



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Caracterização eletrofisiológica das toxinas
moduladoras de canais de sódio (Tst1 e Tst3)
purificadas da peçonha do escorpião *Tityus
stigmurus***

Autor: Daniel Oliveira da Mata

Brasília - DF

Agosto, 2022

Daniel Oliveira da Mata

**Caracterização eletrofisiológica das toxinas
moduladoras de canais de sódio (Tst1 e Tst3)
purificadas da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Molecular da Universidade de Brasília,
como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni

Brasília, agosto de 2022

“Todos os dias pessoas tentam te derrubar, te diminuir e mostrar que sabem mais do que você. Porém apenas você mesmo, sozinho e a sua gratidão é o que importa para poder seguir em frente”

“Criticar muitas vezes é fácil, difícil é acrescentar”

Daniel Mata

Agradecimentos

Agradeço inicialmente aos meus familiares que sempre me incentivaram para continuar esse processo, e à minha namorada Mariana.

À minha orientadora Elisabeth Ferroni Schwartz pelo suporte.

Ao professor Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa da UFRN por compartilhar o material necessário para o desenvolvimento deste trabalho e pelo auxílio e acompanhamento do projeto.

Aos meus companheiros e amigos Diogo Tibery e Adolfo Carlos por toda a ajuda na realização dos meus experimentos para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e a FAPDF pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Aos professores do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade de Brasília (UnB) e ao programa de Biologia Molecular.

Dedico essa conclusão de trabalho à minha querida mãe, Janine Laitano de Oliveira da Mata que se foi no ano de 2021. Obrigado por todo o apoio e por sempre ter acreditado em mim.

Resumo

Pertencentes ao filo Arthropoda, os escorpiões representam aproximadamente 1,5% das espécies de aracnídeos existentes. Dentro do território brasileiro, são encontradas diversas espécies de escorpiões, estando presente em todos os estados do país. Dentre as espécies de maior importância e abundância estão os animais pertencentes ao gênero *Tityus*, tendo em vista o grande número de acidentes e problemas graves causados. Uma espécie de destaque é o *Tityus stigmurus*, espécie endêmica do Nordeste do Brasil. Essa espécie se destaca por ser a maior causadora de picadas nesta região do país, sendo responsável pelo grande número de casos de acidentes graves, desencadeando altos índices de internações e morte. A peçonha destes animais é formada por diversos compostos diferentes, no qual os que mais se sobressaem são peptídeos, também conhecidos como neurotoxinas. Essas neurotoxinas são capazes de interagir e afetar o funcionamento de canais iônicos dependentes de voltagem tais como potássio (Kv), cálcio (Cav) e sódio (Nav), responsáveis pela propagação e iniciação de sinais nervosos. Neste trabalho, a peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* foi extraída e submetida ao processo de fracionamento utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC). As frações coletadas foram analisadas em Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF) e as frações de interesse para este trabalho foram separadas e sequenciadas de forma parcial pelo método de ISD. Após o processo de purificação e identificação, as toxinas purificadas, correspondente às toxinas Tst1 e Tst3, foram testadas em canais de sódio dependentes de voltagem (subtipos Nav 1.1 a 1.7) utilizando a técnica de *patch-clamp* no modo *whole cell*. A toxina Tst1 demonstrou uma atividade característica da classe das β -toxinas, alterando o potencial de abertura dos canais de sódio (Nav) e inibindo a corrente dos mesmos, tendo uma ação superior no subtipo Nav 1.3. Já a toxina Tst3 manifestou uma atividade característica das α -toxinas, alterando a inativação rápida dos canais de sódio, sendo os subtipos Nav 1.3, 1.6 e 1.7 os mais comprometidos. Assim, as toxinas Tst1 e Tst3 são as primeiras toxinas purificadas da peçonha de *Tityus stigmurus* amplamente caracterizadas em diferentes isoformas de canais de sódio (Nav).

Abstract

Belonging to the Arthropoda phylum, scorpions represent approximately 1.5% of arachnid species. In Brazil several species of scorpions are found, being present in all regions. Among them, the most important and abundant species are the animals belonging to the genus *Tityus*, due to their great variety and medical importance. One of the most important ones is *Tityus stigmurus*, an endemic species from the Northeast region of Brazil. This species stands out for the high number of accidents in the Northeast region of the country, being responsible for a large number of accidents, leading to hospitalization and cases of death. The venom of these animals is composed of several different compounds, in which the most prominent are peptides, also known as neurotoxins. These neurotoxins are able to interact and affect the functioning of ion channels such as potassium (Kv), calcium (Cav), and voltage-gated sodium channels (Nav), responsible for the propagation and initiation of nerve signals. In this work, the venom of the scorpion *Tityus stigmurus* was extracted and fractionated using Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) technique. The fractions collected were analyzed in a Mass Spectrometer (MALDI-TOF) and the fractions of interest were separated and partially sequenced using ISD method. After the purification and identification, the purified toxins, corresponding to toxins Tst1 and Tst3, were tested in voltage-gated sodium channels (Nav 1.1 to 1.7) using the patch-clamp technique in whole cell mode. The toxin Tst1 demonstrated a characteristic activity of β -toxin, altering the opening potential of sodium channels (Nav) and inhibiting current, having a greater action on the Nav 1.3 subtype. The toxin Tst3 showed a characteristic of α -toxins, altering the rapid inactivation of sodium channels, with subtypes Nav 1.3, 1.6, and 1.7 the most compromised ones. Tst1 and Tst3 toxins are the first toxins purified from *Tityus stigmurus* venom widely characterized in different isoforms of sodium channels (Nav).

Abreviaturas

Na⁺ - Sódio

K⁺ - Potássio

Cl⁻ - Cloreto

Ca²⁺ - Cálcio

TFA - Ácido Trifluoroacético

PBS – Tampão salino de fosfato

HCCA - α -ciano-4-hidroxicinâmico

DAN - 1,5 diaminonaftaleno

cDNA – DNA complementar

NDBPs - Peptídeos sem ligações dissulfeto

DBPs - Peptídeos com ligações dissulfeto

NaScTx - Toxinas de escorpião que atuam em canais de sódio

α -NaScTx - Toxinas de escorpião que atuam em canais de sódio do tipo alfa

β -NaScTx - Toxinas de escorpião que atuam em canais de sódio do tipo beta

Nav – Canais de sódio dependentes de voltagem

HEK - *Human Embryonic Kidney*

CHO - *Chinese Hamster Ovary*

FPLC - Cromatografia Líquida de Proteína Rápida

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

MALDI/TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of Flight*

ISD - *In Source Decay method*

MS - Espectrômetro de Massa

S4 – Sensor de voltagem

Po - Probabilidade de abertura

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

Não essenciais	
Nome	Símbolos
Glicina	Gly ou G
Alanina	Ala ou A
Serina	Ser ou S
Cisteína	Cys ou C
Tirosina	Tyr ou Y
Arginina	Arg ou R
Ác. Aspártico ou Aspartato	Asp ou D
Ác. Glutâmico ou Glutamato	Glu ou E
Histidina	His ou H
Asparagina	Asn ou N
Glutamina	Gln ou Q
Prolina	Pro ou P

Essenciais	
Nome	Símbolos
Fenilalanina	Phe ou F
Valina	Val ou V
Triptofano	Trp ou W
Treonina	Thr ou T
Lisina	Lys ou K
Leucina	Leu ou L
Isoleucina	Ile ou I
Metionina	Met ou M

AMINO ACID				
Nonpolar, aliphatic R groups	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glycine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valine</p>	
	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Methionine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucine</p>	
	Polar, uncharged R groups	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p>Serine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Threonine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cysteine</p>
		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{C} - \text{H} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N}^+ \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ <p>Proline</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{array}$ <p>Asparagine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{array}$ <p>Glutamine</p>

AMINO ACID				
Positively charged R groups	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ <p>Lysine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{NH}_2^+ \end{array}$ <p>Arginine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{NH}^+ \\ / \quad \backslash \\ \text{CH} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ <p>Histidine</p>	
	Negatively charged R groups		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Aspartate</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Glutamate</p>
	Nonpolar, aromatic R groups		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Phenylalanine</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \end{array}$ <p>Tyrosine</p>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. ESCORPIÕES	14
1.1.1 <i>Tityus stigmurus</i>	15
1.2. TOXINAS DE ESCORPIÃO	20
1.3. TOXINAS ESCORPIÔNICAS COM AÇÃO EM CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (NaScTx)	21
1.3.1. Ação das NaScTxs.....	24
1.4. CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (Nav)	25
1.4.1 Estrutura funcional	25
1.4.2 Cinética de funcionamento.....	27
1.4.3 Subtipos de canais	29
1.4.4 Canalopatias	29
1.4.5 Sítios de interação.....	31
1.5. ELETROFISIOLOGIA	33
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVO GERAL.....	36
4. MATERIAIS	37
4.1. Soluções para HPLC.....	37
4.2. Meios e soluções para cultura de células.....	37
4.3. Soluções de ensaios eletrofisiológicos.....	38
5. MÉTODOS	38
5.1 Purificação dos peptídeos	38
5.2. Avaliação da Massa Molecular (MW).....	39
5.3. Sequenciamento parcial dos peptídeos	39
5.4. Quantificação dos peptídeos.....	39
5.5 Predição da estrutura tridimensional	40
5.6 Caracterização eletrofisiológica	40
5.6.1 Cultura de células.....	40
5.6.2 Ensaios Eletrofisiológicos.....	40
5.6.3 Análise de dados dos ensaios de eletrofisiologia	42
5.6.4 Análise Estatística	45

6. RESULTADOS	45
6.1 Purificação da peçonha bruta de <i>T. stigmurus</i>	45
6.2 Aquisição massa molecular (MW) e sequenciamento parcial	47
6.3 Predição da estrutura tridimensional.....	53
6.4 Caracterização Eletrofisiológica.....	54
6.4.1) Caracterização eletrofisiológica da toxina Tst1	54
6.3.2) Caracterização eletrofisiológica da toxina Tst3.....	60
7. DISCUSSÃO	65
7.1 Toxina Tst1	66
7.2 Toxina Tst3	70
8. CONCLUSÃO.....	73
9. PERSPECTIVAS	74
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

Índice de Figuras

Figura 1 Espécie de escorpião <i>Tityus serrulatus</i> e <i>Tityus stigmurus</i> . (A) Foto do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> (Autoria: Luis Felipe Santos Menezes). (B) Foto do escorpião <i>Tityus stigmurus</i> (Autoria: Yamara A. S. de Menezes).	16
Figura 2 Distribuição geográfica de espécie de <i>Tityus stigmurus</i> no Brasil. Retirado de Furtado <i>et al.</i> (2020).	17
Figura 3 Interação das α e β toxinas com o Canal de Sódio dependentes de Voltagem (Nav). (A) Interação da toxina β (Tst1) no sítio 4. (B) Interação da toxina α (Tst3) no sítio 3. As estruturas das toxinas representadas foram feitas usando SWISS MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) baseadas na estrutura da toxina Ts1 (código PDB: 1NPI) e Ts3 (código PDB: 5CY0). Autoria própria. ...	24
Figura 4 Estrutura do canal de sódio dependente de voltagem (Nav). Coloridos estão representados os domínios (I-IV) da subunidade principal (α). Em destaque cinza está o sensor de voltagem (S4), e, listrado o poro de passagem dos íons de sódio e o hexágono representa o sítio de inativação. Baseado em (Cestèle e Catterall, 2000).	26
Figura 5 Cinética dos Canais de sódio dependentes de Voltagem (Nav). Demonstração da cinética de funcionamento dos canais de sódio dependentes de voltagem nos seus três estados fundamentais. Em cinza estão os sensores de voltagem (S4) de cada domínio, e os círculos azuis representam os íons de sódio que atravessam os canal. O raio simboliza o processo de despolarização. Baseado em (Goldschen-Ohm <i>et al.</i> , 2013).	28
Figura 6 Localização dos subtipos dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) em humanos. Baseado em (Lera Ruiz, De e Kraus, 2015).	29
Figura 7 Sítios de interação de diferentes classes de toxinas sobre o canal de sódio dependente de voltagem (Nav). Colorido temos os seis sítios de interação descritos até hoje. Na tabela estão listadas as classes de toxinas que agem com cada sítio de interação específico. Baseado em (Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011).	32
Figura 8 Esquema simplificado do sistema de <i>patch clamp</i> . Adaptado de (Conforti, 2012).	34

Figura 9 Protocolo de estímulo utilizado nos experimentos de <i>patch clamp</i> em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Protocolo utilizado para obtenção dos dados de corrente da ativação e inativação.....	41
Figura 10 Protocolo para coleta dos dados de corrente para a análise do processo de desativação (" <i>recovery from inactivation</i> ").	42
Figura 11 Exemplificação método de coleta dos dados de I ₅ e I _{peak} . Em preto está a fase controle e vermelho a fase após a aplicação de 200nM da toxina Tst3.	44
Figura 12 Área da curva em ambos os estados em -20 mV. Em preto a área controle e em vermelho a área com a aplicação de 200nM de Tst3.	45
Figura 13 Perfil cromatográfico de 1mg de peçonha bruta de <i>Tityus stigmurus</i> . O monitoramento foi feito a 216 nm, sendo a linha azul o gradiente de acetonitrila (ACN) utilizado. Em destaque estão as frações de interesse.....	46
Figura 14 Recromatografia da fração correspondente a toxina Ts1. O pico de maior intensidade representa a fração de interesse aparentemente pura. O X preto representa o ponto inicial e final da coleta manual do pico. O monitoramento foi feito a 216 nm.	46
Figura 15 Recromatografia da fração correspondente a toxina Ts3. O pico de maior intensidade representa a fração de interesse aparentemente pura. O X preto representa o ponto inicial e final da coleta manual do pico. O monitoramento foi feito a 216 nm.	47
Figura 16 Massa Molecular da fração correspondente à toxina Tst1. (A) Representa a massa média obtida no modo linear (LP). (B) Representa a massa monoisotópica obtida no modo refletivo (RP).....	48
Figura 17 Massa Molecular da fração correspondente a toxina Tst3. (A) Representa a massa média obtida no modo linear (LP). (B) Representa a massa monoisotópica obtida no modo refletivo (RP).....	49
Figura 18 Comparação das sequências parciais obtidas com a sequência peptídica completa das toxinas Tst1 e Tst3 obtidas da biblioteca de cDNA. As sequências parciais mostradas nas Figuras 19 e 20 estão em vermelho.	49
Figura 19 Sequência Parcial da fração correspondente a toxina Tst1. O sequenciamento foi realizado utilizando MALDI TOF no método de ISD. Dois	

fragmentos foram identificados na amostra. As letras em representam os aminoácidos obtidos.....	50
Figura 20 Sequência Parcial da fração correspondente a toxina Tst3. O sequenciamento foi realizado utilizando MALDI TOF no método de ISD. Um fragmento foi identificado na amostra. As letras em representam os aminoácidos obtidos.....	51
Figura 21 Alinhamento da sequência peptídica de diferentes toxinas identificadas com a Tst1. Em negrito estão os aminoácidos importante para a interação das β toxinas com a canal de sódio (Nav) e em amarelo as regiões com mudanças pontuais. (*) resíduos de aminoácidos idênticos;(:) substituição conservativa;(.) substituição semi-conservativa. (Id%) porcentagem de identidade.....	52
Figura 22 Alinhamento da sequência peptídica de diferente toxinas identificas com a Tst3. Em negrito estão os aminoácidos importante para a interação das β toxinas com a canal de sódio (Nav) e em amarelo as regiões com mudanças pontuais. (*) resíduos de aminoácidos idênticos;(:) substituição conservativa;(.) substituição semiconservativa. (Id%) porcentagem de identidade.	53
Figura 23 Predição da estrutura tridimensional das toxinas Tst1 e Tst3. Foi utilizado o SWISS-MODEL para a predição das toxinas.....	53
Figura 24 Traços brutos de corrente nos ensaios de patch clamp em diferentes isomorfias de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). (A) Traços brutos de corrente em cada subtipo testado. As curvas foram obtidas utilizando a corrente máxima nas seguintes voltagens: Nav 1.1 (0 mV), Nav 1.2 (-5 mV), Nav 1.3 (-5 mV), Nav 1.4 (-10 mV), Nav 1.5 (-10 mV), Nav 1.6 (-5 mV), Nav 1.7 (-10 mV). Em preto estão representadas as curvas controle e vermelho a curva após a aplicação de 100nM de Tst1. (B) Representação gráfica em barras da inibição de corrente (IC%) causada pela toxina Tst1 em cada subtipo de voltagem testado. As barras foram geradas através dos dados da média e erro padrão (n=3).....	55
Figura 25 Curva dose-resposta da toxina Tst1 com o subtipo de canal Nav 1.3. IC% representa a inibição de corrente causado nas três diferentes concentrações (1 nM, 10 nM e 100 nM). Os quadrados pretos representam o log da concentração testada (n=3).....	56

Figura 26 Janela de condutância e corrente obtidos em diferentes subtipos de canais de sódio testados com a toxina Tst1. Representação da alteração no potencial de abertura na ativação e inativação (SSI) para as isoformas testadas. As curvas pretas simbolizam a condição controle e as curvas vermelhas sob aplicação de 100nM da toxina Tst1. Quadrados pretos e brancos representam o a condutância na ativação e círculos pretos e brancos a corrente na inativação. As curvas foram feitas utilizando função de Boltzmann de condutância normalizada (ativação) e corrente normalizada (inativação). Os pontos apresentados representam a média e erro padrão (n=3). 57

Figura 27 Dados da desativação (“recovery from inactivation”) dos subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem. Fr representa a fração de corrente recuperada em um período de tempo. As curvas foram geradas a partir dos dados normalizados de corrente por tempo e utilizando uma função exponencial. Todos os pontos são representados pela média e erro padrão (n=3). 59

Figura 28 Traços brutos de corrente em subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Em preto estão representados os traços da corrente máxima no controle, e em vermelho o estado após a aplicação de 200 nM da toxina Tst3, ambas a -20 mV (n=3). 61

Figura 29 Janela de condutância e corrente obtidos em diferentes subtipos de canais de sódio testados com a toxina Tst3. Representação da alteração no potencial de abertura na ativação e inativação para as isoformas testadas. As curvas pretas simbolizam a condição controle e as curvas vermelhas sob aplicação de 200nM da toxina Tst3. Quadrados pretos e brancos representam o a condutância na ativação e círculos pretos e brancos a corrente na inativação. As curvas foram feitas utilizando função de Boltzmann de condutância normalizada (ativação) e corrente normalizada (inativação). Os pontos apresentados representam a média e erro padrão (n=3). 62

Figura 30 Traços de I_5/I_{peak} nos subtipos de canais de sódio (Nav). Para a obtenção das curvas foram utilizados os dados de I_5/I_{peak} obtidos em diferentes voltagens (-40 a 30 mV). Em preto está representada a curva controle e em vermelho a curva após a aplicação de 200nM da toxina Tst3. 64

Figura 31 Alinhamento das toxinas de *Tityus* (Tst3 e Ts5) com as toxinas AaH2 e BmkM1. Em destaque amarelo estão as regiões chave para interação das α toxinas com o canal..... 72

Índice de Tabelas

Tabela 1 Dados de inibição de corrente e da alteração do potencial de abertura na ativação. IC (%) inibição de corrente total em porcentagem; V_a é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto; k_a é a inclinação da reta na ativação. Os dados são representados com média e erro padrão ($n=3$)......	58
Tabela 2 Dados da inativação rápida. V_i é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto durante a fase da inativação; k_i é a inclinação da reta na inativação. Os dados são representados com média e erro padrão ($n=3$)......	58
Tabela 3 Resultados da inativação lenta dos subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem. τ representa a constante de tempo para as condições controle e após a aplicação da toxina Tst1 para cada isoforma. Os dados são representados com média e erro padrão ($n=3$).	60
Tabela 4 Dados de inibição de corrente e da alteração do potencial de abertura na ativação. GC (%) ganho de corrente total em porcentagem; V_a é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto; k_a é a inclinação da reta na ativação. Os dados são representados com média e erro padrão ($n=3$)......	63
Tabela 5 Dados da inativação rápida. V_i é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto durante a fase da inativação; k_i é a inclinação da reta na inativação. Os dados são representados com média e erro padrão ($n=3$)......	63
Tabela 6 Dados de $\Delta I_5/I_{peak}$. Representa a diferença de I_5/I_{peak} na fase controle e após a aplicação da toxina Tst3. Os dados foram obtidos a -0 mV. 64	
Tabela 7 Diferença da área em diferentes subtipos. Para a obtenção destes dados foram utilizados os traços de corrente no estado controle e com a aplicação da toxina Tst3.....	65
Tabela 8 Representação do efeito no potencial de abertura das toxinas relacionadas a Tst1 em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). (-) Representa sem efeito; (+++) Representa o subtipo mais afetado pela toxina; (++) Representa o Segundo subtipo mais afetado pela toxina; (+) Representa o subtipo com efeito baixo; (NT) canal não testado.	68

Índice de Quadros

Quadro 1 Canalopatias associadas a mutações em diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Baseado em (Huang <i>et al.</i> , 2017)	30
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESCORPIÕES

Os escorpiões são animais pertencentes ao filo Arthropoda da classe Arachnidia. Fazem parte da ordem Scorpiones, com 2000 espécies descritas (Ahmadi *et al.*, 2020). Versáteis quanto à sobrevivência, estão presentes em quase todas as áreas geográficas do planeta, com exceção dos polos da Terra diante das baixas temperaturas encontradas (Brazil e Porto, 2010). Dentre a classe dos escorpiões, a família que mais se destaca é a família Buthidae por sua ampla distribuição geográfica, grande quantidade de espécies existentes e o seu alto grau de importância médica, devido ao grande número de casos de acidentes registrados (Rodriguez e Regina, 2008; Torquato *et al.*, 2005).

