav1.1- Nav1.8), quanto de inseto (DmNav1.1). Ambas as toxinas foram testadas na concentração de 100 nM.

Os resultados nos mostram a ação de β -toxina, exercida pela Ts1 nos canais Nav1.3 (Fig. 26 C), Nav1.4 (Fig. 26 D), Nav1.6 (Fig. 26 F) e DmNav1.1 (Fig. 26 H). Há um deslocamento para a esquerda na curva que representa a relação corrente x voltagem dos canais indicados, e redução das correntes de sódio (exceto para DmNav1, na dose testada). Nestes canais, a Ts1 sendo uma β -toxina, se liga ao sítio 4 do canal para sódio, diminuindo o limiar de voltagem de ativação para potenciais mais negativos, provocando assim potenciais de ação espontâneos e contínuos (CESTELE e CATTERALL, 2000b; RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2005; COLOGNA et al., 2009; QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013). A Ts1 ainda exerce atividade em Nav1.5, reduzindo a corrente de sódio em 60% (100 nM), porém sem modular a curva de ativação do canal.

Em uma caracterização funcional aprofundada, Peigneur e colaboradores (2015) elucidaram a atividade da Ts1 em diferentes subtipos de canais Nav de mamíferos (Nav1.1-1.8) e de inseto (DmNav1), no qual demonstrou atividade moduladora de ativação para Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4 e Nav1.6, nos quais Nav1.4 e Nav1.6 apresentaram significativa redução das correntes de sódio. Atua como inibidor em Nav1.5, reduzindo as correntes de sódio, sem exercer qualquer efeito sobre a ativação ou inativação destes canais. E em Nav de insetos, mostrou-se um modulador da voltagem-dependência do tipo *bell-shape* (PEIGNEUR et al., 2015).

A isoforma isolada Ts1-G, na concentração testada (100 nM), não apresentou qualquer atividade moduladora de ativação ou redução de correntes de sódio nos canais testados. Este resultado não é categórico para afirmar que a falta de amidação C-terminal torna a toxina inativa, entretanto mostra a grande importância que esta modificação pós-traducional desempenha na atividade da toxina madura. Estudos com concentrações superiores deverão

ser conduzidos pelo grupo para confirmar esta informação, uma vez que a publicação de COELHO et al. (2014) há uma diminuição de atividade e não perda total da atividade, como mostra os resultados mais recentes.

Figura 26. Comparação eletrofisiológica entre a Ts1 e sua isoforma precursora Ts1-G (100 nM) em canais (A) Nav1.1, (B) Nav1.2, (C) Nav1.3, (D) Nav1.4, (E) Nav1.5, (F) Nav1.6, (G) Nav1.8, e (H) DmNav1. Os canais foram expressos em oócitos de *Xenopus laevis*. Relação corrente x voltagem em vermelho para Ts1 e em azul para Ts1-G, controles em preto. Os traços de corrente em pretos indicam o controle, ausência da toxina, e os traços com asterisco indicam a presença da toxina. Utilizou-se $n \geq 3$ para cada toxina em todos os ensaios.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

Referências

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOTTALEB, Y., et al. A common "hot spot" confers hERG blockade activity to alpha-scorpion toxins affecting K⁺ channels. **Biochem Pharmacol** v.76,n.(6),p. 805-815, 2008.
- ALMEIDA, F.M., et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1041-1045, 2002.
- ALVARENGA, E. R., et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics** v.2,p. 210-220, 2012.
- ALVES, R. S., et al. Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*). **Toxicon** v.74,p. 19-26, 2013.
- AMARAL, C. F. S.;N. A. REZENDE. Acidentes por escorpiões. **Arq Bras Med** v.4,p. 216, 1990.
- ARANTES, E. C., et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v. 8, p. 916, 1989.
- ARANTES, E. C., et al. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochim Biophys Acta** v.1199,n.(1),p. 69-75, 1994.
- ARNON, T., et al. BjalphaIT: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool. **Insect Biochem Mol Biol** v.35,n.(3),p. 187-195, 2005.
- AUGUSTE, P. et al. Leiurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ - Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 4753-4759, 1990.
- BARHANING, J. et al. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the Tityus gamma toxin receptor associated with the gating component of the Na⁺ channel from rat brain. **The Embo Journal**, Eynsham, v. 2, p.915-920, 1983.
- BARHANING, J. et al. Tityus gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. **Pflügers Archiv**, Berlin, v. 400, p. 22-27, 1984.
- BECERRIL, B. et al. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. **FEBS**, Berlin, v. 335, p. 6-8, 1993.

- BENKHADIR, K., et al. Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. **Peptides** v.25,n.(2),p. 151-161, 2004.
- BIANCHI, L.;M. DRISCOLL. Heterologous expression of C. elegans ion channels in *Xenopus* oocytes. **WormBook**,p. 1-16, 2006.
- BERTAZZI, D.T. Isolamento e caracterização bioquímica dos componentes da peçonha de *Tityus serrulatus* com ação no sistema complemento. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2007
- BLANC, E., et al. Solution structure of TsKapa, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca(2+)-activated K⁺ channels. **Proteins** v.29,n.(3),p. 359-369, 1997.
- BLAUSTEIN, M.P., et al. Polypeptide toxins from the venoms of old world and new world scorpion preferentially block different potassium channels. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 40, p. 932-942, 1991.
- BORDON, K.C.F.; VARANDA, W. A.; ARANTES, E.C. Isolation and primary structure of a new scorpion toxin from *Tityus serrulatus* venom, 2009 [Online: <http://www.uniprot.org/uniprot/P86271>]
- BORDON, K. C. F.;C. T. COLOGNA;E. C. ARANTES. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*.In: P. GOPALAKRISHNAKONE;L. D. POSSANI;E. F. SCHWARTZ;R. C. RODRÍGUEZ DE LA VEGA. **Scorpion Venoms**. Netherlands, Springer, p. 411-438, 2015.
- BOSMANS, F.;M. F. MARTIN-EAUCLAIRE;J. TYTGAT. Differential effects of five 'classical' scorpion beta-toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. **Toxicol Appl Pharmacol** v.218,n.(1),p. 45-51, 2007.
- BOSMANS, F.;J. TYTGAT. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. **Toxicon** v.49,n.(2),p. 142-158, 2007.
- BOUGIS, P.E.; ROCHAT, H.; SMITH, L.A. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins: Structures of precursors, processing out comes, and expression of a functional recombinant toxin II. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, p. 19259–19265, 1989.
- BRADBURY, A. F.;M. D. FINNIE;D. G. SMYTH. Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. **Nature** v.298,n.(5875),p. 686-688, 1982.
- CARMO, A. O., et al. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon** v.90,p. 45-55, 2014.

- CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem** v.64,p. 493-531, 1995.
- CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron** v.26,n.(1),p. 13-25, 2000.
- CATTERALL, W. A., et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon** v.49,n.(2),p. 124-141, 2007.
- CECCHINI, A.L., et al. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTx-V on neurotransmitter uptake in vitro. Toxicology and applied pharmacology, New York, v. 217, 196-203, 2006
- CERNI, F. A., et al. Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K(+) channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. **Toxins (Basel)** v.6,n.(3),p. 892-913, 2014.
- CESTELE, S.;W. A. CATTERALL. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie** v.82,n.(9-10),p. 883-892, 2000a.
- CESTELE, S.;W. A. CATTERALL. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie** v.82,n.(9-10),p. 883-892, 2000b.
- CHAVEZ-OLORTEGUI C, MOLINA F, GRANIER C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. Molecular immunology, Oxford, v. 38, p. 867-76, 2002.
- CHEN, Z., et al. Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins. **PLoS One** v.8,n.(4),p. e60201, 2013.
- COELHO, V. A., et al. Functional and structural study comparing the C-terminal amidated beta-neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon** v.83,p. 15-21, 2014.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p, 2006.
- COLOGNA, C. T., et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein Pept Lett** v.16,n.(8),p. 920-932, 2009.
- COLOGNA, C. T., et al. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new alpha-KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon** v.58,n.(1),p. 54-61, 2011.