Com aproximadamente 100 gêneros e com mais de 1000 espécies registradas, a família Buthidae corresponde a cerca de 50% dos escorpiões existentes no mundo (Lourenço, 2015). No Brasil, o gênero *Tityus* é o que mais se destaca, contendo cerca de 63 espécies distribuídas em todos os estados do país (Brazil e Porto, 2010; Bertani, Giupponi e Moreno-González, 2021). Dentre as espécies de maior importância médica estão *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e o *Tityus obscurus* (Rodriguez e Regina, 2008).

Os escorpiões são animais de tamanhos e colorações muito diversificados, tendo características, corporais, hábitos de vida e comportamento diferentes dentro de cada espécie (Brazil e Porto, 2010). Estes animais possuem algumas características diferente de outros artrópodes, como seus hábitos alimentares, estilo de vida, reprodução e estrutura corporal.

Os escorpiões são animais carnívoros, que se alimentam de pequenos animais como baratas, grilos e de, em alguns casos, de outros escorpiões (Brazil e Porto, 2010). Estes animais produzem uma peçonha bastante potente e complexa, com o intuito de capturar e se defender de suas presas. Inicialmente ao localizar a presa, os mesmos tentam inicialmente capturá-la utilizando seu aparato corporal, como as pinças e palpos. Entretanto em caso de insucesso passam a utilizar do seu aparato inoculador de modo a paralisá-la (Rodriguez e Regina, 2008).

Em relação aos hábitos comportamentais, os escorpiões são animais noturnos que tendem a permanecer escondidos durante o dia em pedras e galerias, visando sua proteção (Brazil *et al.*, 2010; Torquato *et al.*, 2005). Com a ocupação de seu habitat natural advindo do crescimento das grandes cidades, muitos destes animais passaram a habitar os espaços urbanos, ocasionando a proliferação destes em meio à população humana (Torquato *et al.*, 2005), acarretando assim no aumento do número de acidentes provenientes de picadas de escorpião. Segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde foram registrados cerca de 140 mil casos no ano de 2018, número quatro vezes maior que o demonstrado no ano de 2008 (Butantan, 2021).

Em relação à reprodução, na maioria dos casos ocorre de forma sexuada, podendo também ser de forma assexuada, como no caso de *T. serrulatus* de forma partenogênica, o que facilita a proliferação de novos animais (Brazil e Porto, 2010). A gestação pode variar de 2 meses a 1 ano, podendo ser gerados de 1 a 95 filhotes. Os mesmos são carregados na parte dorsal da mãe por até 4 semanas, podendo sobreviver por até 25 anos (Torquato *et al.*, 2005).

O corpo destes animais é dividido basicamente em duas partes: prossoma (ou cefalotórax) e opistossoma, sendo este dividido em duas partes (mesosoma (tronco) e o metassoma (cauda)) (Brazil e Porto, 2010; Stockmann, 2013). O corpo destes animais é coberto por pequenas cerdas quimiorreceptoras e mecanorreceptoras, responsáveis pela função sensorial do animal (Brazil e Porto, 2010). O télson está localizado parte final do corpo (metassoma), região onde estão contidas vesículas e o ferrão para a inoculação da peçonha (Brazil e Porto, 2010).

Todos os escorpiões descritos até hoje são considerados peçonhentos, porém apenas uma pequena parte é capaz de gerar acidentes graves, devido à baixa toxicidade da sua peçonha (Brazil e Porto, 2010).

1.1.1 *Tityus stigmurus*

No Brasil, umas das espécies com maior número de acidentes e de grande interesse médico é o *Tityus stigmurus*, popularmente chamado de escorpião amarelo nordestino (**Figura 1**) (Albuquerque *et al.*, 2013). Esta espécie se encontra na região Nordeste do Brasil, mais especificamente nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do

Norte, Sergipe e alguns casos no estado de Minas Gerais e São Paulo (**Figura 2**) (Nencioni *et al.*, 2018; Brazil e Porto, 2010). Com cerca de 7 cm de comprimento, possui a coloração predominante amarelada com uma faixa longitudinal no seu dorso de cor escura (Brazil e Porto, 2010).

Após algumas avaliações, sugeriu-se que a espécie *Tityus stigmurus* está diretamente correlacionada com *Tityus serrulatus*. Acredita-se que durante muitos anos ambas foram classificadas como o mesmo indivíduo, graças a dificuldades na diferenciação, a qual só ocorreu posteriormente (Santos, dos *et al.*, 2014; Lourenço, 2015). Para isso foram observadas variações corporais, tais como sua coloração e presença de listras escuras na parte superior do dorso, a diferença quanto ao modo de reprodução e ainda sua distribuição geográfica, ocasionado por migração destes alguns indivíduos para diferentes regiões do Brasil (Santos, dos *et al.*, 2014). Essa grande correlação foi comprovada por Nascimento *et al.* (2006) através da comparação proteômica da peçonha destes animais por técnicas de 2D-LC/MS. As espécies *T. serrulatus* e *T. stigmurus* mostraram um coeficiente de correlação de 0,97, valor superior aquele comparado com outras espécies, corroborando assim que apesar da grande similaridade fisionômica, *T. serrulatus* corresponde uma morfologia assexuada de *T. stigmurus* (Nascimento *et al.*, 2006).

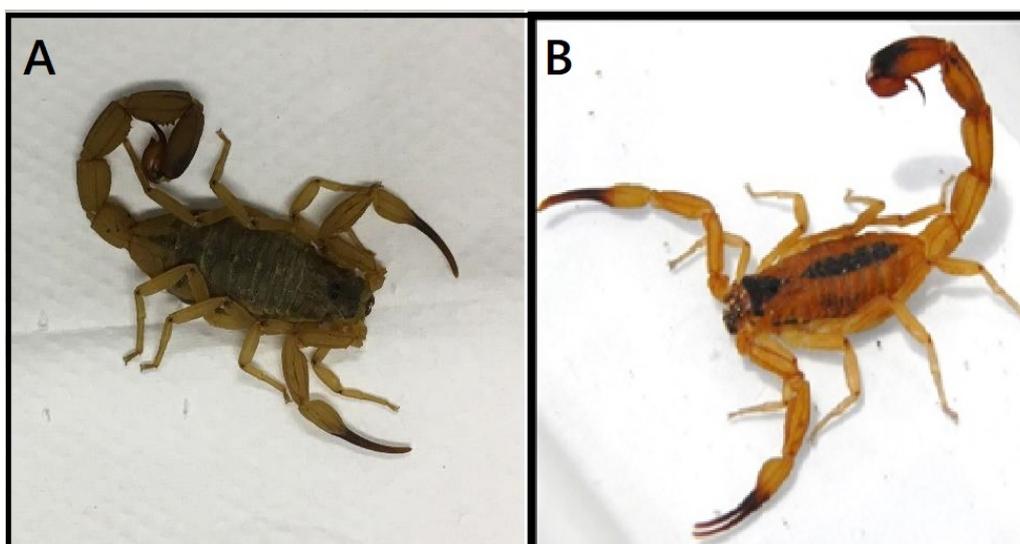


Figura 1 Espécie de escorpião *Tityus serrulatus* e *Tityus stigmurus*. (A) Foto do escorpião *Tityus serrulatus* (Autoria: Luis Felipe Santos Menezes). (B) Foto do escorpião *Tityus stigmurus* (Autoria: Yamara A. S. de Menezes).



Figura 2 Distribuição geográfica de espécie de *Tityus stigmurus* no Brasil.

Retirado de Furtado *et al.* (2020).

Estudos já foram reportados utilizando a peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*. O primeiro foi realizado visando avaliar os efeitos da peçonha total de escorpiões do gênero *Tityus* existentes no Brasil, dentre eles *T. serrulatus*, *T. bahienses* e *T. stigmurus*, e suas toxinas purificadas em células secretoras. Tais peçonhas demonstraram a capacidade de ativar secreções pancreáticas e ainda causar descargas e ativação de sinaptosomas (Fletcher *et al.*, 1996). No mesmo ano, foi feito um trabalho afim de coletar o DNA genômico das espécies de escorpiões *Tityus stigmurus* e *Tityus bahiensis*. Foi realizada a purificação da peçonha bruta de *Tityus stigmurus* e a identificação de alguns peptídeos, tais como as toxinas Tst1, Tst2 e Tst3, reportadas pela primeira vez (Becerril *et al.*, 1996).

Posteriormente, foi feita uma comparação de toxinas de sódio e potássio presente já identificadas em animais do gênero *Tityus* presentes no Brasil e na Venezuela usando sequências de cDNA, dentre elas a de *T. stigmurus*, afim de se comparar a composição e similaridade das mesmas (Becerril, Marangoni e Possani, 1997). Após esses estudos, foi resolvida a primeira estrutura de um composto presente na peçonha de três espécies diferentes de escorpião (*T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*) utilizando ressonância magnética (2D-NMR) (Holaday *et al.*, 2000). No ano de 2007, foi publicado um estudo avaliando a proteômica da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*. Nesta pesquisa foi

realizada a purificação da peçonha bruta do animal, avaliação da massa molecular e sequenciamento de diversos componentes. As toxinas Tst3 e Tst17 foram completamente sequenciadas, e a toxina Tst17 testada em canais de potássio, causando uma diminuição nos canais do tipo *ShakerB* (Batista *et al.*, 2007).

Novos projetos começaram a ser desenvolvidos com intuito de avaliar o potencial da peçonha de *Tityus stigmurus*, tendo em vista o grande potencial de obtenção de novos compostos. Diego-García *et al.* (2008) avaliaram a atividade eletrofisiológica da toxina Tst β KTx em canais de potássio, ocasionando uma inibição de corrente nos subtipos Kv 1.1, 1.2 e 1.3 sem causar efeitos citolíticos nas células. Foi também obtido um IC₅₀ de 185nM desta toxina em canais de potássio (Diego-García *et al.*, 2008). Em 2009 uma nova toxina, denominada Tst 26, foi eletrofisiologicamente caracterizada em Kv 1.1 a 1.5, hKCa1, hBR e hNav 1.5, usando a técnica de *voltagem clamp*. A mesma causou um bloqueio significativo nos subtipos Kv 1.2 e 1.3, sendo classificada como uma nova α -KTx (Papp *et al.*, 2009). Almeida *et al.* (2012) publicaram um dos trabalhos mais importantes para o entendimento da peçonha do *Tityus stigmurus*, realizando a construção da biblioteca completa de cDNA da glândula de peçonha do escorpião. Foram identificados 153 clusters correspondendo a compostos diversos tais como toxinas de sódio e potássio (α e β), antimicrobianos, hipotensinas, metaloproteases, destacando a grande diversidade de componentes presentes na peçonha deste animal (Almeida *et al.*, 2012).

Posteriormente, diversos trabalhos passaram a ser realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) com o objetivo de avaliar e caracterizar compostos específicos da peçonha de *T. stigmurus*. Primeiramente foi avaliada a estrutura tridimensional de uma β -KTx identificada no cDNA, denominada TstKMK, através de modelagem computacional e simulações de dinâmica molecular. Foi realizado também o docking molecular com o canal de potássio Kv 1.2, elucidando assim o sítio de interação desta toxina com o canal (Almeida *et al.*, 2013). Melo *et al.* (2015) analisaram por meio de estudos *in silico* e *in vitro* o peptídeo denominado Stigmurina. O mesmo exibiu um efeito antifúngico e antibacteriano (Melo, de *et al.*, 2015). Ainda em 2015, a hipotensina (TistH), contendo 25 resíduos de aminoácidos teve sua estrutura

tridimensional gerada por homologia e dinâmica molecular. A mesma potencializou a ação hipotensora da bradicinina (BK), induziu um efeito vaso relaxante nos anéis da artéria mesentérica pela liberação de óxido nítrico (NO) independente da inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), sem apresentar citotoxicidade (Machado *et al.*, 2015).

O peptídeo TistH também teve examinada sua atividade antimicrobiana testada, toxicidade em células normais e tumorais e seu efeito antiinflamatório. A TistH mostrou ação antifúngica elevada em *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus flavus* com uma baixa citotoxicidade o que favorece a geração de novos fármacos (Machado *et al.*, 2016). TistH foi posteriormente incorporada a nanopartículas de quitosana, com intuito de avaliar diferenças em sua atividade. O complexo toxina/nanopartícula além de demonstrar alta estabilidade e encapsulamento, causou efeitos significativos na inibição e redução do crescimento e viabilidade fúngica, aumentando a eficiência do composto (Torres-Rêgo *et al.*, 2019).

Daniele-Silva *et al.* (2016) voltaram a estudar o peptídeo Stigmurina junto com um novo peptídeo chamado TsAP-2. Foram analisadas a estrutura secundária, a atividade antiproliferativa e antimicrobiana *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Ambos os peptídeos testados não sofreram alterações estruturais em diferentes condições de pH e temperatura, sendo ainda eficientes no combate a infecções e sepsis sem causar citotoxicidade, mostrando potencial terapêutico (Daniele-Silva *et al.*, 2016). Em seguida, foram desenvolvidos análogos da Stigmurina com objetivo de reduzir a toxicidade e aumentar a atividade biológica deste composto. As StigA6, StigA16, StigA25 e StigA31 tiveram efeito antimicrobiano maior que o nativo, diminuindo em duas vezes a citotoxicidade em células humanas (Amorim-Carmo *et al.*, 2019; Parente *et al.*, 2018). Por último, em 2021 a Stigmurina nativa teve sua a estrutura tridimensional resolvida por ressonância magnética nuclear (NMR) (Daniele Silva *et al.*, 2021).

Silva *et al.* (2016) mensuraram os efeitos renais causados pela peçonha bruta de *T. stigmatum*. Análises foram feitas com 0,3 e 1 µg/mL de peçonha em rins isolados de ratos em solução. A peçonha causou elevação transitória da pressão de perfusão renal, acarretando em lesões glomerulares discreta e lesão tubular moderada, gerando aumento no fluxo urinário, com elevação da excreção

de sódio, potássio e cloreto (Silva *et al.*, 2016). O primeiro peptídeo aniônico (TanP) identificado da peçonha de *T. stigmurus* também foi estudado. Sua atividade quelante, estrutura tridimensional com dinâmica molecular, espectroscopia UV e dicroísmo circular foram avaliados. Este peptídeo inibiu a liberação de óxido nítrico por estímulo de macrófagos e ainda mostrou capacidade de quelar íons Fe^{2+} , podendo ser usado como biossensor de Fe^{2+} , e ainda atuar como antioxidante e anticoagulante (Melo *et al.*, 2017, 2022).

Posteriormente Freire *et al.* (2018) realizaram estudos com o peptídeo precursor do cluster TSTI0140S, contendo 37 resíduos de aminoácido e uma massa de 3937,76 Da. Foi elucidada sua estrutura tridimensional por meio de modelagem computacional e docking em canais Shaker Kv 1.2 de rato. Foi obtida sua estrutura assim como os locais de interação e estabilização da mesma com o canal Shaker Kv 1.2, comprovando que tal sequência corresponde a uma α -KTx como esperado (Freire *et al.*, 2018). Silva *et al.* (2020) analisaram o efeito da peçonha de *T. stigmurus* em células sanguíneas, testiculares e espermatogênicas. Esse composto causou mutações em eritrócitos e danos ao DNA, além de ocasionar alterações no número de espermatogônias e espermátides, de modo a afetar reprodução dos animais e humanos (Silva *et al.*, 2020).

Apesar de todos os trabalhos citados a cima com a peçonha de *Tityus stigmurus*, até hoje nenhuma toxina capaz de agir em canais de sódio teve seu efeito amplamente caracterizado por ensaios eletrofisiológicos, apesar de saber que tais peptídeos são os grandes responsáveis pelos efeitos neurotóxicos causados por acidentes com escorpiões.

1.2. TOXINAS DE ESCORPIÃO

Peçonhas de escorpião são constituídas por diversos compostos diferentes tais como enzimas, nucleotídeos, lipídios, aminas biogênicas e compostos ainda não conhecidos, cada uma função e atividade dentro desta peçonha (Quintero-Hernández *et al.*, 2013; Tobassum *et al.*, 2020). Pouco ainda se sabe sobre a ação e atividade de muitos destes compostos, uma vez que poucos ainda foram identificados e testados (Cordeiro *et al.*, 2015; Quintero-Hernández *et al.*, 2013). Acredita-se que a produção dessa peçonha surgiu com

a finalidade de imobilizar as presas para alimentação e para a defesa dos escorpiões contra grandes predadores, de modo a se transformar com passar dos anos, tendo em vista as mudanças em seu habitat (Gwee *et al.*, 2002).

Um dos componentes de maior interesse são os peptídeos, devido à sua capacidade de interagir e interferir no funcionamento dos canais iônicos presentes em diferentes espécies de animais tais como mamíferos e insetos (Bosmans *et al.*, 2007; Cordeiro *et al.*, 2015). Esses peptídeos têm a capacidade de afetar canais iônicos dependentes de voltagem de sódio (Nav), potássio (Kv), cloreto (Clv) e cálcio (Cav), estruturas que exercem um papel fundamental no funcionamento do organismo humano, tais como a iniciação e propagação dos sinais nervosos (Possani *et al.*, 2000; Tobassum *et al.*, 2020).

Estes peptídeos são divididos em duas classes principais, sendo eles de cadeia curta e os de cadeia longa. Os de cadeia curta possuem de 28 a 46 resíduos de aminoácidos, agindo especificamente em canais de potássio (Kv). Já os peptídeos de cadeia longa, possuem entre 61 e 76 aminoácidos, afetando os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) (Ahmadi *et al.*, 2020; Escalon e Possani, 2013). Os peptídeos escorpiônicos também são divididos de acordo com a presença de ligações dissulfeto em sua estrutura terciária. Os peptídeos sem ligações dissulfeto (NDBPs) possuem atividades antimicrobiana, hemolítica e imuno-moduladoras. Por sua vez, os peptídeos com ligações dissulfeto (DBPs) são os agentes responsáveis pelas ações neurotóxicas, sendo capazes de modular as atividades dos canais iônicos, de modo a alterar sua cinética de funcionamento, estando dentre eles as toxinas com ação em canais de sódio (NaScTx) (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012).

1.3. TOXINAS ESCORPIÔNICAS COM AÇÃO EM CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (NaScTx)

Toxinas que atuam em canais de sódio, ou NaScTx, são peptídeos de cadeia longa compostos de 55 à 75 resíduos de aminoácidos, formando três ou quatro ligações dissulfeto (Ahmadi *et al.*, 2020; Guerrero-Vargas *et al.*, 2012) e com variação de massa molecular entre 6500-8500Da (Quintero-Hernández *et al.*, 2013; Tobassum *et al.*, 2020). Grande parte das NaScTx possuem uma estrutura tridimensional conservada, formando uma α -hélice e três ou quatro

folhas- β antiparalelas estabilizadas pelas ligações dissulfeto, que estão conservadas na sua sequência primária (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005; Quintero-Hernández *et al.*, 2013; Zhang, Gao e Zhu, 2015).

As NaScTxs são divididas em duas classes principais, sendo elas do tipo alfa (α) e beta (β) tendo em vista sua sequência peptídica e atividade. As α -NaScTxs, ou α -toxinas, foram inicialmente descritas na peçonha de escorpiões do Velho Mundo (África e Ásia), sendo posteriormente observadas em animais das novas regiões do mundo como as Américas (Quintero-Hernández *et al.*, 2013). Já as β -NaScTx (β -toxinas) foram descritas mais atualmente com a intensificação no estudo das peçonhas dos escorpiões da América Central, do Sul e do Norte e com a descoberta de novas espécies (Rodríguez de la Vega e Possani, 2005).

As α -NaScTxs são subdivididas em três diferentes grupos: as α -toxinas clássicas, capazes de interagir apenas com canais de mamíferos, α -toxinas inseticidas, que agem apenas contra canais de inseto e as α -like toxinas que agem em ambos os grupos de canais (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012; Quintero-Hernández *et al.*, 2013) (Possani *et al.*, 1999; Rodríguez de la Vega e Possani, 2005) (Gordon *et al.*, 1998).

Já as β -NaScTx foram subdivididas em quatro grupos: as β -toxinas anti-mamíferos, que agem apenas em canais de mamíferos, β -toxinas anti-insetos depressoras, β -toxinas anti-insetos excitatórias e β -toxinas like capazes de agir tanto em canais de sódios de inseto quanto de mamíferos (Possani *et al.*, 1999) (Gordon *et al.*, 1998).

Em relação à sua sequência, as β -toxinas possuem regiões conservadas que exercem um papel fundamental na interação e ação dos peptídeos sobre os canais de sódio (Nav). Dentre elas quatro regiões foram identificadas com chave sendo a primeira o farmacoporo central, no qual possui um aminoácido carregado negativamente (Glu26) rodeado por resíduos hidrofóbicos (Leu13, Tyr22 e Ile29) sendo estes importantes na interação das toxinas (Quintero-Hernández *et al.*, 2013). A segunda chamada de região dos aromáticos conservados, localizado entre as fitas β_2 e β_3 é composta pelos resíduos Tyr4, Tyr36, Trp39, Tyr43, Tyr45, Tyr50 e Tyr54, tendo como base a toxina Ts1, exercendo papel funcional na atividade das toxinas (Quintero-Hernández *et al.*,

2013). As outras duas regiões estão localizadas nas extremidades NC terminal, tendo como função principal o aprisionamento do sensor de voltagem dos canais de sódio, podendo modular a intensidade do efeito causado (Escalon e Possani, 2013; Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

As toxinas do tipo α também possuem regiões e aminoácidos conservados que exercem um papel importante na interação e atividade das toxinas. Dentre eles estão os aminoácidos Tyr5, Tyr35, Trp38, Tyr42 e Trp47, também denominada região dos aminoácidos aromáticos conservados, que exercem uma função estrutural nas toxinas e seus efeitos farmacológicos (Bosmans *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2003). Outros aminoácidos chave para geração do complexo toxina-canal são Trp38, Tyr42, Asn44, Gly59, Pro60, Arg62 e His64, sendo os aminoácidos localizados na região C-terminal os de maior importância, tais como Arg62 e His64 (Clairfeuille *et al.*, 2019).

Em relação ao sítio de interação, α e β -toxinas se associam em diferentes regiões dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). As α -toxinas interagem com o sítio 3 do canal de sódio, localizado no *loop* externo entre as subunidades S1-S2 e S3-S4 do domínio IV e no poro central do domínio I, agindo assim diretamente sobre o sensor de voltagem do domínio IV (VSD4) (Clairfeuille *et al.*, 2019; Gwee *et al.*, 2002; Quintero-Hernández *et al.*, 2013). Já as β -toxinas interagem com o sítio 4 do canal de sódio, localizado no *loop* extracelular do domínio II, mais precisamente em S3-S4, S1-S2 e S5-SS1 do domínio I e SS2-S6 do domínio III (Cestèle *et al.*, 1998; Gwee *et al.*, 2002) (**Figura 3**).

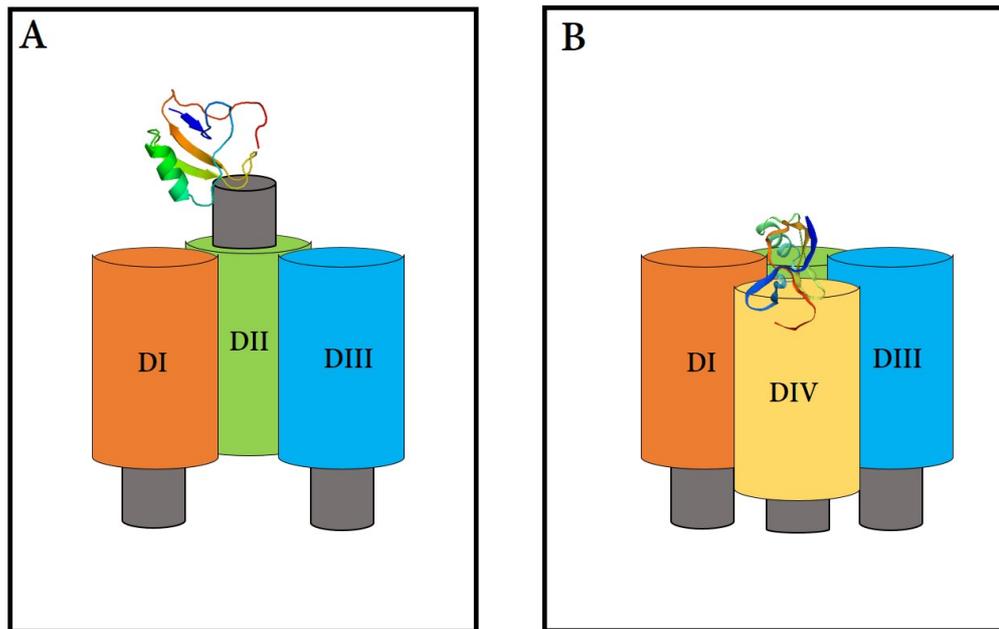


Figura 3 Interação das α e β toxinas com o Canal de Sódio dependentes de Voltagem (Nav). (A) Interação da toxina β (Tst1) no sítio 4. (B) Interação da toxina α (Tst3) no sítio 3. As estruturas das toxinas representadas foram feitas usando SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) baseadas na estrutura da toxina Ts1 (código PDB: 1NPI) e Ts3 (código PDB: 5CY0). Autoria própria.

1.3.1. Ação das NaScTxS

Além da diferença nas regiões de interação, as α e β toxinas ocasionam efeitos distintos sobre os canais de sódio (Nav). As α -toxinas são responsáveis por inibir na inativação rápida dos canais, mantendo os canais abertos por mais tempo e impossibilitando a inativação completa do canal (Pucca *et al.*, 2015; Quintero-Hernández *et al.*, 2013). Além disso, as α -toxinas aumentam a corrente total dos canais Nav, graças ao aprisionamento do sensor de voltagem do domínio IV (VSD4) na posição intracelular, impossibilitando seu deslocamento para região extracelular (Gordon *et al.*, 1998). Tal efeito ocorre graças à complementaridade eletrostática gerada entre a toxina e a região extracelular do domínio IV, criando uma barreira hidrofóbica que impossibilita o movimento do sensor de voltagem (Clairfeuille *et al.*, 2019). Do ponto de vista fisiológico, as α -toxinas são responsáveis por gerar um prolongamento e um aumento no potencial de ação.

Já as β -toxinas reduzem a amplitude de corrente total das células, alterando também o potencial de abertura dos canais de sódio (Nav) para potenciais mais hiperpolarizados ou negativos (Cestèle *et al.*, 1998; Quintero-

Hernández *et al.*, 2013). Esse efeito ocorre graças ao aprisionamento do sensor de voltagem (S4) do domínio II na posição extracelular em, facilitando assim o deslocamento do sensor de voltagem e possibilitando a abertura em voltagens menores (Cestèle *et al.*, 1998). Tal aprisionamento ocorre de graças à interação da toxina com uma Pro 782 e Gly845 localizadas no loop S1-S2 e S3-S4 do domínio II, respectivamente (Cestèle *et al.*, 1998). Fisiologicamente as β -toxinas geram uma diminuição do potencial de ação, graças à inibição de corrente, dificultando assim a sua geração e propagação.

Dentre as toxinas de maior destaque descritas até hoje do gênero *Tityus* estão as toxinas Ts2, Ts3 e Ts5 (α -toxinas) e Ts1 (β -toxina), todas purificadas do escorpião *Tityus serrulatus*, tendo em vista sua importância médica (Nencioni *et al.*, 2018).

1.4. CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (Nav)

1.4.1 Estrutura funcional

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são estruturas responsáveis pela iniciação e propagação dos potenciais de ação no corpo humano (Catterall, 1986). Estes canais são constituídos por proteínas transmembrânicas, formadas por duas estruturas principais, sendo elas a subunidade α (260kDa), principal da estrutura dos canais, e a subunidade β , denominadas estruturas auxiliares (Catterall, 1986). A subunidade α é formada por quatro domínios homólogos (I-IV), no qual são subdivididos em seis segmentos transmembrânicos (S1-S6) (Catterall, 1986). Dentre eles está presente o segmento denominado S4, conhecido por sensor de voltagem da estrutura (Catterall, 1986). Os segmentos S4 possuem resíduos de aminoácidos carregados positivamente intercalados (Lys e Arg), distanciados por três resíduos de aminoácidos diferentes (Catterall, 2000). Essas cargas positivas na região do sensor de voltagem, alteram o campo elétrico durante o processo de despolarização, acarretando no movimento dos sensores para a região extracelular, promovendo a abertura do poro do canal e a passagem dos íons de sódio para o interior da célula (Cestèle *et al.*, 1998).

Os segmentos S5 e S6 de todos os domínios formam o poro iônico, local de passagem dos íon para a região interna da célula (Catterall, 2000). Além

disso, há a formação de *loops* que interconectam os segmentos dos canais, como o *loop* entre o domínio III e IV responsável pelo sítio de inativação do canal (IFM), e o *loop* entre S5 e S6 formador do filtro de seletividade do canal (Catterall, 1986)(Cestèle e Catterall, 2000)(Goldschen-Ohm *et al.*, 2013). Este filtro é composto por dois anéis, sendo o anel externo é formado pela sequência de aminoácidos EEDD ou EEMD, o qual desempenha o papel de controle no fluxo dos íons (Zhang *et al.*, 2013). Já o anel interno é formado por resíduos conservados (DEKA) presentes em todos os domínios, agindo como seletor iônico do canal, possibilitando apenas a passagem de íons de sódio (Zhang *et al.*, 2013)(Lera Ruiz, De e Kraus, 2015) (**Figura 4**).

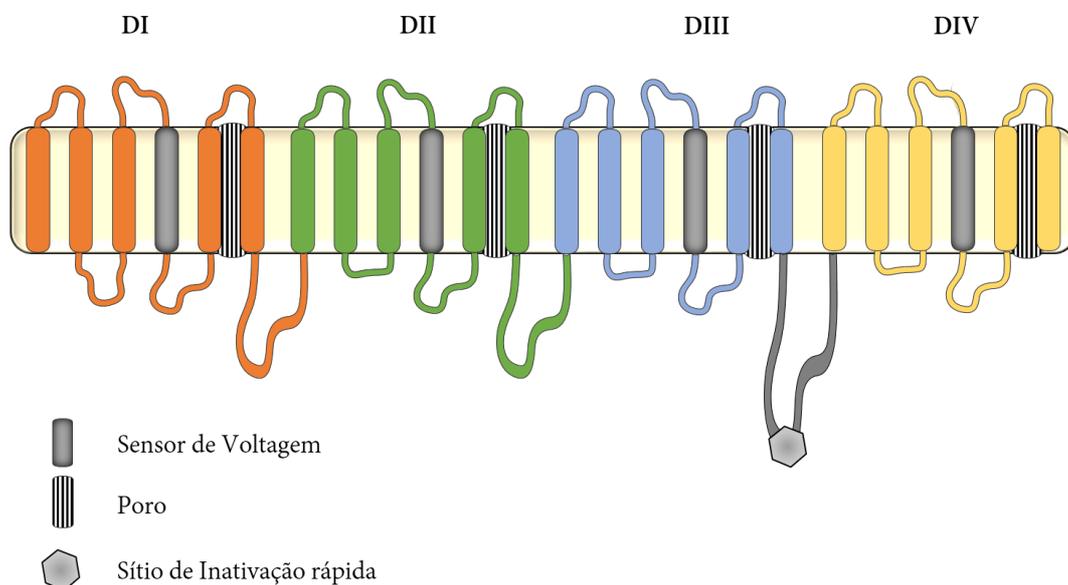


Figura 4 Estrutura do canal de sódio dependente de voltagem (Nav). Coloridos estão representados os domínios (I-IV) da subunidade principal (α). Em destaque cinza está o sensor de voltagem (S4), e, listrado o poro de passagem dos íons de sódio e o hexágono representa o sítio de inativação. Baseado em (Cestèle e Catterall, 2000).

Com o surgimento da técnica de microscopia eletrônica criogênica (*Cryo-EM*), grandes avanços na elucidação da estrutura dos canais iônicos de sódio aconteceram, tendo em vista que grande parte dos estudos realizados previamente eram feitos em canais de bactérias (NavAb), graças a maior facilidade de obtenção de material em grande quantidade para realização dos testes (Payandeh *et al.*, 2011). Já foram resolvidas com o uso das novas metodologias a estrutura dos canais de *Periplaneta americana* (NavPaS), com

36 a 46% de similaridade com subtipos de canais de sódio humanos (Shen *et al.*, 2017), *Electrophorus electricus* (EeNav), com 77% de similaridade com hNav 1.4 (Yan *et al.*, 2017), e mais recentemente o canal cardíaco de rato (rNav 1.5) (Jiang *et al.*, 2020).

O entendimento da estrutura dos canais de sódio dependentes de voltagem vem sendo de extrema importância para a ciência em geral, tendo em vista os grandes avanços que serão realizados no entendimento da interação de compostos tais como as neurotoxinas com estes canais, e ainda no auxílio no tratamento de doenças causadas por mutações em canais iônicos.

1.4.2 Cinética de funcionamento

Além de possuir uma estrutura complexa, os canais de sódio dependentes de voltagem possuem uma cinética de funcionamento bastante singular. Estes canais são encontrados em três estados diferentes, sendo eles fechado, aberto e inativado, existindo ainda um estado chamado de S2 transitório (Clairfeuille *et al.*, 2019; Goldschen-Ohm *et al.*, 2013). No estado fechado os quatro sensores de voltagem (S4) estão posicionados na região intracelular com o portão de inativação (IFM) aberto, impossibilitando a passagem dos íons pela estrutura do canal.

Após a despolarização, os sensores de voltagem se deslocam para região extracelular graças a dilatações do anel presentes na regiões S4-S5, modificando o campo elétrico e a conformação do canal, colocando o mesmo estado aberto, permitindo a passagem dos íons de sódio (Kasimova, Granata e Carnevale, 2016; Yan *et al.*, 2017). Neste estado, apenas três sensores de voltagem (S4) estão na região extracelular (S4 DI, DII e DII), mantendo o sensor de voltagem do domínio VI na posição intracelular. Assim que sensor de voltagem do domínio IV se movimenta, ocorre o deslocamento do portão de inativação (IFM), que se incorpora à região formada pelo segmento S6 do domínio III e S5-S6 do domínio IV, formando uma ligação estável que impossibilita a passagem dos íons de sódio e água, tornando o canal inativo (**Figura 5**) (Goldschen-Ohm *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2020). No estado transitório S2 os quatro sensores de voltagem estão na região externa e sítio de inativação rápida ainda se encontra em movimento (Goldschen-Ohm *et al.*, 2013), sendo a

passagem entre os estados é fundamental para o funcionamento correto dos canais de sódio.

A passagem do estado aberto para o estado inativado gera um processo chamado de inativação (“*steady-state inactivation*”), caracterizado pelo deslocamento do sensor de voltagem do domínio IV para a região extracelular e do fechamento do portão de inativação (Goldschen-Ohm *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2020). Já do estado inativado para o estado fechado temos o processo de desativação (“*recovery from inactivation*”), que visa recuperar o canal para um novo processo de estímulo, restabelecendo a estrutura do canal de sódio para seu estado inicial de funcionamento (**Figura 5**) (Goldschen-Ohm *et al.*, 2013) .

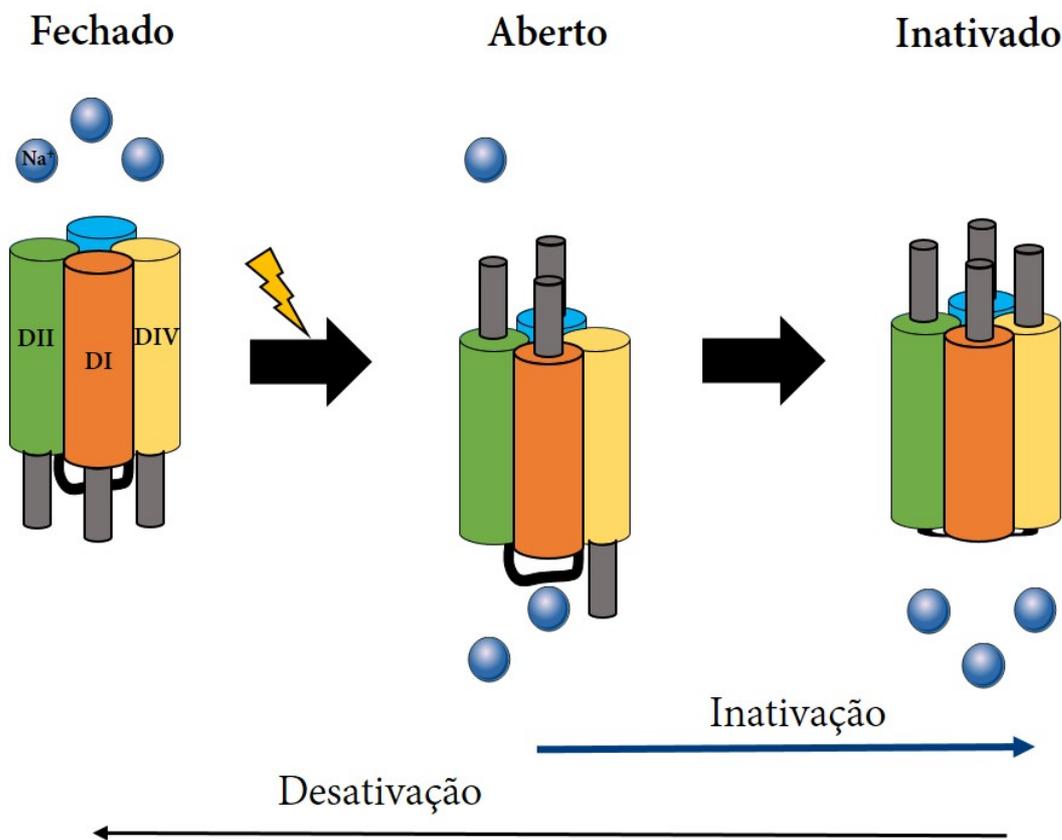


Figura 5 Cinética dos Canais de sódio dependentes de Voltagem (Nav). Demonstração da cinética de funcionamento dos canais de sódio dependentes de voltagem nos seus três estados fundamentais. Em cinza estão os sensores de voltagem (S4) de cada domínio, e os círculos azuis representam os íons de sódio que atravessam o canal. O raio simboliza o processo de despolarização. Baseado em (Goldschen-Ohm *et al.*, 2013).