- COLOGNA, C. T., et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. **FEBS J** v.279,n.(8),p. 1495-1504, 2012.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v.16, n.22, p. 10881-10890, 1988.
- COURAUD, F., et al. Two types a scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel, **Toxicon** v.40,p. 19, 1982.
- COUTINHO NETTO , J. **Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina**, Universidade de São Paulo, 1975.
- DE LIMA, M. E.;M. F. MARTIN-EAUCCLAIRE. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello). **Journal of Toxicology** v.14, 1995.
- DIEGO-GARCIA, E., et al. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cell Mol Life Sci** v.65,n.(1),p. od venoms. Berlin, Springer-Verlag, p. 379-394, 1978.
- DINIZ, C.R.; GONÇALVES,J.M. Some chemical and pharmacological properties of Brazilian scorpion venoms In: **Venoms.**, BUCKLEY, E.E.; PORGES, N.(Eds). Washington; A.A.A.S. Press. p. 131-144, 1956
- DINIZ, C. R. Chemical and pharmacological aspects of Tytiinae venoms. **In Artropod venoms**. Berlin, Springer-Verlag, p.379-394, 1978.
- DOYLE, D. A., et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science** v.280,n.(5360),p. 69-77, 1998.
- EDMAN, P.;G. BEGG. A protein sequenator. **Europ. J. Biochem**, v.1,p. 91, 1967.
- FERNANDES, V. M., et al. Dopamine release evoked by beta scorpion toxin, tityus gamma, in prefrontal cortical slices is mediated by intracellular calcium stores. **Cell Mol Neurobiol** v.24,n.(6),p. 757-767, 2004.
- FONTECILLA-CAMPS, J. C.;C. HABERSETZER-ROCHAT;H. ROCHAT. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.85,n.(20),p. 7443-7447, 1988.
- GAO, B., et al. Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. **Biosci Rep** v.33,n.(3), 2013.

- GARCIA-CALVO, M., et al. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. **J Biol Chem** v.268,n.(25),p. 18866-18874, 1993.
- GARCIA, M. L., et al. Use of toxins to study potassium channels. **J Bioenerg Biomembr** v.23,n.(4),p. 615-646, 1991.
- GOLDIN, A. L. Resurgence of sodium channel research. **Annu Rev Physiol** v.63,p. 871-894, 2001.
- GOMEZ, M.V., DINIZ, C.R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 33, p. 899-902, 1966.
- GORDON, D.;M. GUREVITZ. The selectivity of scorpion α -toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. **Toxicon** v.41,p. 128, 2003.
- GORDON, D., et al. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **Toxicon** v.17,p. 159, 1998.
- GOUET, P.; COURCELLE, E. ESPript: multiple sequence alignments in postscript. **Bioinformatics**, Oxford, v. 15, p. 305-308, 1999.
- GUREVITZ, M., et al. Sodium channel modifiers from scorpion venom: structure-activity relationship, mode of action and application. **Toxicon** v.36,n.(11),p. 1671-1682, 1998.
- GUTMAN, G. A., et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Rev** v.57,n.(4),p. 473-508, 2005.
- HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophys J** v.22,n.(2),p. 283-294, 1978.
- HILLE, B. Introduction- Ohm's law is central **Ion channels of excitable membranes**. Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc, p.1-22, 2001.
- HOCKADAY, D. C., et al. Imaging glioma extent with ¹³¹I-TM-601. **J Nucl Med** v.46,n.(4),p. 580-586, 2005.
- ISBISTER, G. K.;H. S. BAWASKAR. Scorpion envenomation. **N Engl J Med** v.371,n.(5),p. 457-463, 2014.
- ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon** v.33,n.(7),p. 825-858, 1995.

- JOVER, E., et al. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. **Biochemistry** v.19,n.(3),p. 463-467, 1980.
- KELLER, R. **The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial**. 1st ed. Cantina, Goldau, 2004
- KIM, J. B. Channelopathies. **Korean J Pediatr** v.57,n.(1),p. 1-18, 2014.
- KIRSCH, G. E., et al. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. **J Gen Physiol** v.93,n.(1),p. 67-83, 1989.
- LASKOWSKI, R.A., et al. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **J. Appl. Crystallogr.**, 26, 283-291, 1993.
- LECOMTE, C., et al. Chemical synthesis and structure-activity relationships of Ts kappa, a novel scorpion toxin acting on apamin-sensitive SK channel. **J Pept Res** v.54,n.(5),p. 369-376, 1999.
- LEE, S. H., et al. Cloning and functional characterization of a putative sodium channel auxiliary subunit gene from the house fly (*Musca domestica*). **Insect Biochem Mol Biol** v.30,n.(6),p. 479-487, 2000.
- LEGROS, C., et al. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. **FEBS Lett** v.390,n.(1),p. 81-84, 1996.
- LEWIS, R. J.;M. L. GARCIA. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov** v.2,n.(10),p. 790-802, 2003.
- LOUGHNEY, K.;R. KREBER;B. GANETZKY. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell** v.58,n.(6),p. 1143-1154, 1989.
- LOURENÇO, W. R. Diversity and endemism in Tropical versus Template scorpion communities. **Biogeographica** v.70,p. 155-160, 1994.
- LUTZ, A. M., O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica** v.III,p. 26, 1922.
- MACHADO, R. J., et al. Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*. **Toxicon** v.101,p. 11-18, 2015.
- MARANGONI, S., et al. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Journal of Protein Chemistry**, New York, 9, 595-601, 1990.