1.4.3 Subtipos de canais

Foram descrito nove subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem em humanos e cerca de 100 outros tipos de canais dentre insetos, bactérias e outros animais (Bagal *et al.*, 2015; Escalon e Possani, 2013). Nos mamíferos, os canais de sódio são divididos em nove isoformas ou subtipos, cada uma com uma atividade e localização específicas. As isoformas Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3 e Nav 1.6 são expressas no Sistema Nervoso Central (SNC), o subtipo Nav 1.4 nos músculos esqueléticos, o Nav1.5 no músculo cardíaco e os subtipos Nav 1.7, Nav 1.8 e 1.9 em nervos do Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Figura 6) (Goldin, 2002). Tais isoformas se diferenciam devido a modificações pontuais em suas sequências de aminoácidos, o que proporciona diferenças de funcionamento para cada subtipo (Huang *et al.*, 2017).

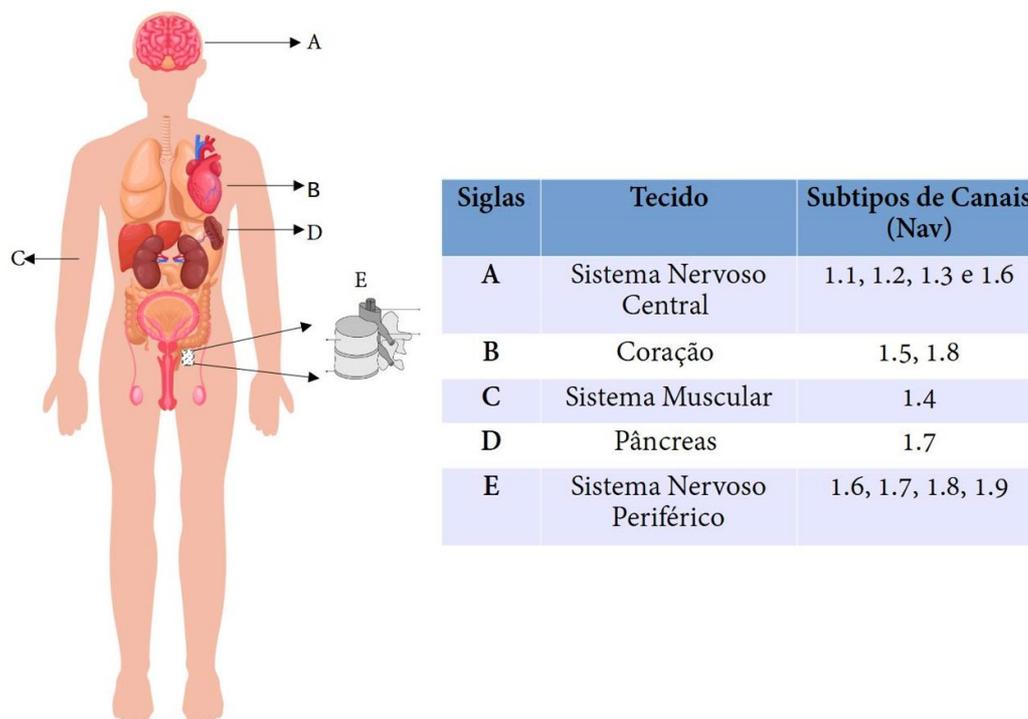


Figura 6 Localização dos subtipos dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) em humanos. Baseado em (Lera Ruiz, De e Kraus, 2015).

1.4.4 Canalopatias

Diversas doenças estão relacionadas a mutações pontuais nos genes responsáveis pela expressão dos canais de sódios, conhecidas como canalopatias (Clare JJ, Tate, SN, Nobbs, 2000). Com isso, surgiu o interesse em

entender os efeitos eletrofisiológicos causados por essas mudanças, com intuito de buscar novos compostos capazes de reduzir ou cessar tais sequelas. Entre as canalopatias mais conhecidas, estão casos de epilepsias relacionadas aos subtipos Nav 1.1, 1.2, 1.3 e 1.6, casos de paralisias musculares ao subtipo Nav 1.4, cardiopatias associadas a Nav 1.5 e as dores extremas/crônicas associadas a mutações no subtipo Nav 1.7(Huang *et al.*, 2017). Além disso, neuropatias também estão associadas a mutações em Nav 1.8 (Catterall, 2012)(Huang *et al.*, 2017) (**Quadro 1**).

Quadro 2 Canalopatias associadas a mutações em diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Baseado em (Huang *et al.*, 2017)

Subtipo de Canal	Gene	Canalopatias
Nav 1.1	SCN1A	Epilepsia generalizada com convulsões febris, encefalopatia epilética, epilepsia infantil tônico crônica, enxaqueca e convulsões febris
Nav 1.2	SCN2A	Convulsões, encefalopatia epilética, epilepsia mioclônica grave da infância, Síndrome de Dravet
Nav 1.3	SCN3A	Epilepsia parcial criptogênica
Nav 1.4	SCN4A	Paramitomia congênita de von Eulenburg, paralisia periódica, miotonia, Síndrome miastênica
Nav 1.5	SCN5A	Bloqueio cardíaco familiar progressivo, Síndrome do QT longo, Síndrome de Brugada, Síndrome do nó sinusal, fibrilação ventricular, Síndrome da morte súbita infantil, paralisia atrial, cardiomiopatias, fibrilação atrial e contração prematura multifocal ectópica (MEPPC)
Nav 1.6	SCN8A	Encefalopatia epilética
Nav 1.7	SCN9A	Eritermalgia primária, dor extrema paroxística, Síndrome de Dravet
Nav 1.8	SCN10A	Neuropatia das pequenas fibras
Nav 1.9	SCN11A	Síndrome da dor familiar episódica

Tendo em vista os problemas causados pelas canalopatias, tem-se buscado cada dia mais novos componentes capazes de inibir ou reverter tais efeitos adversos, sendo uma fonte as secreções animais e peptídios presentes nelas (Greener, 2020). Dentre eles um fármaco que já se destaca é o *Prialt*, composto purificado da peçonha de *Conus magnus*. Um composto advindo da ziconotida que age em canais de cálcio, tem sido utilizado como analgésico para dores intensas e crônicas em paciente que já apresentam resistência a morfina (Pope e Deer, 2013). Outros fármacos vêm sendo produzidos a partir de venenos e peçonhas animais tais como Bivalirudina, Captopril, Eptifibatide, Exenetadina e Tirofiban (Greener, 2020).

1.4.5 Sítios de interação

A partir da descoberta da estrutura dos primeiros canais de sódio nos anos 80 e 90 (Catterall, 1986; Marban, 1998), inicio-se o processo para identificar os alvos moleculares das neurotoxinas, intuito de colaborar no entendimento das características estruturais destes canais e buscar aplicações para estes compostos (Bagal *et al.*, 2015). Primeiramente, foram evidenciados quatro sítios de interação, entretanto com o desenvolvimento de novas pesquisas, o surgimento de novas toxinas e aprimoramento das técnicas para a avaliação de suas atividades, novos locais de interação passaram a ser evidenciados e caracterizados.

O sítio 1 é a região de atuação das toxinas conhecidas como guanidinas heterocíclicas, sendo elas a tetrodoxina (TTX) e a saxitoxina (STX). Essas toxinas se ligam na parte extracelular da membrana do canal de sódio, interrompendo e o bloqueando a condutância de íons (Cestèle e Catterall, 2000). Já no sítio 2 é o local de interação das toxinas lipo-solúveis (veratridina e a batracotoxina). Estas toxinas são capazes de manter os canais de sódio no estado ativado e abertos por um período prolongado, causando alteração na dependência de voltagem do canal para potenciais mais negativos (Catterall, 1986; Cestèle e Catterall, 2000)(Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011).

O sítio 3 é alvo das α -toxinas escorpiônicas e das toxinas de anêmonas. Estas agem diretamente sobre a inativação rápida do canal de sódio, mantendo o sensor de voltagem (S4) na posição intracelular e portão de inativação (IFM) aberto, impossibilitando que o canal possa ser completamente inativado,

permanecendo aberto por um período mais longo (Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011). Já o sítio 4 é alvo das β -toxinas de escorpião. Essas toxinas agem diretamente no sensor de voltagem do canal (S4) do domínio II, mantendo-os aprisionados na posição extracelular, resultando em alterações no potencial de abertura destes canais para potenciais mais hiperpolarizados ou negativos, inibindo as correntes totais (Catterall, 1986; Cestèle e Catterall, 2000) (Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011).

Sobre os sítios 5 e 6, pouco ainda foi descrito, resultando em poucas informações sobre os mesmos. As toxinas que agem no sítio 5 são as toxinas de dinoflagelados marinhos, capazes de deslocar a ativação dos canais para potenciais mais negativos e ainda causar efeitos sobre a inativação rápida. Já o sítio 6 é alvo das δ -conotoxinas, que se ligam ao sensor de voltagem do domínio IV afetando, como ocorre com as alfa toxinas, a inativação rápida destes canais, mantendo os canais no estado aberto por mais tempo (Catterall, 1986; Cestèle e Catterall, 2000; Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011)(Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011).

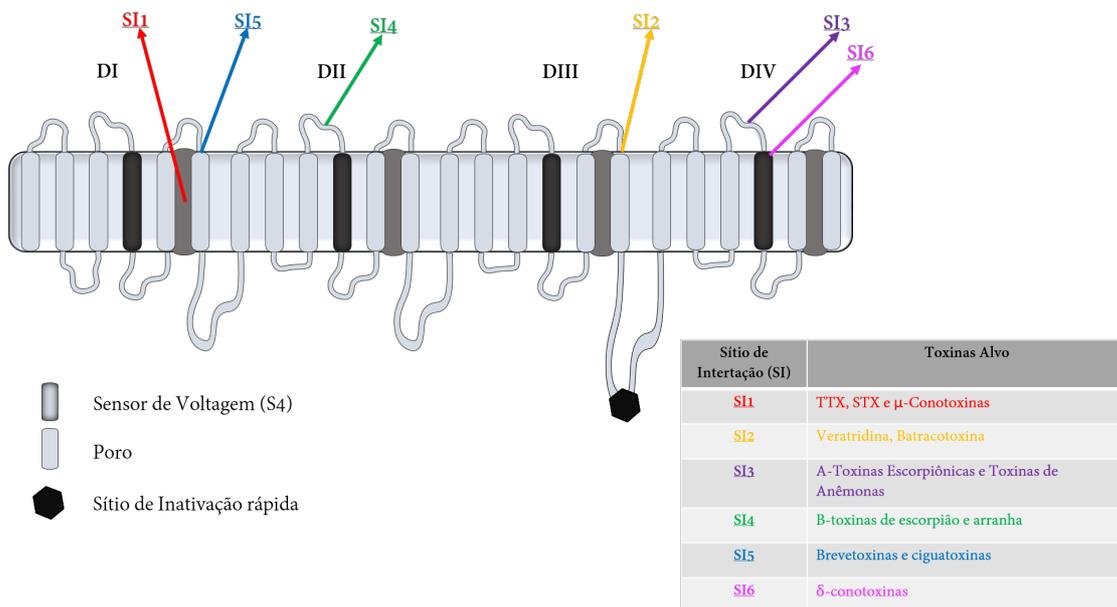


Figura 7 Sítios de interação de diferentes classes de toxinas sobre o canal de sódio dependente de voltagem (Nav). Colorido temos os seis sítios de interação descritos até hoje. Na tabela estão listadas as classes de toxinas que agem com cada sítio de interação específico. Baseado em (Stevens, Peigneur e Tytgat, 2011).

1.5. ELETROFISIOLOGIA

Hodgkin e Huxley foram os primeiros cientistas capazes de explicar a excitabilidade elétrica das células através dos canais de sódio e potássio, proporcionando o entendimento do processo de propagação do potencial de ação (Hodgkin e Huxley, 1990). A partir da descoberta das neurotoxinas capazes de agir sobre estas estruturas, novas características passaram a ser avaliadas, tais como sua seletividade, o modo de interação de diversos componentes e a cinética de funcionamento dos mesmos (Catterall, 1986, 2000).

Para analisar o efeito das neurotoxinas sobre os canais iônicos, foram desenvolvidas novas metodologias capazes de avaliar o potencial elétrico destas estruturas, surgindo assim a técnica de *patch clamp*. Criada em 1976 por Erwin Neher e Bert Sakmann, a técnica de *patch clamp* tornou-se um marco na comunidade científica, graças a sua capacidade de medir pequenas quantidades de corrente e voltagem de diversos tipos de órgãos, tecidos e células, e acompanhar o funcionamento dos mesmos, rendendo assim a ambos pesquisadores o Prêmio Nobel de medicina de 1991 (Kornreich, 2007) (Conforti, 2012). O uso do *patch clamp* também se tornou de extrema importância para a área médica, possibilitando o estudo de diversas doenças, melhorando seu entendimento e o diagnóstico de diversos pacientes acometidos por canalopatias (Kornreich, 2007).

Esta técnica permite, por meio do uso de uma pequena pipeta de vidro e um amplificador, isolar pequenas frações da membrana, estimular e captar os estímulos elétricos gerados com o auxílio de soluções eletrolíticas específicas para cada subtipo de canal (Kornreich, 2007; Ogden e Stanfield, 1981). Desde então, o uso desta técnica vem se tornando fundamental e imprescindível para a elucidação do efeito de compostos capazes de agir sobre os canais iônicos, tendo também como foco os peptídeos purificados de peçonhas e venenos animais.

As neurotoxinas de escorpião são o grande foco dos estudos eletrofisiológicos realizados até o momento, sendo as que agem em canais de sódio as de maior importância, tendo em vista sua grande capacidade de interferir na função das células, sendo as maiores responsáveis pelos sintomas causados pelo envenenamento (Tobassum *et al.*, 2020). Entretanto, apesar da

sua importância pouco ainda se avançou em relação aos métodos de análises utilizados para avaliar e comparar o efeito destas toxinas, demonstrando assim a necessidade de avanço na geração de novos meios de caracterizar os efeitos delas sobre os diferentes subtipos de canais de sódio, e ainda corroborando com a necessidade da realização cada vez mais de ensaios com estes compostos. Em relação as β -toxinas já existe uma padronização dos modos de análise e comparação, utilizando dados de inibição de corrente e alteração no potencial de abertura. Entretanto para as α -toxinas pouco ainda foi padronizado, o que dificulta a comparação do efeito entre diferentes toxinas, e o seu efeito sobre diferentes isoformas de canais de sódio dependentes de voltagem.

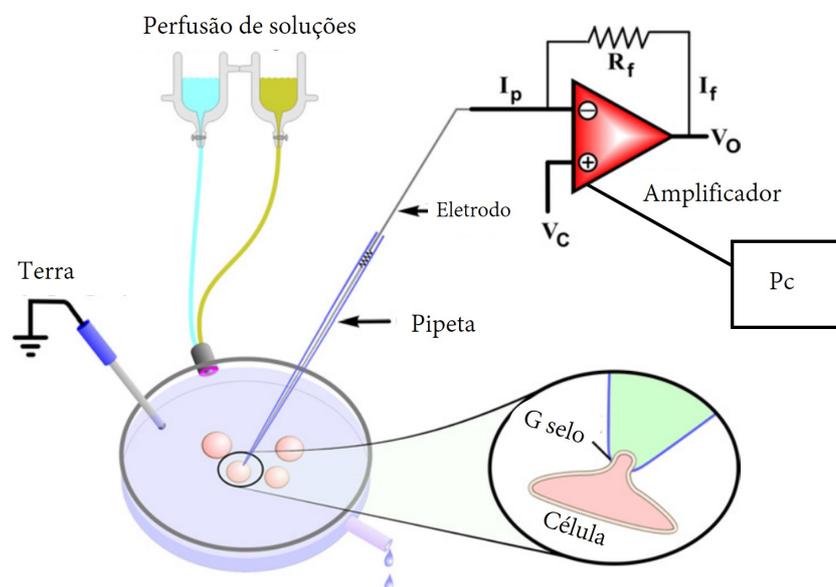


Figura 8 Esquema simplificado do sistema de *patch clamp*. Adaptado de Conforti, 2012.

2. JUSTIFICATIVA

Cada vez mais tem-se buscado novos compostos capazes de auxiliar e melhorar o desenvolvimento de fármacos capazes de aperfeiçoar o tratamento de diversa doenças. As peçonhas e venenos de animais tem se mostrado uma grande fonte de compostos farmacológicos, tendo em vista a grande complexidade e diversidade de componentes existentes (Greener, 2020). Dentre estes compostos, os peptídeos são capazes de gerar efeitos antimicrobianos, antifúngicos e ainda alterar o funcionamento dos canais iônicos de sódio, potássio e cálcio.

A caracterização dos efeitos das neurotoxinas por meio do uso de técnicas eletrofisiológicas é o primeiro e mais importante passo para entender os efeitos que estes compostos tendem a causar sobre diferentes tipos de canais e células, de modo a explicar seus mecanismos de ação e seus efeitos fisiológicos, a fim de gerar potenciais novos compostos biotecnológicos e farmacêuticos (Hmed, Serria e Mounir, 2013).

Diversas doenças são advindas de mutações em canais iônicos, alternando o funcionamento dos mesmos. Em relação aos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav), defeitos em diferentes subtipos de canais podem levar ao surgimento de doenças que atingem diferentes regiões do organismo, como epilepsias, cardiopatias graves, paralisias musculares, dores crônicas e encefalopatias, que afetam inúmeras pessoas ao redor do mundo (Bagal *et al.*, 2015).

A partir disso, tem se buscado caracterizar e identificar novos peptídeos capazes de agir sobre canais iônicos de sódio purificados de peçonhas de escorpião, de modo a aumentar cada vez mais o número de toxinas testadas. A elucidação do efeito destes compostos pode ser de grande importância não somente no entendimento que como os mesmos agem, mas para possível geração de novos produtos biotecnológicos e farmacológicos.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a atividade eletrofisiológica das toxinas Tst1 e Tst3 purificadas da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* em diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav 1.1 - 1.7) utilizando a técnica de *patch clamp* no modo *whole cell*.

Objetivos específicos:

- Fracionamento da peçonha bruta de *Tityus stigmurus* e purificação dos peptídeos Tst1 e Tst3 utilizando a técnica de cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC);
- Análise da massa molecular dos compostos obtidos através de espectrometria de massa (MALDI TOF);
- Sequenciamento parcial das neurotoxinas Tst1 e Tst3 utilizando MALDI TOF MS no modo *in source decay* (ISD);
- Caracterização eletrofisiológica das toxinas Tst1 e Ts3 em subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav 1.1 a 1.7) utilizando *patch clamp* no modo *whole cell*;
- Criação de uma nova metodologia de análise para toxinas do tipo α ;

4. MATERIAIS

4.1. Soluções para HPLC

- **4.1.1 - Solução de Acetonitrila (Solução A)**

- Acetonitrila grau HPLC (JT Baker)
- 0,1% de TFA (JT Baker) grau HPLC

- **4.1.2 - H₂O + TFA (Solução B)**

- Água Deionizada (Milli-Q)
- 0,12% de TFA grau HPLC (JT Baker)

4.2. Meios e soluções para cultura de células

- **4.2.1 - Meio para células HEK (*Human Embryonic Kidney*)**

- Meio DMEM (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*)
- 4,5% de Glicose
- 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab)
- 1% de MEM (*Non Essential Aminoacids*)
- Antibiótico G418 (0,4mg/mL) (Sigma)

- **4.2.2 - Meio para células CHO (*Chinese Hamster Ovary*)**

- Meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*)
- 4,5% de Glicose
- 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab)
- Antibiótico G418 (0,5mg/mL) (Sigma)

- **4.2.3 - PBS**

- NaCl 137 mM
 - KCl 2,7 mM
 - Na₂HPO₄.2H₂O 10mM
 - KH₂PO₄ 2mM
- pH 7,4

- **4.2.4 - Tripisina-EDTA**

- Tripisina 2,5g
 - EDTA 0,2 %
- pH 7,4
Diluídos em 1 L de PBS

4.3. Soluções de ensaios eletrofisiológicos

- **4.3.1 - Solução Interna**

- CsF 105 mM
 - CsCl 27 mM
 - NaCl 5 mM
 - MgCl₂ 2 mM
 - EGTA 1 mM
 - HEPES 10 mM
- pH 7,3 corrigido com CsOH.