- MARCUSSI, S.;E. C. ARANTES;A. M. SOARES. Envenenamento. **Escorpiões- Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. Ribeirão Preto, Brazil, Funpec, p.33-70, 2011.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. **FEBS Lett** v.302,n.(3),p. 220-222, 1992.
- MASSENSINI, A. R., et al. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. **Neuropharmacology** v.37,n.(3),p. 289-297, 1998.
- MERKLER, D. J. C-terminal amidated peptides: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. **Enzyme Microb Technol** v.16,n.(6),p. 450-456, 1994.
- MIRANDA, F. et al. Purification of animals toxins, isolation and characterizations of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* (Hector), *Buthus occitamus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. **European Journal of Biochemistry FEBS**, Berlin, v. 16, p. 514-523, 1970.
- MOHAMED, A.H. Notes on the toxin of Egyptian scorpions.**The Biochemical Journal**, London,v. 38, p. 287-285, 1944
- MOUHAT, S., et al. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. **Biochemical Journal** v.378,p. 717-726, 2004.
- NORTON, R. S. Toxin structure and function: What does structural genomics have to offer? In: A. MÉNEZ. **Perspectives in molecular toxinology**. England John Wiley & Sons, Ltda, p.159-173, 2002.
- NOVELLO, J.C. et al. TsTX-IV, a short chain four-disulfite-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca^{+} - activated K^{+} channels. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 651-660, 1999.
- PEIGNEUR, S., et al. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na-type isoforms. **Neuropharmacology**, 2015.
- PENN, R. D.;J. A. PAICE. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. **Pain** v.85,n.(1-2),p. 291-296, 2000.
- PESSINI, A. C., et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon** v.39,n.(10),p. 1495-1504, 2001.

- PETRICEVICH, V. L., LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm** v.2005,n.(1),p. 39-49, 2005.
- PIMENTA, A. M.;M. E. DE LIMA. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science** v.11,n.(11),p. 670-676, 2005.
- PIMENTA, A. M., et al. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. **Biochem Biophys Res Commun** v.301,n.(4),p. 1086-1092, 2003.
- PINHEIRO, C. B., et al. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** v.59,n.(Pt 3),p. 405-415, 2003.
- POLIKARPOV, I., et al. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. **J Mol Biol** v.290,n.(1),p. 175-184, 1999.
- POSSANI, L. D., et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur J Biochem** v.264,n.(2),p. 287-300, 1999.
- POSSANI, L. S., et al. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz e Mello. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v.46, p.205, 1981.
- POSSANI, L. D.;B. M. MARTIN;I. SVENDSEN. The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann **Carlsberg Res. Commun** v.47,p. 285-289, 1982.
- POSSANI, L. S., et al. Purification and properties of mamalian toxins from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Arch.Biochem.Biophys** v.180,p. 403, 1977.
- POSSANI, L. S., et al. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz e Mello. **Carlsberg Res.Commun.** v.46,p. 205, 1981.
- QUINTERO-HERNANDEZ, V., et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon** v.76,p. 328-342, 2013.
- RATES, B., et al. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon** v.52,n.(5),p. 611-618, 2008.
- RECKZIEGEL, G. C.;V. L. PINTO, JR. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis** v.20,p. 46, 2014.

- RIDGEWAY, B.;M. WALLACE;A. GERAYLI. Ziconotide for the treatment of severe spasticity after spinal cord injury. **Pain** v.85,n.(1-2),p. 287-289, 2000.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.;L. D. POSSANI. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. **Toxicon** v.43,n.(8),p. 865-875, 2004.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.;L. D. POSSANI. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon** v.46,n.(8),p. 831-844, 2005.
- ROGOWSKI, R. S. et al. Tityustoxin K-alpha blocks voltage-gated non-inactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1475-1479, Feb 15 1994.
- ROSENGREN, K. J., et al. Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotideframework. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, p. 8606–8616, 2003.
- SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 21, p. 265-277, 1983.
- SAMPAIO, S. V. A., E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPPO NETO, F; GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T₁IV (TsTX-III) and T₂IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon** v.29,p. 672, 1991.
- SAUCEDO, A. L., et al. New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. **J Biol Chem** v.287,n.(15),p. 12321-12330, 2012.
- SCARBOROUGH, R. M., et al. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from venom of *Sistrurus m. barbouri*. **J Biol Chem** v.266,p. 9362, 1991.
- SCHOLTE, R. G., et al. Inter- and intrapopulational genetic variability of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Acta Trop** v.112,n.(2),p. 97-100, 2009.
- SCHWIETERS, C. D., et al. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. **J. Magn. Reson.** v.160,n.(1),p. 65-73, 2003.
- SHAKA, A.J., LEE, C.J. AND PINES, A. Iterative Schemes for Bilinear Operators - Application to Spin Decoupling. **J. Magn. Reson.**, 77, 274-293, 1988.
- SMITH, J. J., et al. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.108,n.(26),p. 10478-10483, 2011a.