- **4.3.2 - Solução Externa**

- NaCl 130 mM
 - KCl 5 mM
 - CaCl₂ 2 mM
 - MgCl₂ 2 mM
 - HEPES 10 mM
 - Glicose 10 mM
- pH 7,4 corrigido com NaOH.

5. MÉTODOS

5.1 Purificação dos peptídeos

Os animais da espécie *Tityus stigmurus* foram coletados na região metropolitana de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Foram mantidos em caixas plásticas com água ad libitum e alimentados de forma mensal com grilos e baratas. A coleta da peçonha foi realizada uma vez ao mês, sempre 15 dias após a sua alimentação. Todos os processos foram autorizados pelo ICMBIO (autorização número 41490-1), registrado no SISBio (Sistema de Autorização e Informação a Biodiversidade).

Após o processo de extração, a peçonha bruta foi diluída em água deionizada (Milli-Q) e centrifugada a 20.000 g por 14 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e submetido ao fracionamento utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), injetando 1mg de amostra em uma coluna analítica de fase reversa C18 (250 x 4,60 mm, 4 micron, Phenomenex Inc., EUA). A separação foi feita utilizando um gradiente linear de solução A e B de 0 a 60%, com um fluxo de 1mL/min por 60 minutos monitorada

a 216 nm (detector de rede de fotodiodo). Todas as frações foram coletadas manualmente e secas a vácuo em Speedvac.

Para a purificação dos compostos de interesse, as frações foram submetidas a passos adicionais de cromatografia (recromatografia) utilizando uma coluna Core-Shell Kinetex C18 (Allcrom) com um gradiente linear de solução A e B de 0 a 40% com fluxo de 0,3 mL/min monitorada a 216 nm. Ambas as frações puras foram secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

5.2. Avaliação da Massa Molecular (MW)

As frações de interesse coletadas foram aplicadas em uma placa de MALDI Anchorchip (600 mm) utilizando ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) diluído em uma solução de acetonitrila/água Milli-Q/TFA 3%; 5:4:1 (v:v:v) nas proporções 1:1 e 1:3. A massa molecular média e monoisotópicas de cada amostra foi obtida em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) utilizando o modo linear positivo (LP) e reflexivo (RP), sendo analisada por meio do *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

5.3. Sequenciamento parcial dos peptídeos

O sequenciamento parcial foi realizado utilizando o MALDI-TOF-TOF com o método de *In Source Decay* (ISD). Para isso, amostras foram diluídas em uma solução/matriz redutora de 1,5-diaminonaptaleno (DAN) e colocada sobre a placa de MALDI. Os fragmentos obtidos foram analisados no *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha).

5.4. Quantificação dos peptídeos

A quantificação do material foi realizada utilizando espectrofotômetro (UV 1800, Shimadzu). Os peptídeos foram ressuspensos em 1mL de H₂O deionizada e colocados em uma cubeta de quartzo. Foi feita a leitura do material a 280nm a fim de obter a absorbância do material e então calculada a quantidade de material obtido, utilizando fórmulas demonstradas abaixo:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Abs280}}{\text{ExB}}$$

No qual Abs 280 é a absorvância lida a 280nm, B é o caminho ótico, que neste caso é 1, e E é o coeficiente de extinção molecular da amostra obtido através do site *Expasy* (<https://www.expasy.org/>).

5.5 Predição da estrutura tridimensional

A predição da estrutura tridimensional das toxinas Tst1 e Tst3 foi realizada utilizando o SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) a partir da sequência completa obtidas do cDNA depositadas no UNIPROT (registro Tst1: P56612 e registro Tst3: P0C8X5).

5.6 Caracterização eletrofisiológica

5.6.1 Cultura de células

Foram utilizadas células do tipo HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) expressando canais iônicos do tipo Nav1.1, Nav 1.2, Nav 1.3, Nav 1.4, Nav 1.5 e Nav 1.6. Estas células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de MEM e antibiótico G418 (0,4 mg/mL). Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) expressando canais iônicos Nav 1.7 também foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e antibiótico G418 (0,5 mg/mL). As células foram incubadas em uma estufa com 5% de CO₂, à temperatura constante de 37 °C. A cada 48 horas, o meio de cultura era retirado, as células eram lavadas com solução de PBS, desaderidas com tripsina e passadas para um novo frasco de cultivo com meio novo, a fim de manter o cultivo das células estáveis.

5.6.2 Ensaios Eletrofisiológicos

A ação eletrofisiológica dos peptídeos purificados foi verificada utilizando a técnica de *patch clamp* no modo *whole cell* (HEKA Patch clamp EPC 10) a temperatura ambiente (21 a 25°C). As micropipetas utilizadas eram constituídas de vidro borossilicato possuindo uma resistência entre 1,5-3,0 MΩ. As mesmas eram preenchidas com solução interna (item 4.3.1) e o banho extracelular era

preenchido com 200 μ L de solução externa (item 4.3.2). Foi utilizado um filtro de 5kHz nos registros de corrente iônicas, uma compensação da resistência em série de 60% uma compensação das correntes capacitivas durante os registros. Foi utilizado um protocolo p/4 (parâmetros: número de vazamentos = 4; atraso de vazamento = 10,0 ms e tamanho do vazamento: 0,250) com um potencial de repouso de -120 mV foi aplicado para cancelar as correntes capacitivas e de vazamento

Os testes eletrofisiológicos foram realizados utilizando um protocolo de três etapas mantendo a célula em um potencial de membrana de -100 mV seguido de um pré-pulso de 30 mV por 5 ms e 27 etapas de despolarização iniciando em -100 mV até +30 mV com um incremento de +5 mV para cada estímulo. Ao final deste processo, as células recebiam um estímulo adicional constante de -10 mV ao final para coletar os dados da inativação, retornando posteriormente ao potencial de repouso. (**Figura 9**).

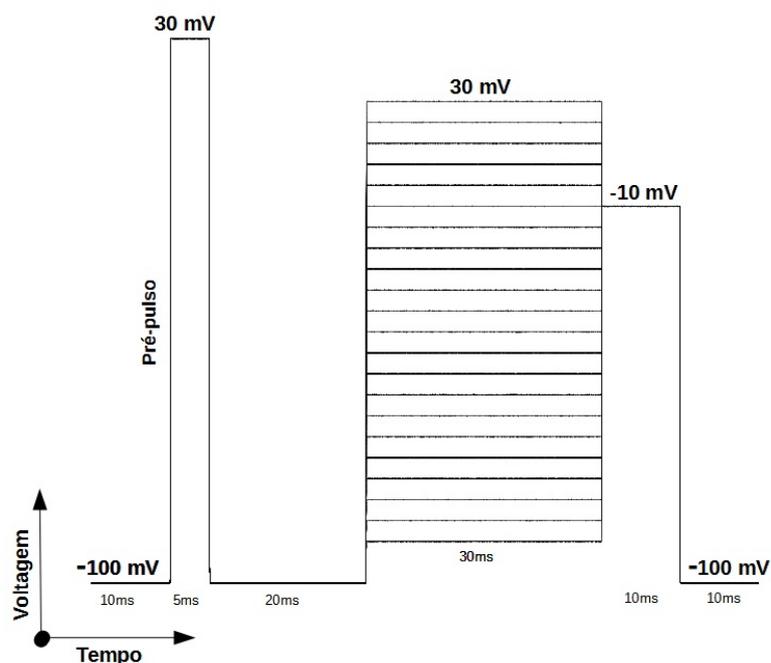


Figura 9 Protocolo de estímulo utilizado nos experimentos de *patch clamp* em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Protocolo utilizado para obtenção dos dados de corrente da ativação e inativação.

Para a avaliação da desativação (*recovery from inactivation*), as correntes foram obtidas através de um protocolo de dois pulsos. A célula foi mantida a -100 mV e estimulada duas vezes a -10 mV por 10 ms. Os pulsos foram repetidos a cada 1 s. O intervalo variava entre 1-80 ms (**Figura 10**)

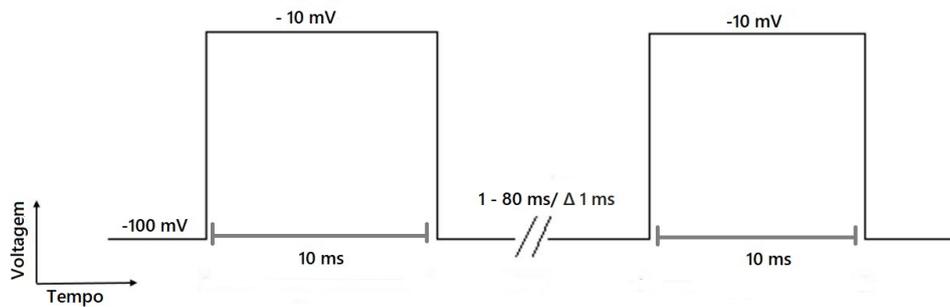


Figura 10 Protocolo para coleta dos dados de corrente para a análise do processo de desativação (“*recovery from inactivation*”).

5.6.3 Análise de dados dos ensaios de eletrofisiologia

Os dados obtidos dos experimentos foram coletados utilizando o *software* FitMaster (Heka Eletronik) e submetidos a análises no programa *Origin8* (Originlab, Northampton, MA, EUA). Para a β -toxina Tst1 foram analisados os parâmetros de inibição de corrente (IC%), alteração no potencial de abertura da ativação e da inativação, variações na recuperação dos canais (τ) e a relação dose-resposta no subtipo Nav 1.3. Já para a α -toxina Tst3 foram avaliados o ganho de corrente (GC%), alteração no potencial de abertura da ativação e da inativação, manutenção incompleta da curva de inativação (I_5/I_{peak}), correspondendo a fração não inibida na inativação, e a diferença na área da curva no estado controle e após a aplicação da toxina.

Para análise da alteração do potencial de abertura da ativação, os dados de corrente por voltagem (I/V) obtidos foram convertidos em condutância por voltagem (G/V) utilizando a **Equação 1** e ajustados em uma função de Boltzmann (**Equação 2**).

$$g = \frac{I_{Na}}{(V - V_{Na})} \quad (1)$$

$$g = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_a)/ka\}}} \quad (2)$$

V_a representa a voltagem na qual metade dos canais se encontram no estado aberto ($V_{1/2}$), ka representa o valor de inclinação da reta, relacionado diretamente à sensibilidade do canal, e V a voltagem. Para avaliar os efeitos

causados pelas toxinas, os dados V_a e k_a e foram comparados durante na fase controle e após a aplicação da toxina.

Para análise de mudanças na inativação, foram utilizados os dados de corrente por voltagem (I/V) ajustados em uma função de Boltzmann (**Equação 3**). Na avaliação da inativação, também foram utilizados os dados de V_i e k_i , para comparar os ensaios na ausência e presença da toxina.

$$i = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_i)/k_i\}}} \quad (3)$$

Os dados de inibição de corrente (IC%) e ganho de corrente (GC%) das toxinas Tst1 e Tst3 respectivamente, foram obtidos utilizando os dados de corrente brutos coletados nos experimentos. A fim de avaliar estes parâmetros, os dados de corrente máxima encontrados na fase após a aplicação da toxina foram divididos pela corrente máxima controle ($I_{toxina}/I_{controle}$), convertidos em porcentagem e comparados através da média. Adicionalmente, para a toxina Tst1 foi realizado uma avaliação da relação dose resposta com o subtipo Nav 1.3. Para isso, foram calculadas as inibições de corrente (IC%) ocasionadas por três concentrações de Tst1 diferentes (1 nM, 10nM e 100nM). Os dados coletados foram analisados em uma regressão não linear com curva dose-resposta (inibição (log (inibidor) vs. resposta - inclinação variável) usando o software GraphPad (La Jotta, CA, EUA, 2007), de modo a obter o seu IC50 (valor da concentração de toxina necessária para reduzir pela metade as macrocorrente de sódio).

Para a avaliação da desativação (“*recovery from inactivation*”), os dados de corrente coletados foram introduzidos em uma função exponencial (**Equação 4**),

$$y = y_0 + y_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (4)$$

no qual, y_0 representa a amplitude inicial de cada ponto na curva, y_1 é a amplitude final, t é o tempo para cada ponto de inativação e τ é a constante de tempo da inativação. Para título de análise, a constante tau (τ) foi comparada entre os dois estados (controle e após a aplicação de 100 nM de Tst1).

Para a toxina do tipo α (Tst3) foram adicionados dois fatores ($\Delta I_5/I_{peak}$ e $\Delta \text{Área}$). Os dados de I_5/I_{peak} visam comparar a fração de canais que não

tiveram sua inativação completa. Foram coletados os dados de corrente máxima no intervalo entre 4,5 e 15 ms após o ponto de despolarização, denominado I5. Os valores de I5 foram divididos pela corrente máxima gerada pela despolarização em voltagem de estímulo (-100 a 30 mV), denominado Ipeak (**Figura 11**). Valores de I5/Ipeak próximos a zero representam a inativação completa do canal, enquanto valores próximos a um mostram que ainda existem uma fração de canais que permanecem abertos, ou seja, inibindo a inativação completa. Para efeito de comparação, foi mensurada a diferença entre os dois estados ($\Delta I5/Ipeak$) em 0mV.

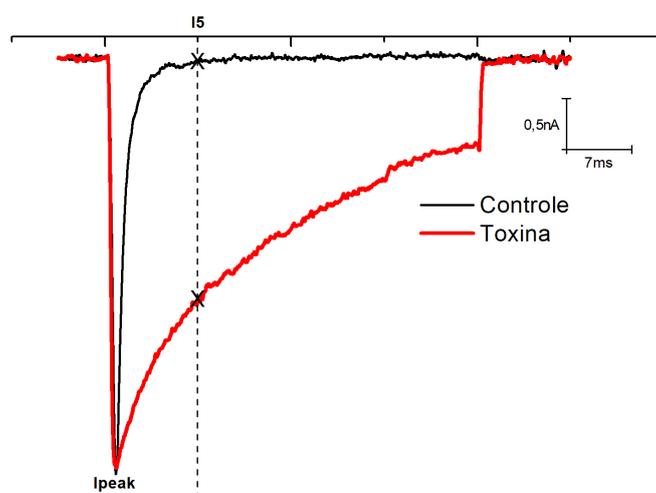


Figura 11 Exemplificação método de coleta dos dados de I5 e Ipeak. Em preto está a fase controle e vermelho a fase após a aplicação de 200nM da toxina Tst3.

Além disso, para toxina Tst3 foi realizada uma metodologia proposta neste trabalho, utilizando a área gerada pelas curvas de corrente. Para isso, foram gerados os traços brutos de corrente a -20 mV na fase controle após a aplicação de 100 nM da toxina Tst1 (**Figura 12**). A partir disso, foi calculada a integral de ambas as curvas, de modo a comparar o efeito da toxina sobre cada subtipo de canal, sendo os dados média e erro padrão utilizados para comparação entre as isoformas.

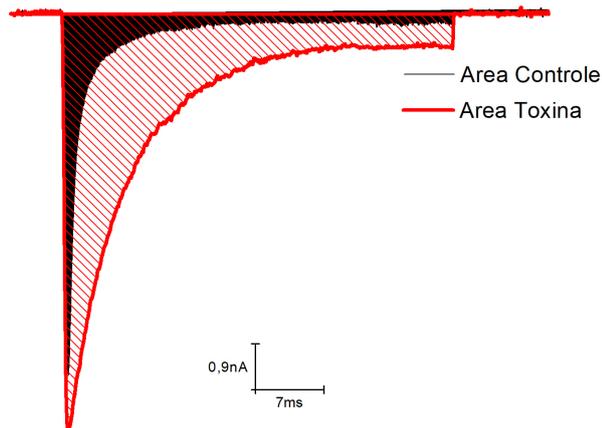


Figura 12 Área da curva em ambos os estados em -20 mV. Em preto a área controle e em vermelho a área com a aplicação de 200nM de Tst3.

5.6.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas usando teste t de Student pareado padrão bicaudal usando o software Graph Pad Prism 5.01 (software GraphPad, La Jotta, CA, EUA, 2007). Os valores das diferenças foram considerados significativos em $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Purificação da peçonha bruta de *T. stigmurus*

A peçonha do escorpião *T. stigmurus* foi fracionada por meio da técnica de RP-HPLC gerando o perfil cromatográfico do material bruto contendo aproximadamente 45 frações (**Figura 9**). As frações de interesse, correspondentes as toxinas Tst1 e Tst3, foram coletadas nas concentrações 40,6% e 34,8% de acetronitrila respectivamente (destaque na **Figura 13**). Após a coleta, ambas as frações foram submetidas a novas etapas de cromatografia (recromatografia), com intuito de gerar materiais puros, como mostrados nas **Figura 14** e **Figura 15**. Foram realizadas dez corridas utilizando o material bruto, sendo injetado 200 μ L em cada, oito corridas de recromatografia para a fração correspondente a toxina Tst3 e doze corridas da fração correspondente a toxina Tst1, gerando um total de 157,23 μ g e 235,4 μ g de peptídeos com alto grau de pureza.

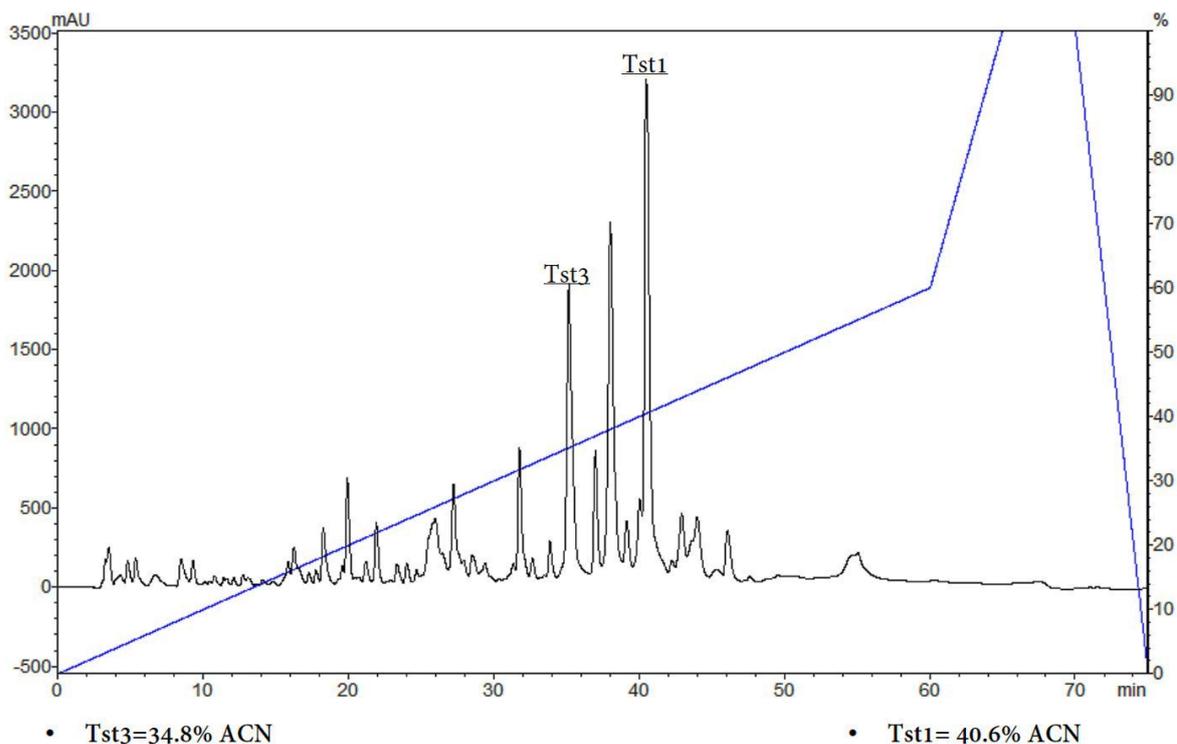


Figura 13 Perfil cromatográfico de 1mg de peçonha bruta de *Tityus stigmurus*. O monitoramento foi feito a 216 nm, sendo a linha azul o gradiente de acetonitrila (ACN) utilizado. Em destaque estão as frações de interesse.

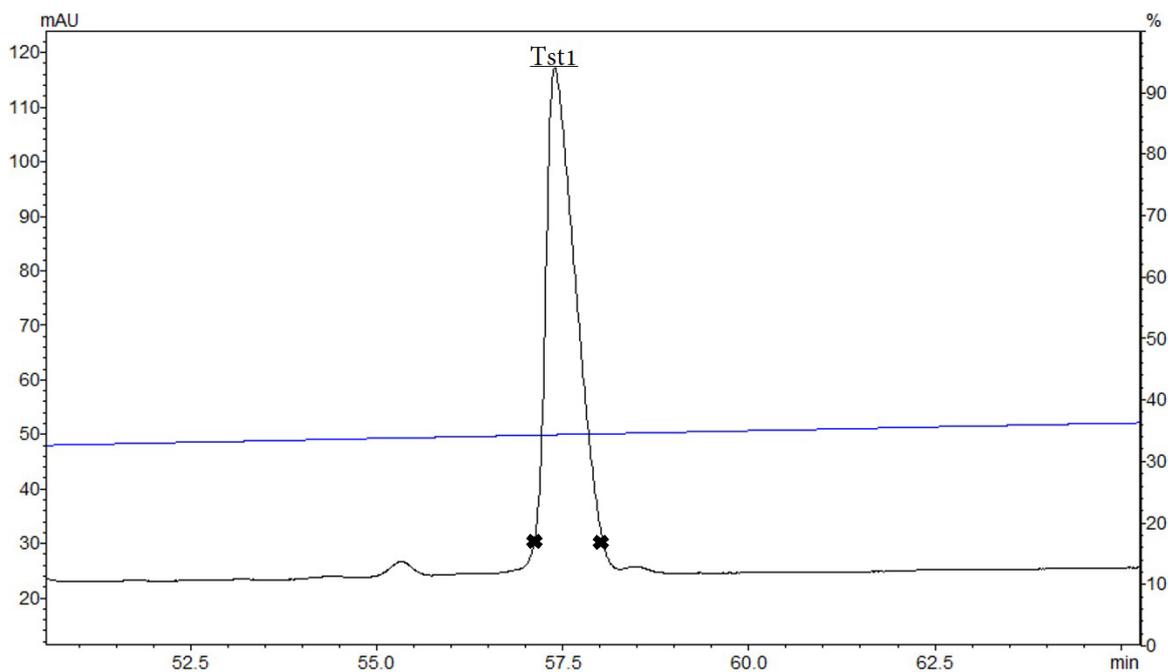


Figura 14 Recromatografia da fração correspondente a toxina Ts1. O pico de maior intensidade representa a fração de interesse aparentemente pura. O X preto representa o ponto inicial e final da coleta manual do pico. O monitoramento foi feito a 216 nm.

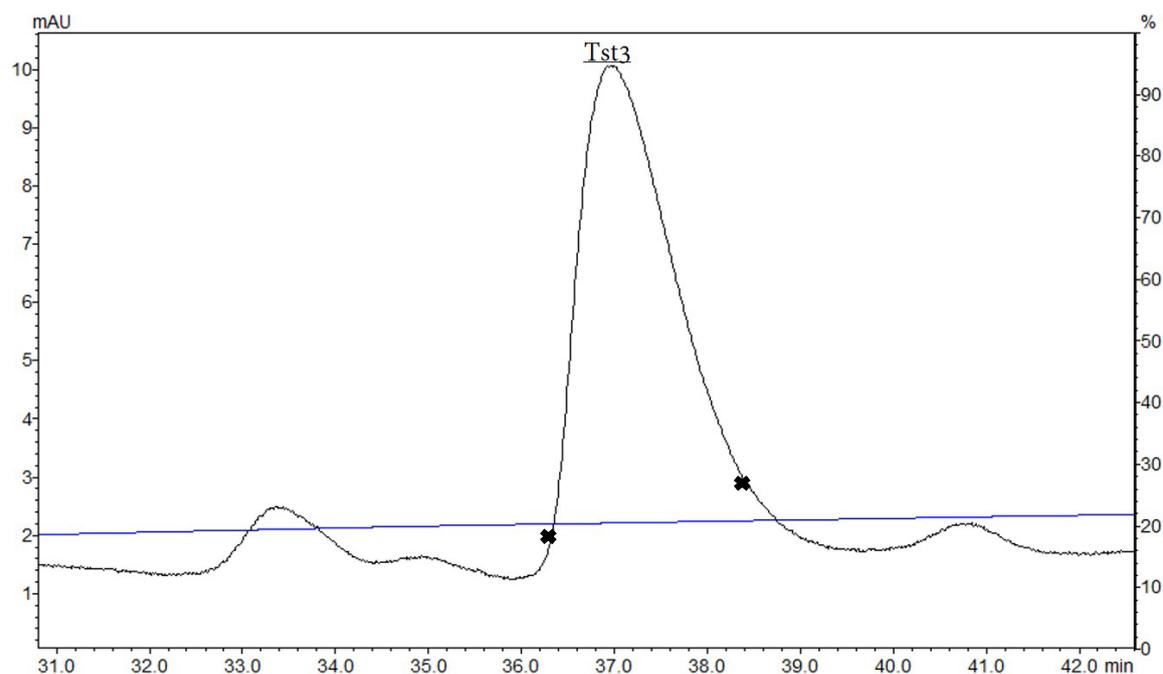


Figura 15 Recromatografia da fração correspondente a toxina Ts3. O pico de maior intensidade representa a fração de interesse aparentemente pura. O X preto representa o ponto inicial e final da coleta manual do pico. O monitoramento foi feito a 216 nm.

6.2 Aquisição massa molecular (MW) e sequenciamento parcial

Ambas as amostras coletadas tiveram sua massa molecular (MW) e sequenciamento parcial analisados através do MALDI TOF. Foram obtidas a massa média e monoisotópica de ambas as amostras, resultando em uma massa média de $[M + H]^+ = 6981,8$ Da, e uma massa monoisotópica de $[M + 2H]^{2+} = 3490,7$ Da para a fração correspondente a Tst1 (**Figura 16**). Já para a fração correspondente a Tst3 foi obtido uma massa média de $[M + H]^+ = 7406,8$ Da, e uma massa monoisotópica de $[M + 2H]^{2+} = 3702,0$ Da (**Figura 17**). Ambas demonstram a presença de apenas dois picos durante a leitura, correspondentes a massa média e monoisotópica, mostrando que as frações se encontravam puras.

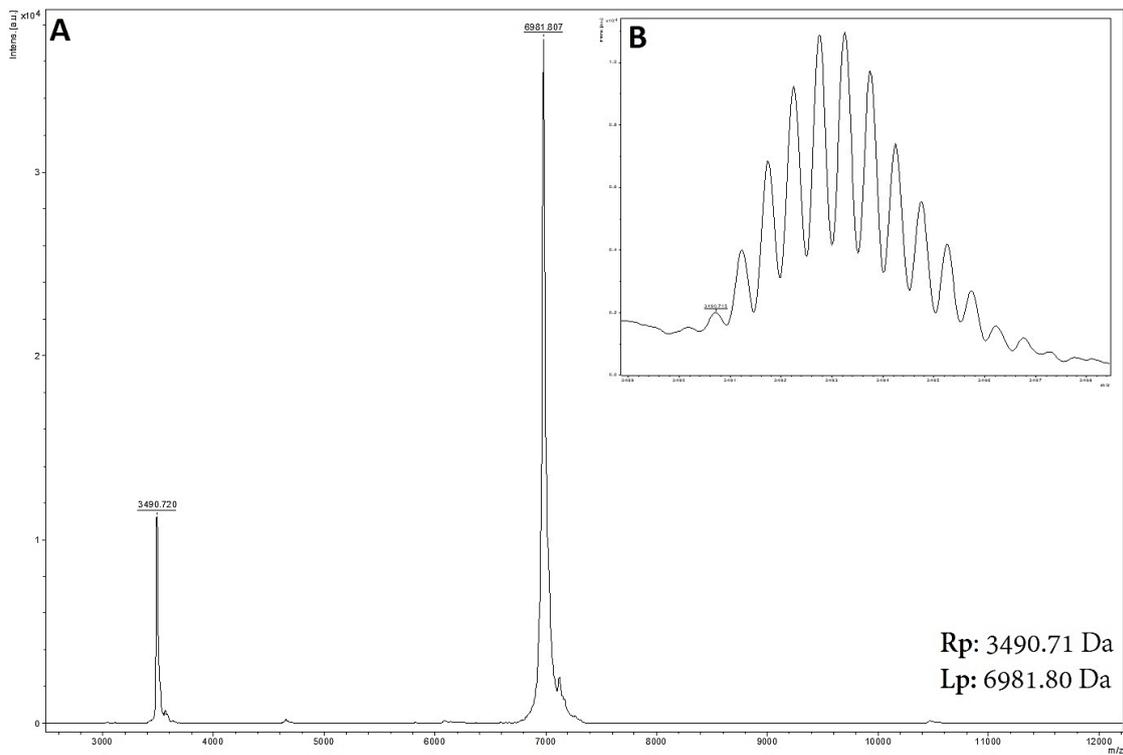


Figura 16 Massa Molecular da fração correspondente à toxina Tst1. (A) Representa a massa média obtida no modo linear (LP). (B) Representa a massa monoisotópica obtida no modo refletivo (RP).

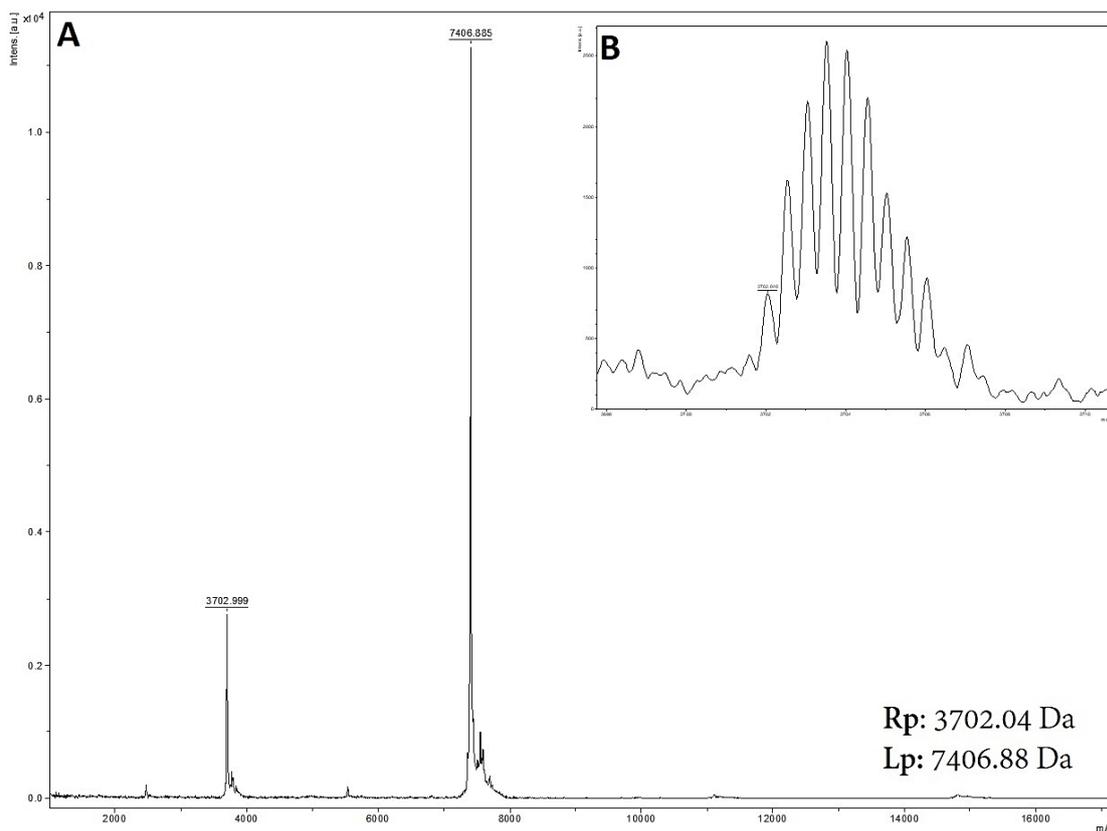


Figura 17 Massa Molecular da fração correspondente a toxina Tst3. (A) Representa a massa média obtida no modo linear (LP). (B) Representa a massa monoisotópica obtida no modo refletivo (RP).

Em relação ao sequenciamento parcial de ambas as frações, foi possível coletar 37 resíduos de aminoácidos divididos em dois fragmentos para a fração correspondente a Tst1 (Figura 19), e 21 resíduos em um fragmento da fração correspondente a toxina Ts3 (Figura 20).

Tst1	GKEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC
PARCIAL	EGCKLSCFIRPSGYCGRECT YCAWPACYCYGLPNWVK
Tst3	KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCKDKKADSGYCYWAHITCYCYGLPDSEPTKTNGKC
PARCIAL	DNCAYICWNYDNAYCDKLCKD

Figura 18 Comparação das sequências parciais obtidas com a sequência peptídica completa das toxinas Tst1 e Tst3 obtidas da biblioteca de cDNA. As sequências parciais mostradas nas Figuras 19 e 20 estão em vermelho.

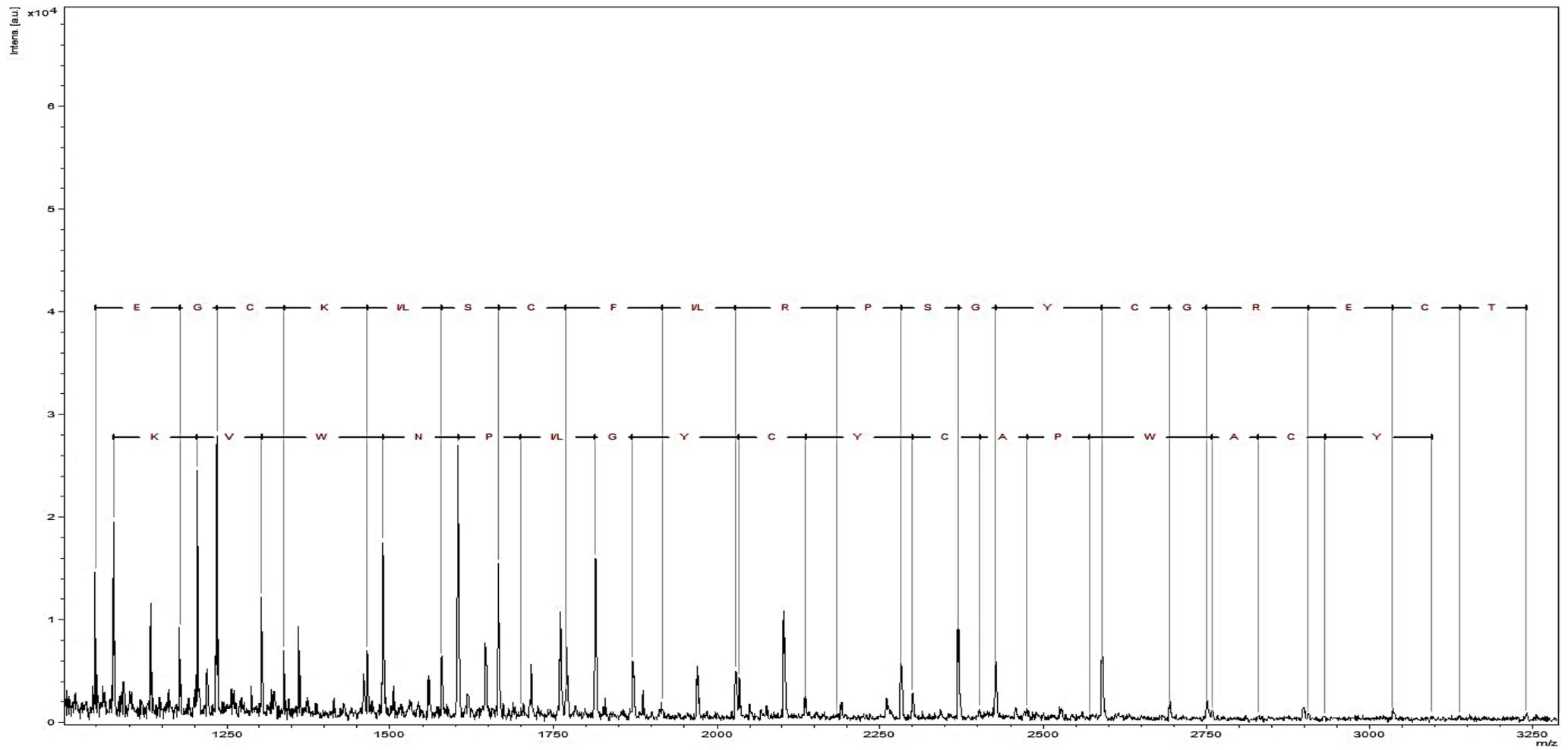


Figura 19 Sequência Parcial da fração correspondente a toxina Tst1. O sequenciamento foi realizado utilizando MALDI TOF no método de ISD. Dois fragmentos foram identificados na amostra. As letras em representam os aminoácidos obtidos.

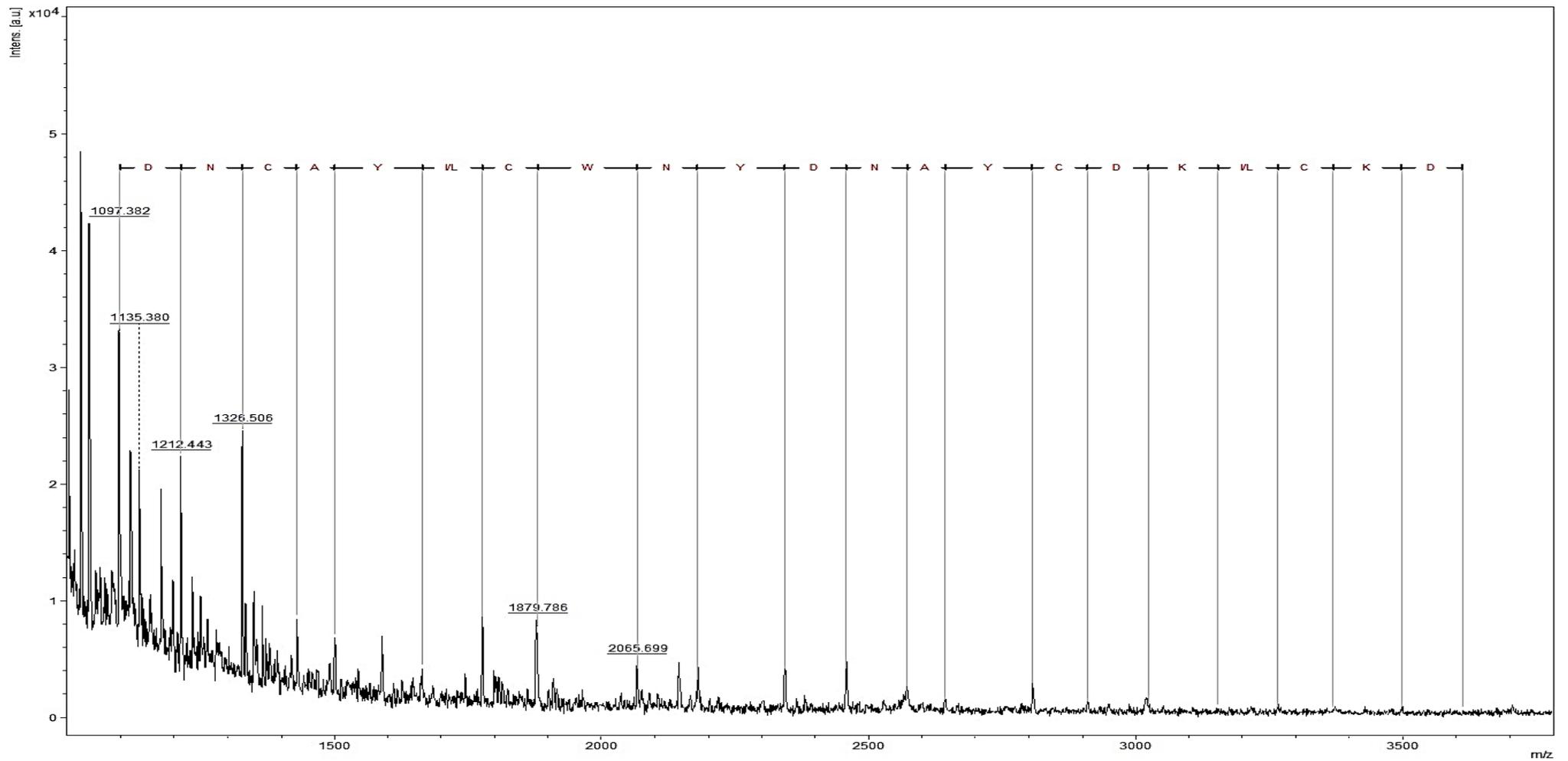


Figura 20 Sequência Parcial da fração correspondente a toxina Tst3. O sequenciamento foi realizado utilizando MALDI TOF no método de ISD. Um fragmento foi identificado na amostra. As letras em representam os aminoácidos obtidos.