- SMITH, J. J., et al. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.108,n.(26),p. 10478-10483, 2011b.
- SMITH, J. J., et al. Multiple actions of phi-LITX-Lw1a on ryanodine receptors reveal a functional link between scorpion DDH and ICK toxins. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.110,n.(22),p. 8906-8911, 2013.
- SPRONK, C.A.E.M., et al. Improving the quality of protein structures derived by NMR spectroscopy. **J. Biomol. Nmr**, 22, 281-289, 2002.
- SRINIVASAN, J.;M. SCHACHNER;W. A. CATTERALL. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.95,n.(26),p. 15753-15757, 1998.
- SRINIVASAN, K. N., et al. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. **J Biol Chem** v.277,n.(33),p. 30040-30047, 2002.
- STEIN, E.G., RICE, L.M. AND BRUNGER, A.T. Torsion-angle molecular dynamics as a new efficient tool for NMR structure calculation. **J. Magn. Reson.**, 124, 154-164, 1997.
- STEVENS, M.;S. PEIGNEUR;J. TYTGAT. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Front Pharmacol** v.2,p. 71, 2011.
- TOLEDO, D., V.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 55, p. 249-253, 1976.
- TYTGAT, J., et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends Pharmacol Sci** v.20,n.(11),p. 444-447, 1999.
- UNIPROT. **Scorpktx: Scorpion potassium channel toxins: nomenclature and list of entries**, 2015.
- VASCONCELOS, F., et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** v.141,n.(1),p. 85-92, 2005.
- VERANO-BRAGA, T., et al. *Tityus serrulatus* Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.371,n.(3),p. 515-520, 2008.
- WULFF, H.;N. A. CASTLE;L. A. PARDO. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov** v.8,n.(12),p. 982-1001, 2009.

- YATANI, A., et al. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. **Am J Physiol** v.254,n.(3 Pt 2),p. H443-451, 1988.
- YU, F. H.;W. A. CATTERALL. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biol** v.4,n.(3),p. 207, 2003.
- YU, L., et al. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex. **Biochemistry** v.44,n.(48),p. 15834-15841, 2005.
- YUAN, C. H., et al. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. **PLoS One** v.3,n.(10),p. e3414, 2008.
- ZHU, S. Y., et al. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. **Faseb Journal** v.17,n.(10),p. 1765-+, 2003.
- ZLOTKIN, E.;Y. FISHMAN;M. ELAZAR. AaIT: from neurotoxin to insecticide. **Biochimie** v.82,n.(9-10),p. 869-881, 2000.

ANEXO A

Formulário aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia, KU Leuven.

De ondertekende aanvraagformulieren sturen naar: Erna Dewil, Proefdierencentrum, Herestraat 49 bus 501, 3000 Leuven.

P021/2013

FORMULIER ETHISCHE COMMISSIE
Form Ethical Committee

Laboratorium (laboratory): Toxicologie en Bromatologie
Erkenningsnummer laboratorium (license number): LA1210239
Laboratoriumdirecteur (laboratory director):

Naam/name	Voornaam/first name	Diploma/degree
Tytgat	Jan	Dr. Pharm. Wet

Proefleiders (ZAP) (PI):

Naam/Name	Voornaam/first name	Diploma/degree	Certificaat proefdierkunde/certificate lab animal science
Tytgat	Jan	Dr. Pharm. Wet	☒

Uitvoerende onderzoeker(s) (AAP/BAP) (researchers and technicians):

Naam/Name	Voornaam/first name	Diploma/degree	Certificaat proefdierkunde/certificate lab animal science
Peigneur	Steve	FBT	☐
Lebbe	Eline	Master Bio-ingenieur	☒

☐ Nieuw project (new project) ☒ Verlenging van of verbonden aan een project (Nr. P122/2009) (elongation of project P...) ☐ Wijziging van een project (Nr.) (change of project P...)