6.4 Caracterização Eletrofisiológica

6.4.1) Caracterização eletrofisiológica da toxina Tst1

Após o processo de purificação e identificação das toxinas, iniciou-se o processo de caracterização eletrofisiológica a fim de avaliar a ação destas toxinas sobre diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav).

O primeiro parâmetro analisado para toxina Tst1 foi a inibição de corrente causada (IC%). A isoforma Nav 1.3 (85,23%), Nav 1.2 (67,26%) e Nav 1.4 (63,43%) revelaram uma inibição significativa ($p < 0,05$) ($n=3$), enquanto os outros subtipos testados não foram significativamente afetados pela toxina (**Figura 24**) (**Tabela 1**). Utilizando também o parâmetro de inibição de corrente, foi possível avaliar e gerar uma curva dose resposta da toxina Tst1 com o subtipo Nav 1.3. Foi observado uma diferença significativa ($p < 0,05$) de efeito causando entre as concentrações de 1 nM e 100 nM ($-2,12 \pm 1,5\%$ e $85,23 \pm 0,11\%$ respectivamente), comprovando assim a relação dose-dependência, com um IC50 de 8,79 nM (**Figura 25**).

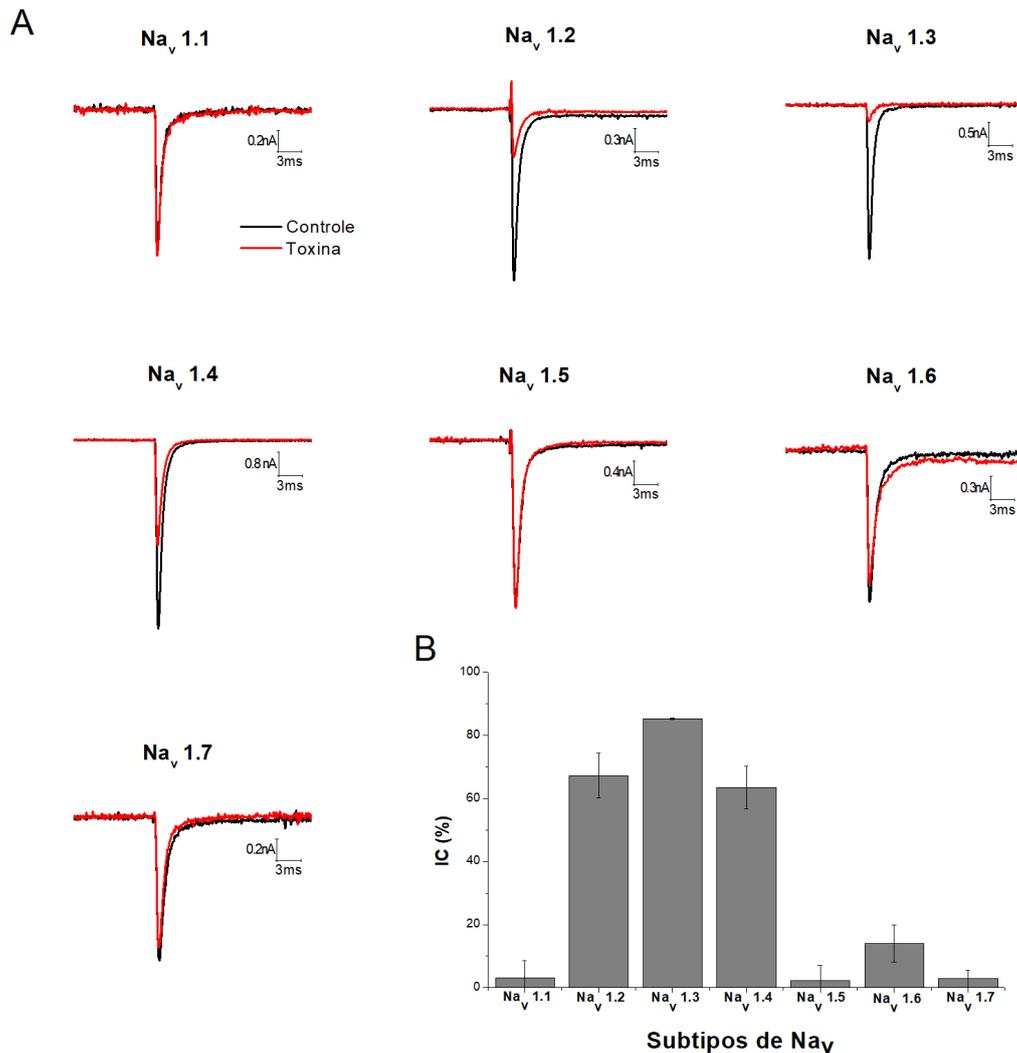


Figura 24 Traços brutos de corrente nos ensaios de patch clamp em diferentes isomorfos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). (A) Traços brutos de corrente em cada subtipo testado. As curvas foram obtidas utilizando a corrente máxima nas seguintes voltagens: Nav 1.1 (0 mV), Nav 1.2 (-5 mV), Nav 1.3 (-5 mV), Nav 1.4 (-10 mV), Nav 1.5 (-10 mV), Nav 1.6 (-5 mV), Nav 1.7 (-10 mV). Em preto estão representadas as curvas controle e vermelho a curva após a aplicação de 100nM de Tst1. (B) Representação gráfica em barras da inibição de corrente (IC%) causada pela toxina Tst1 em cada subtipo de voltagem testado. As barras foram geradas através dos dados da média e erro padrão (n=3).

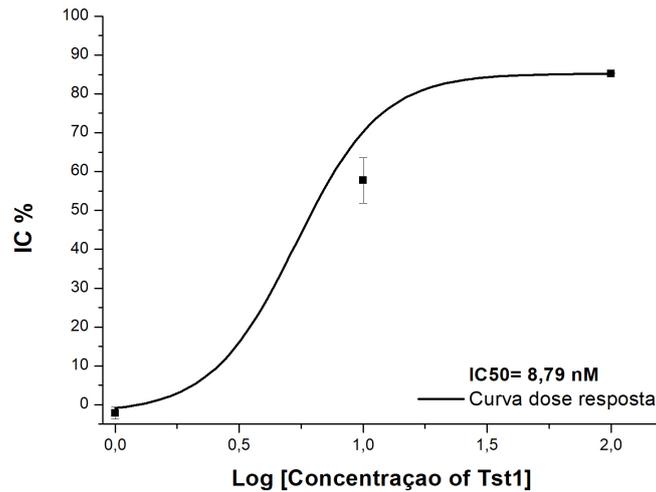


Figura 25 Curva dose-resposta da toxina Tst1 com o subtipo de canal Nav 1.3. IC% representa a inibição de corrente causado nas três diferentes concentrações (1 nM, 10 nM e 100 nM). Os quadrados pretos representam o log da concentração testada (n=3).

Posteriormente foi analisada a alteração no potencial de abertura da ativação, utilizando como parâmetro o $V_{1/2}$ (V_a). Todos os subtipos testados apresentaram alteração significativa no seu potencial ($p < 0,05$), exceto pela isoforma Nav 1.1. O subtipo Nav 1.3 foi o mais afetado com um alteração de aproximadamente -35 mV, acarretando na abertura do canal em potenciais mais negativos (**Figura 26**)(**Tabela 1**).

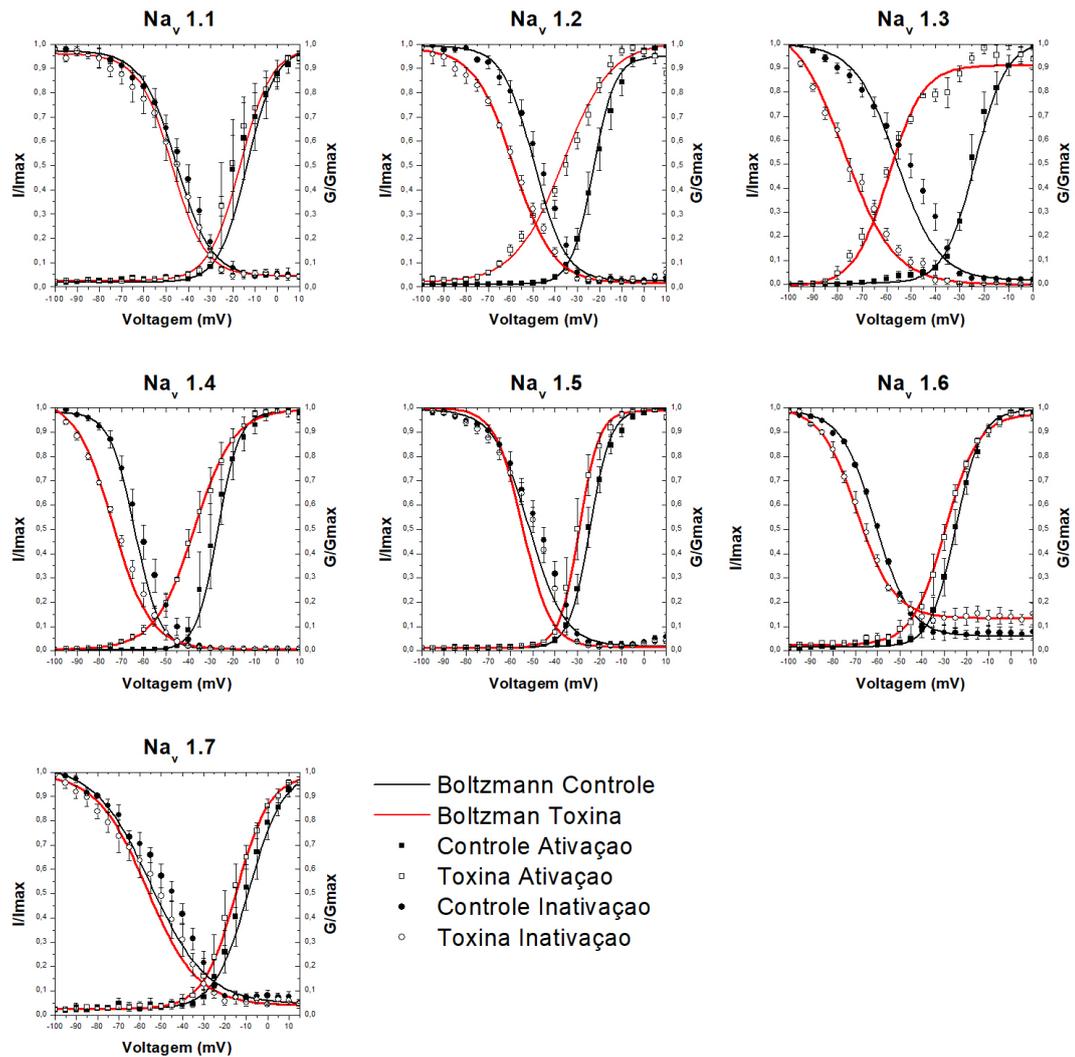


Figura 26 Janela de condutância e corrente obtidos em diferentes subtipos de canais de sódio testados com a toxina Tst1. Representação da alteração no potencial de abertura na ativação e inativação (SSI) para as isoformas testadas. As curvas pretas simbolizam a condição controle e as curvas vermelhas sob aplicação de 100nM da toxina Tst1. Quadrados pretos e brancos representam o a condutância na ativação e círculos pretos e brancos a corrente na inativação. As curvas foram feitas utilizando função de Boltzmann de condutância normalizada (ativação) e corrente normalizada (inativação). Os pontos apresentados representam a média e erro padrão (n=3).

Tabela 1 Dados de inibição de corrente e da alteração do potencial de abertura na ativação.

IC (%) inibição de corrente total em porcentagem; Va é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto; ka é a inclinação da reta na ativação. Os dados são representados com média e erro padrão (n=3).

Subtipos	IC (%)	Va controle (mV)	Va toxina (mV)	ka controle (mV)	ka toxina (mV)
hNav 1.1	-3,06 ±5,47	-13,56 ±1,37	-16,54 ±0,88	6,43 ±0,43	7,08 ±0,39
hNav 1.2	67,26 ±7,06	-22,95 ±1,91	-36,56 ±1,40	4,95 ±0,76	10,81 ±1,07
hNav 1.3	85,23 ±0,11	-24,38 ±0,83	-59,50 ±0,65	5,75 ±0,51	6,87 ±0,42
hNav 1.4	63,43 ±6,75	-26,79 ±1,68	-37,42 ±0,89	4,81 ±0,35	8,99 ±0,58
hNav 1.5	2,19 ±4,89	-24,36 ±1,78	-29,24 ±2,00	4,71 ±0,81	4,48 ±0,70
hNav 1.6	13,94 ±5,91	-24,96 ±1,20	-29,62 ±0,64	5,72 ±0,57	7,45 ±0,42
hNav 1.7	2,81 ±2,81	-8,78 ±0,62	-14,72 ±0,48	8,03 ±0,62	7,81 ±0,30

Em seguida foram analisados os dados da inativação (Vi). Similar à encontrada na ativação, todos os subtipos testados sofreram alteração, com exceção dos subtipos Nav 1.1 e Nav 1.7. Igualmente o subtipo Nav 1.3 foi o mais afetado após aplicação da toxina Tst1, resultando em um alteração de aproximadamente -21 mV (**Figura 26**) (**Tabela 2**).

Tabela 2 Dados da inativação (SSI). Vi é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto durante a fase da inativação; ki é a inclinação da reta na inativação. Os dados são representados com média e erro padrão (n=3).

Subtipos	Vi controle (mV)	Vi toxina (mV)	ki controle (mV)	ki toxina (mV)
hNav 1.1	-45,44 ±0,86	-47,54 ±0,94	7,86 ±0,52	7,48 ±0,51
hNav 1.2	-49,43 ±1,11	-58,57 ±0,56	6,96 ±0,61	8,78 ±0,41
hNav 1.3	-55,77 ±1,11	-77,22 ±1,30	8,56 ±0,56	10,22 ±0,70
hNav 1.4	-63,98 ±1,24	-73,80 ±0,33	5,50 ±0,39	8,35 ±0,36
hNav 1.5	-51,65 ±1,28	-54,54 ±1,32	7,86 ±0,64	6,16 ±0,52
hNav 1.6	-60,90 ±0,30	-69,06 ±0,43	7,69 ±0,23	8,25 ±0,28
hNav 1.7	-54,85 ±1,06	-56,66 ±1,42	13,17 ±0,67	11,85 ±0,85

Por último, foram avaliados o efeito causado pela toxina Tst1 na recuperação dos canais (desativação), levando em consideração a constante de tempo (τ). Os subtipos Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3, Nav 1.4 e Nav 1.6 tiveram um atraso significativo na sua recuperação, já os subtipos Nav 1.1, Nav 1.5 e Nav 1.7 não tiveram alterações significativas. O subtipo Nav 1.3 foi o mais afetado, com um atraso de 10,69 ms com a aplicação da toxina, seguido do subtipo Nav 1.4 (9,61 ms) (**Figura 27**) (**Tabela 3**).

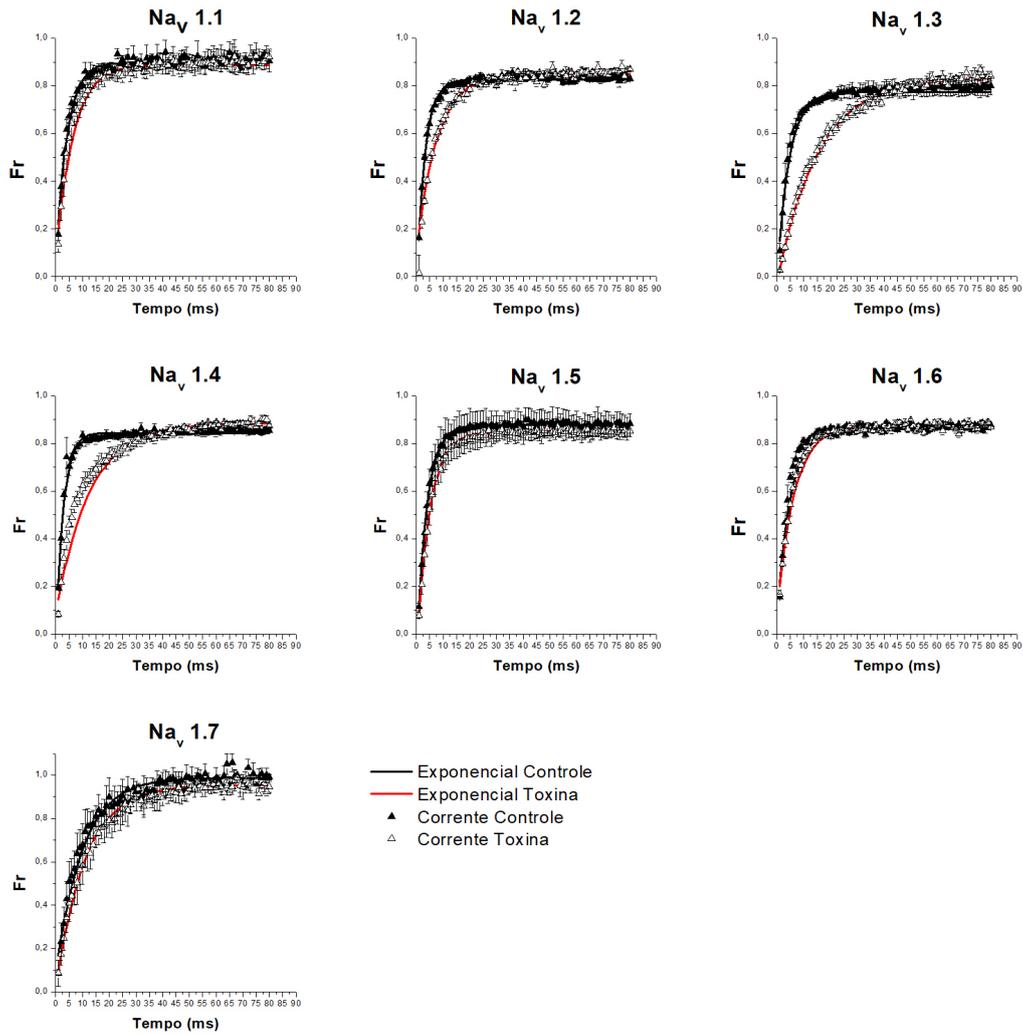


Figura 27 Dados da desativação (“recovery from inactivation”) dos subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem. F_r representa a fração de corrente recuperada em um período de tempo. As curvas foram geradas a partir dos dados normalizados de corrente por tempo e utilizando uma função exponencial. Todos os pontos são representados pela média e erro padrão ($n=3$).