Titel van het onderzoeksproject (title of the research project):
OT/12/081 (KU Leuven): Venomics and transcriptomics of Conus spp.: an untapped treasure for drug discovery

Duur van het project (maximum 4 jaar) (duration of the project, max 4 years)
Begindatum (start date): 1/10/2012 Einddatum (end date): 01/10/2016

Handtekening van de laboratoriumdirecteur/signature lab director **Datum/date**
17/01/13

Advies (voorbehouden aan de Ethische Commissie) (for the Ethical Committee):
☒ gunstig/favorable ☐ gunstig mits aanpassingen/provided favorable adjustment ☐ ongunstig/rejected

Inschatting van pijn, lijden of letsel door de Ethische Commissie/estimate by the Ethical Committee
☐ geen/none ☒ gering/minor ☐ matig/moderate ☐ ernstig/severe ☐ ondefinieerbaar/undefinable **Datum/date:** 12/11/2013

Commentaar en opmerkingen/comments and remarks

De Voorzitter/ the Chairman

De Leden/ the members

Beknopte beschrijving van het onderzoeksproject (vraagstelling, doel van het onderzoek, belang en verantwoording) (short description of the project, aim, interest and justification):

Venoms from cone snails (genus *Conus*) can be seen as an untapped cocktail of biologically active compounds, being increasingly recognized as new emerging source of peptide-based therapeutics. Cone snails are considered to be specialized predators that have evolved the most sophisticated peptide chemistry and neuropharmacology for their own biological purposes by producing venoms which contains a structural and functional diversity of neurotoxins. These neurotoxins or conotoxins are small cysteine-rich peptides which have shown to be highly selective ligands for a wide range of ion channels and receptors. Local peculiar conditions have constituted barriers preventing the spreading of *Conus* species occurring along the coast of South Africa. Due to their scarce appearance, these species remain therefore extremely poorly studied. In this proposal, venom-duct transcriptomes and genomic cloning, to elucidate the organization of the genes, will be carried out in combination with the purification, identification and functional characterization of peptides from their venoms. Furthermore, peptide lead compounds will be recombinantly expressed and their structure-function activity relationships (QSARs) will be investigated by site-directed mutagenesis on both toxin and target in order to elucidate the molecular mechanisms involved.

Binnen het project te gebruiken proefdieren (raming van het aantal benodigde dieren voor de duur van het project) **en inschatting van duur van de proef, duur en graad van pijn, lijden en letsel (Referentielijst)** (species, strain, number of animals to be used, mean duration of the experiment, mean duration of pain, suffering and lasting harm, estimate of pain, suffering and lasting harm)

Aantal (number)	Diersoort en stam (species and strain)	Gemiddelde duur van de proef (dagen, weken, maanden) <i>Mean duration of the experiment</i>	Gemiddelde duur van pijn, lijden en letsel (dagen, weken, maanden) <i>Mean duration of pain, suffering and lasting harm</i>	Graad van pijn, lijden en letsel (geen, gering, matig, ernstig, ondefinieerbaar) <i>Estimate of pain, suffering and lasting harm (none, low, moderate, severe, undefinable)</i>
120	Xenopus laevis (Afrikaanse klauwpad)	Telkens 1/2 uur	geen pijn, noch lijden letsel na 1 week volledig geneeld	gering

Verantwoording van het gespecificeerde aantal benodigde dieren (justification for the number of animals)

Based on the information in this request, scientific experience, professional judgment, the relevant literature, and, where appropriate, statistical analysis, it is estimated that the Total number of animals (120) is good approximation of animals required to conduct our experiments. The quality of oocytes from different frogs varies considerably with time of year and from one supplier to another. It is therefore desirable to maintain a sizable colony so that optimal oocytes can be harvested on a consistent basis. Generally, up to one-third of frogs may produce unusable oocytes while a good yield/harvest from each frog may yield 400 to 600 oocytes that can be used for our experiments. If we tally up the number of frogs needed, we would estimate needing about 120 frogs for this project. In many cases, we can harvest up to three times per frog, and on many occasions investigators in the lab can share the oocytes from a single frog. Therefore we anticipate that around 120 frogs will be required to complete the outlined project. Only female frogs will be used since we use only the oocytes and not the frog itself.

Geplande ingrepen op de levende proefdieren (planned experiments on the animals)

x Chirurgische ingrepen/surgery

- ☐ Toediening van stoffen aan niet-verdoofde dieren/ administration of substances to non-anaesthetised animals
- ☐ Klinisch onderzoek van niet-verdoofde dieren/ clinical investigation of non-anaesthetised animals
- ☐ Klinisch onderzoek van verdoofde dieren/ clinical investigation of anaesthetised animals
- ☐ Afname van stoffen of weefsels bij verdoofde dieren/taking substances or tissue from anaesthetised animals
- ☐ Afname van stoffen of weefsels bij niet-verdoofde dieren/ taking substances or tissue from non-anaesthetised animals
- ☐ Afname van stoffen of weefsels bij geëuthanaseerde dieren (in vitro studies)/ in vitro studies

KATHOLIEKE
UNIVERSITEIT
LEUVEN

- ☐ Conditionering, psychische testen/ *conditioning or psychological studies*
☐ Voederproeven/ *feeding tests*
☒ Andere/ *others*: afname van oocyten

Toelichting bij de geplande ingrepen op het levende dier – beschrijf chronologisch de geplande manipulaties
(chronological description of the planned interventions/manipulations on the living animal)

Prior to harvesting the oocytes the frog is anesthetized by placement in a separate container containing an aqueous solution of 0.1% buffered tricaine (immersion). Complete anesthesia is judged by lack of response to physical manipulation, which generally occurs within 10-15 min. The frog is then carefully removed from the tank, taking care to avoid injuring the protective mucus layer of the skin. The harvesting procedure involves a small peritoneal incision and the frog is allowed to recover from anesthesia in a separate small tank. Postoperative care includes keeping the frog separated from the main colony and monitoring recovery every 8 to 12 hrs for a period of one week. Each frog will undergo the above procedure a maximum of three times with at least 1 month between consecutive surgeries. It takes about 1 month for a mature scar to form (i.e. scar tissue present without red or pink coloration), so identifying frogs that have undergone surgery within the past month is straightforward. Subsequent incisions are made on an unscarred portion of the abdomen, enabling investigators to determine the number of surgeries performed on a given frog from the number of scars present. After the third and final harvest the frog will be euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/kg). All surgical instruments will be sterilized by an autoclave before each use. Following anesthesia, small incisions will first be made in the epidermal skin layer followed by another incision in the abdominal muscle layer. After removing one quarter of the oocytes for further preparations and experiments, the incision will be closed by first suturing the muscle layer followed by the skin layer. Sutures will be absorbable and need not be removed. The oocyte-filled sacs that removed/harvested are sparsely vascularized (mostly with very small blood vessels) and therefore do not require suturing. However, the oocyte sac will be sutured if hemorrhaging is evident before skin closure. When necessary, intraoolemic injection of pentobarbital for euthanasia will be given after the incision is closed but before the frog awakens from anesthesia. The person performing the surgery will wear a lab coat, a face mask and sterile gloves. If more than one frog had surgery at the same time, tips of instruments will be sterilized in a hot sterilizer between animals. Amphibian skin is very different from rodents and other species of mammals in that it provides the primary barrier to infection. The protective mucous layer of the skin should not be removed as the chemical agents (povidone and alcohol) typically used will be systemically absorbed. These agents may adversely affect the frog. The skin contains endorphins and antibiotic-like agents that aid in protecting the frog whenever the integrity of the skin is disrupted (trauma, injury, handling) and the mucus layer also possesses a bacteriostatic effect as well as mechanically trapping potential microbial and fungal pathogens. For these reasons we minimize the size of the incision.

Specificeer de nazorg (specify the after care/postoperative care)

Postoperatively each frog will be kept separate from the main colony for one week during which time it will be monitored for recovery every 8 to 12 hrs. The incision line will be monitored for any problems such as dehiscence or inflammation. During the past 5 years, we have performed hundreds of surgical procedures. Less than 1% died within the first 24 hrs following surgery. All frogs that recovered through the first 24 hr period did not have any problems. Any frog that does not recover normally from the anesthesia or exhibits swimming problems or problems with incision will be immediately euthanized. As stated above, the skin contains endorphines and opioids that provide analgesia and antibiotic agents that protect against infection.

KATHOLIEKE
UNIVERSITEIT
LEUVEN

Gebruikt u tranquillizers ?(do you use tranquillisers)

Zo ja, welke? (if so, which?)

Zo neen, waarom niet ? (if not, why not)

neen	Het ijswater zorgt voor ongevoeligheid en rust (hibernerende toestand) bij dit koudbloedige dier.
------	---

Gebruikt u analgetica ?(do you use analgesia and/or postoperative painkilling)

Gebruikt u postoperatief pijnstilling ?

Zo ja, welke en hoe lang? If yes, which one(s) and for how long

Zo neen, waarom niet ? If not, why not

De tricaïne oplossing die gebruikt wordt zal ook lokaal analgetisch werken. Zodat de isolatie pijnloos verloopt.	
--	--

Gebruikt u anesthetica ? (do you use anaesthetics)

Zo ja, welke? ? If yes, which one(s)

Zo neen, waarom niet ? ? If not, why not

Men maakt gebruik van een 5% tricaïne oplossing gecombineerd met het ijswater. Door deze combinatie verloopt de ingreep volkomen pijnloos.	
--	--

Gebruikt u andere postoperatieve producten? (do you use other postoperative products)

Zo ja, welke? ? If yes, which one(s)

Zo neen, waarom niet ? ? If not, why not

neen	Een antibiotica behandeling is niet nodig mits de wonde steeds perfect heelt en nooit infecteert mede doordat er diverse antimicrobiele(endogene)stoffen op de huid van de kikker aanwezig zijn.
------	--

Bestaan er in vitro alternatieven? Waarom worden ze niet gebruikt? (are there in vitro alternatives, if so, why do you not use them)

No. Oocytes from *Xenopus laevis* frogs provide an unparalleled cell for expression of ion channel proteins. These cell are large and mechanically stable. These properties allow ion channel expression to be initiated by cytoplasmic injections of cRNA over a wide range of concentrations. by varying the concentration of cRNA injected, the final expression level can be varied quite precisely. At one extreme, the density of channels can be low enough to permit the study of single channel molecules in excised membrane patches. At another extreme we can achieve densities as high as ten billion channels per cell so that the movement of charged residues in the protein can be monitored. This range of expression levels has not been demonstrated in any other cell type. Overall, oocytes are the simplest and world wide most used expression system for ion channel proteins.

KATHOLIEKE
UNIVERSITEIT
LEUVEN

Worden de dieren geëuthanaseerd op het einde van het experiment? (are the animals euthanased after the experiment.)

Zo ja, specificeer methode van euthanasie? if so, how Zo neen, waarom niet? if not, why not

Kikkers worden geëuthanaseerd door intraperitoneale injectie van pentobarbital (60 mg kg⁻¹) en pithing/bilaterale pneumothorax.

Specificeer de humane eindpunten van uw experiment, m.a.w. wanneer worden de manipulaties stopgezet omdat verder lijden of ongemak voor het dier onnuttig is voor het experiment en dus niet meer te verantwoorden is? (specify the humane endpoints, which criteria are used to determine when the animal suffers too much and the manipulations need to be ended)

In our experience, the animals recover uneventfully without evidence of evidence of pain or distress. The frogs are swimming normally within 30 min following placement into the recovery tank and have normal body functions, including eating. During our observations of the frog(s) in the recovery tank, we note equilibrium and normal postural movements as well as body color and behavior. If anything out of the ordinary is noticed, the decision to euthanize the frog will be taken on a case-to-case basis. Mechanisms and regulation of pain in *Xenopus* have not been studied extensively. Clinical and pharmacological studies using well established indices of amphibian pain also has not been conducted in *Xenopus* frogs. Comparison of limited lethality data suggests that the safety index for opioid, alpha2-adrenergic and non-opioid analgesic is quite narrow in frogs. In addition to the added risk of drowning due to over sedation, the effect of these agencies on amphibian oogenesis, oocyte quality and embryogenesis are unknown. Review paper: Green, S.L. Postoperative analgesics in South African Clawed frogs (*Xenopus laevis*) after surgical harvest of oocytes. 2003 Comp. Med. 53:244-247.

Inschatting volgens Vlare van de risicoklasse van het dierexperimentele werk (Enkel in te vullen voor projecten waarbij genetisch gemodificeerde dieren zullen gebruikt of aangemaakt worden of waarbij dieren op een experimentele wijze geïnfecteerd worden met pathogene en/of genetisch gemodificeerde micro-organismen of organismen)/determine the biosafety risk class of this project (e.g. when viral vectors of infectious material is used)

Opgelet : u dient zich ervan te vergewissen dat uw activiteiten bekend zijn bij de dienst Bioveiligheid./make sure that the department of Biosecurity of the university knows about these activities

☐ Klasse 1/class 1 ☐ Klasse 2/class 2 ☐ Klasse 3/class 3 ☐ Klasse 4/class 4

Voor administratieve reden, geef de naam en het u-nummer van de financiële antenne die de afhandeling zal doen van de facturen horende bij dit project (for administrative reasons, please give the name and u-number of the financial antenna that will handle the bills associated with this project)

: Jenny Vijverman,, u0045134

Is dit een Europees project? Is this a European project?

☐ Ja/yes

X nee/no