Tabela 3 Resultados da desativação dos subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem. τ representa a constante de tempo para as condições controle e após a aplicação da toxina Tst1 para cada isoforma. Os dados são representados com média e erro padrão (n=3).

Subtipos	τ controle (ms)	τ toxina (ms)
hNa_v 1.1	4,04 ±0,18	6,41 ±0,25
hNa_v 1.2	3,12 ±0,10	7,64 ±0,15
hNa_v 1.3	4,54 ±0,10	15,23 ±0,23
hNa_v 1.4	2,74 ±0,11	12,35 ±0,42
hNa_v 1.5	3,77 ±0,05	4,84 ±0,07
hNa_v 1.6	5,07 ±0,28	6,40 ±0,19
hNa_v 1.7	10,00 ±0,51	10,89 ±0,28

Em relação aos dados de inclinação da reta (k_a e k_i) não foram observadas diferenças significativas, com exceção do subtipo Nav 1.2 que durante a fase de ativação teve uma alteração de aproximadamente 5,8 mV (**Tabela 1**).

6.3.2) Caracterização eletrofisiológica da toxina Tst3

Para a toxina Tst3 foram realizadas algumas análises diferentes, tendo em vista a sua identidade com toxinas do tipo α . Primeiramente foi analisado o ganho de corrente (GC%) causado pela aplicação de 200nM da toxina Tst3. Em nenhum subtipo testado houve um ganho de corrente significativo ($p < 0,05$)(n=3) (**Figura 28**)(**Tabela 4**).

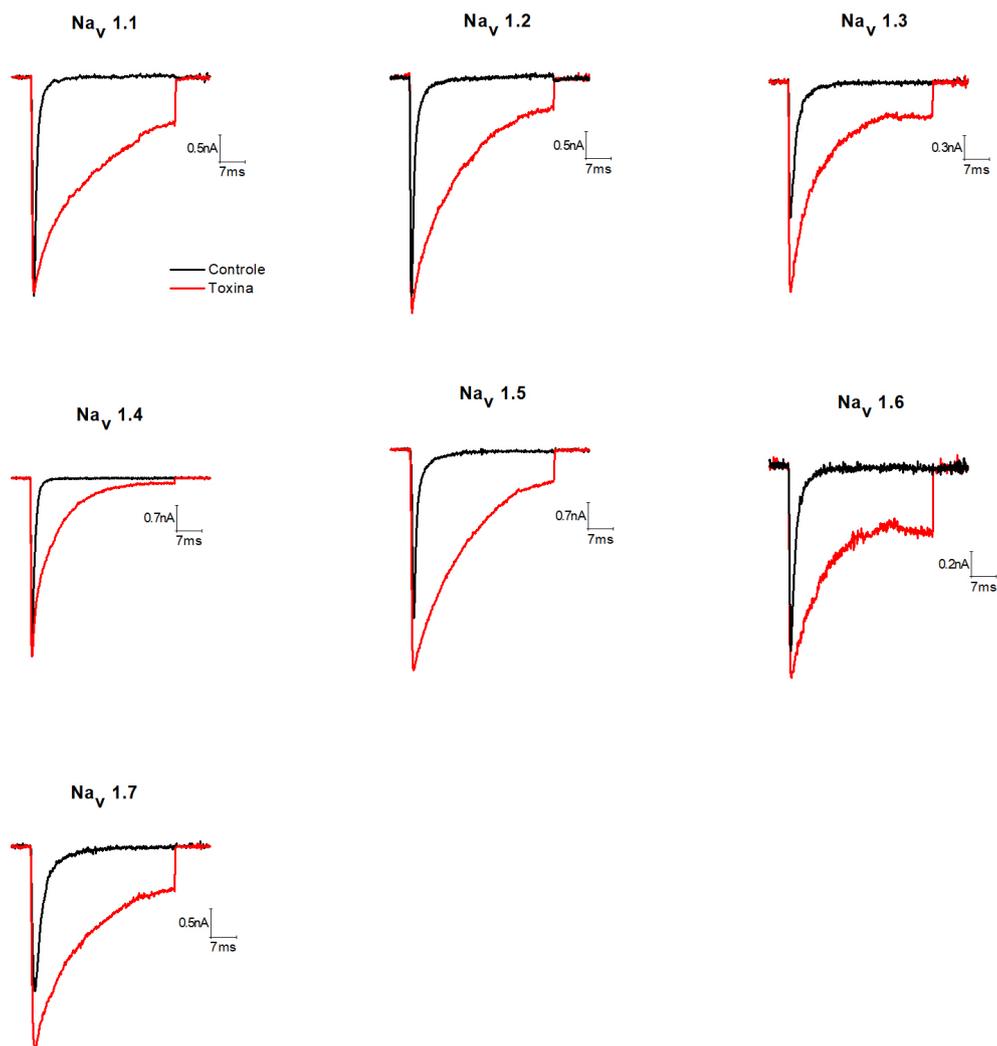


Figura 28 Traços brutos de corrente em subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Em preto estão representados os traços da corrente máxima no controle, e em vermelho o estado após a aplicação de 200 nM da toxina Tst3, ambas a -20 mV (n=3).

Posteriormente foi realizada a análise da alteração do potencial de abertura da ativação, utilizando também como parâmetro o V_a . Todos os subtipos testados demonstraram mudança significativa no potencial de abertura na ativação com exceção do subtipo Nav 1.6. O subtipo mais afetado pela toxina Tst3 foi Nav 1.7 com uma alteração de aproximadamente -14 mV (**Figura 29**) (**Tabela 4**).

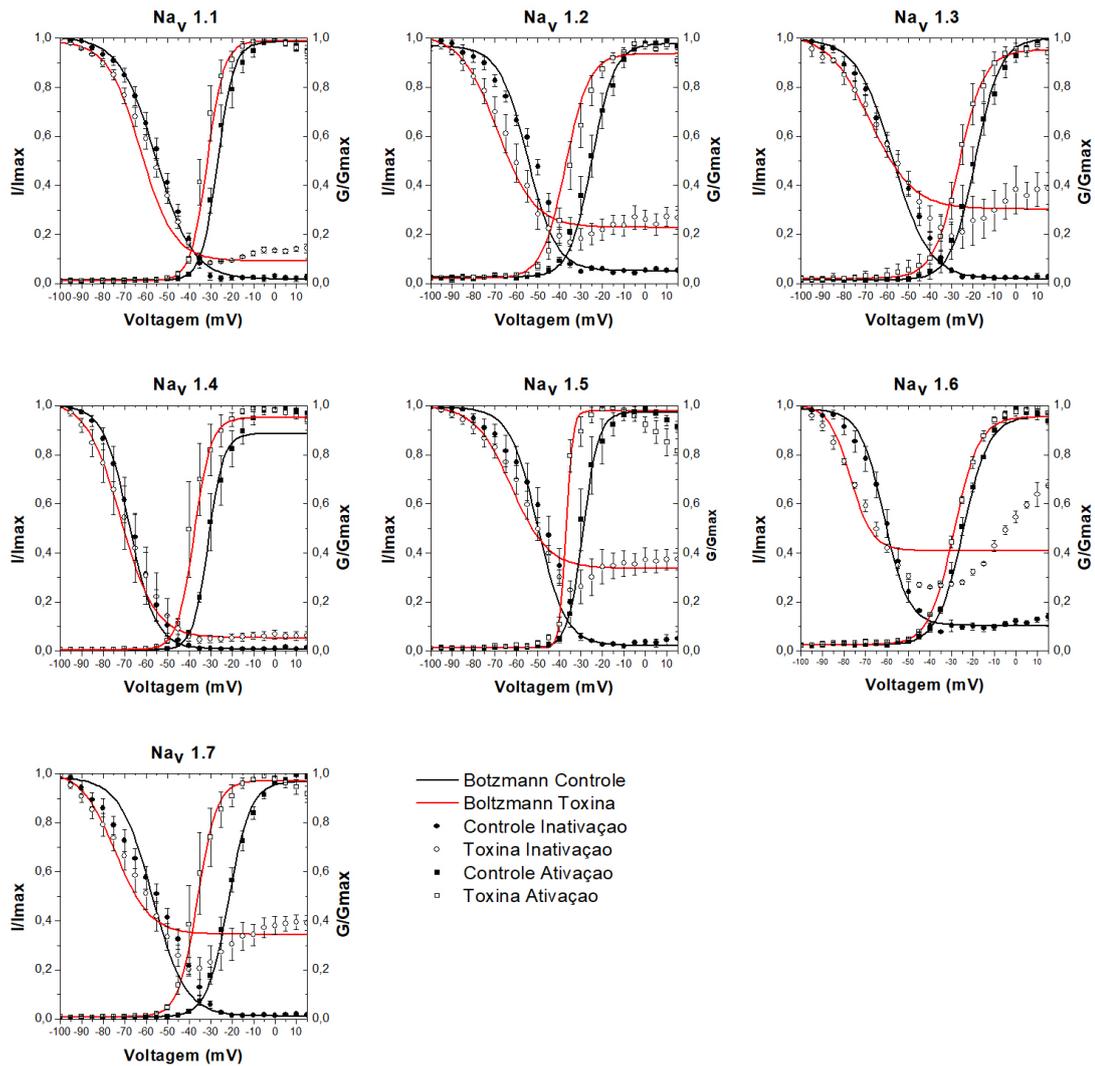


Figura 29 Janela de condutância e corrente obtidos em diferentes subtipos de canais de sódio testados com a toxina Tst3. Representação da alteração no potencial de abertura na ativação e inativação para as isoformas testadas. As curvas pretas simbolizam a condição controle e as curvas vermelhas sob aplicação de 200nM da toxina Tst3. Quadrados pretos e brancos representam o a condutância na ativação e círculos pretos e brancos a corrente na inativação. As curvas foram feitas utilizando função de Boltzmann de condutância normalizada (ativação) e corrente normalizada (inativação). Os pontos apresentados representam a média e erro padrão (n=3).

Tabela 4 Dados de inibição de corrente e da alteração do potencial de abertura na ativação.

GC (%) ganho de corrente total em porcentagem; Va é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto; ka é a inclinação da reta na ativação. Os dados são representados com média e erro padrão (n=3).

Subtipos	GC (%)	Va controle (mV)	Va toxina (mV)	ka controle (mV)	ka toxina (mV)
hNav 1.1	10,30 ±1,25	-26,62 ±0,77	-31,49 ±1,10	3,78 ±0,30	3,89 ±0,39
hNav 1.2	5,34 ±1,70	-24,91 ±2,15	-34,69 ±2,07	5,21 ±0,72	5,70 ±0,76
hNav 1.3	29,69 ±4,47	-18,93 ±1,80	-26,62 ±0,63	5,79 ±1,15	5,90 ±0,45
hNav 1.4	8,48 ±0,96	-31,04 ±3,42	-37,60 ±2,64	3,57 ±1,28	3,94 ±0,81
hNav 1.5	30,05 ±2,96	-28,98 ±2,18	-36,91 ±0,92	3,57 ±0,79	1,52 ±0,50
hNav 1.6	-1,93 ±3,05	-24,97 ±0,60	-28,88 ±0,49	6,00 ±0,35	5,81 ±0,25
hNav 1.7	-6,43 ±16,80	-21,46 ±0,91	-35,98 ±1,67	5,05 ±0,40	4,50 ±0,54

Os dados da fase da inativação também foram analisados para a toxina Tst3. Todos os subtipos testados tiveram a sua inativação alterada de forma significativa, com exceção do subtipo Nav 1.4. O maior efeito foi encontrado também em Nav 1.7 assim como na ativação, causando um alteração de aproximadamente -17 mV, seguido por Nav 1.6 (-15 mV) (**Figura 29**).

Tabela 5 Dados da inativação. Vi é a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto durante a fase da inativação; ki é a inclinação da reta na inativação. Os dados são representados com média e erro padrão (n=3).

Subtipos	Vi controle (mV)	Vi toxina (mV)	ki controle (mV)	ki toxina (mV)
hNav 1.1	-55,32 ±0,61	-62,39 ±1,84	8,51 ±0,37	7,72 ±0,98
hNav 1.2	-54,79 ±0,93	-68,81 ±1,23	6,58 ±0,56	8,64 ±0,94
hNav 1.3	-57,36 ±0,79	-67,85 ±1,49	8,43 ±0,47	9,92 ±1,25
hNav 1.4	-67,58 ±0,77	-71,72 ±0,81	6,06 ±0,25	8,00 ±0,50
hNav 1.5	-50,08 ±1,23	-62,27 ±1,47	6,47 ±0,45	8,55 ±1,03
hNav 1.6	-61,38 ±1,60	-77,11 ±5,32	5,62 ±0,77	5,14 ±6,80
hNav 1.7	-56,97 ±1,43	-74,19 ±2,57	7,58 ±0,70	8,00 ±2,32

Adicionalmente foi avaliado o $\Delta I5/I_{peak}$ para cada subtipo. Todos os subtipos foram significativamente afetados pela toxina Tst3, de modo a não permitir a inativação completa dos canais, mantendo assim os canais ativos por mais tempo e prologando seu potencial de ação, sendo os subtipos mais afetados Nav 1.5, 1.7 e 1.6 respectivamente (**Figura 30**) (**Tabela 6**).

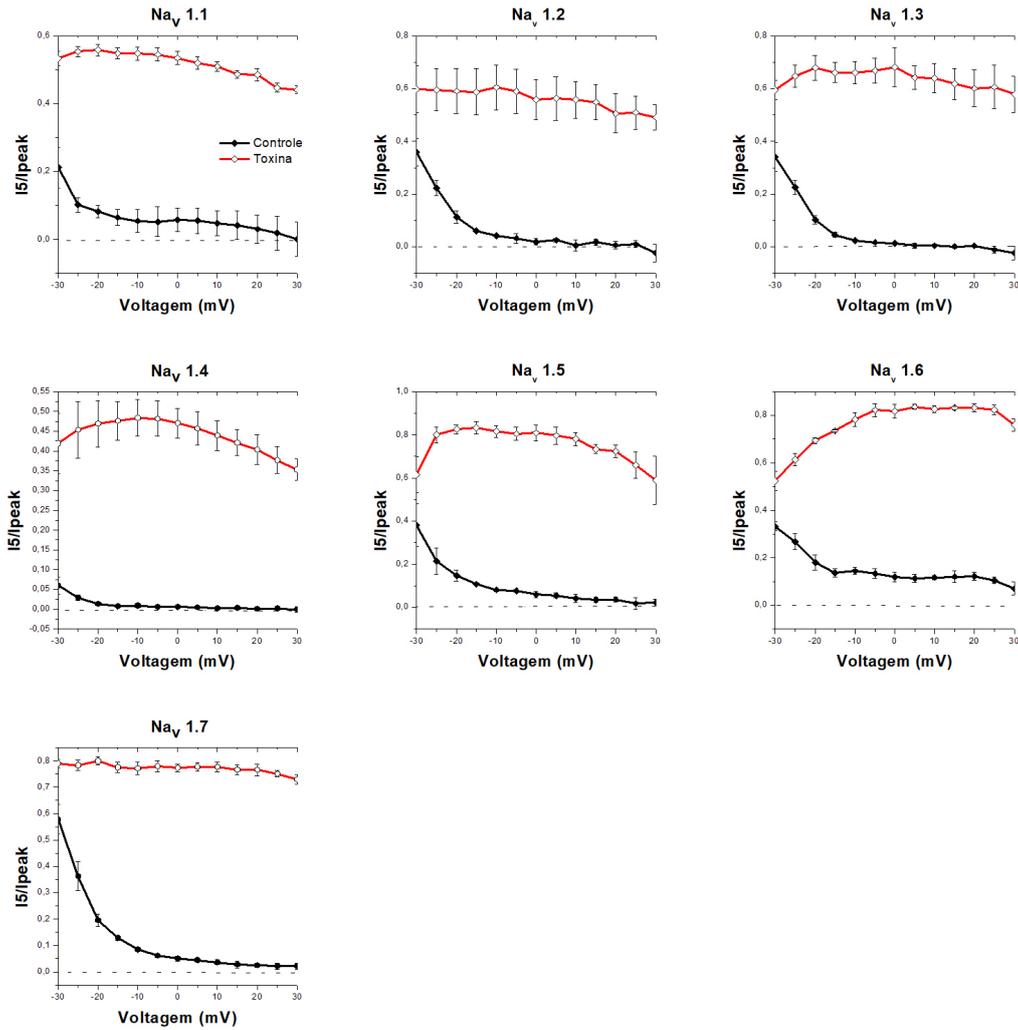


Figura 30 Traços de I_5/I_{peak} nos subtipos de canais de sódio (Na_v). Para a obtenção das curvas foram utilizados os dados de I_5/I_{peak} obtidos em diferentes voltagens (-40 a 30 mV). Em preto está representada a curva controle e em vermelho a curva após a aplicação de 200nM da toxina Tst3.

Tabela 6 Dados de $\Delta I_5/I_{peak}$. Diferença de I_5/I_{peak} na fase controle e após a aplicação da toxina Tst3. Os dados foram obtidos a -0 mV.

Subtipos	$\Delta I_5/I_{peak}$
hNa_v 1.1	$0,47 \pm 0,05$
hNa_v 1.2	$0,53 \pm 0,06$
hNa_v 1.3	$0,61 \pm 0,02$
hNa_v 1.4	$0,43 \pm 0,007$
hNa_v 1.5	$0,77 \pm 0,02$
hNa_v 1.6	$0,69 \pm 0,02$
hNa_v 1.7	$0,72 \pm 0,01$

Para complementar a caracterização do efeito da toxina Tst3, foi realizada a comparação da área gerada pela curva de corrente gerada antes a após a aplicação da toxina Tst3. Todos os subtipos tiveram a área da curva alterada após a aplicação da toxina, entretanto o subtipo Nav 1.3 foi o que teve um maior aumento na área, aumentando cerca de dez vezes (**Tabela 7**). Estes dados demonstram que em todos os subtipos, devido ao aumento da área da curva de corrente, mais íons de sódio entraram para dentro da célula, comprovando que a inativação rápida deste canal foi comprometida, e gerando assim um prolongamento no potencial de ação das células (**Figura 28**).

Tabela 7 Diferença da área em diferentes subtipos. Para a obtenção destes dados foram utilizados os traços de corrente no estado controle e com a aplicação da toxina Tst3.

Subtipos	Δ Área
hNav 1.1	5,61 \pm 1,04
hNav 1.2	6,65 \pm 0,79
hNav 1.3	10,77 \pm 1,05
hNav 1.4	4,8 \pm 0,28
hNav 1.5	7,6 \pm 0,62
hNav 1.6	4,04 \pm 0,38
hNav 1.7	6,24 \pm 0,08

7. DISCUSSÃO

Neste estudo foram amplamente caracterizadas as primeiras toxinas que agem em canais de sódio (NaScTx) purificadas da peçonha de *Tityus stigmurus* em diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). Apesar da importância médica dos acidentes de escorpiões no Brasil, pouco se sabe sobre os efeitos causados pelos compostos presente na peçonha destes animais, tendo como maior causador as neurotoxinas (Furtado *et al.*, 2020). Dentre elas as NaScTxs têm um grande destaque, tendo em vista a grande abundância na peçonha bruta e por serem as grandes responsáveis pelos sintomas causados por acidentes de escorpião, resultando em efeitos em músculos cardíacos, esquelético e neurotóxicos (Lira-da-Silva, Amorim e Brazil, 2000).

O escorpião *Tityus stigmurus* é o responsável pelo maior número acidentes na região Nordeste do país, entretanto poucos estudos foram realizados com objetivo de avaliar a caracterizar as neurotoxinas presentes na sua peçonha (Furtado *et al.*, 2020). Até hoje, apenas três toxinas foram amplamente avaliadas e testadas em canais iônicos, tendo como foco principal

os canais de potássio, sendo elas a toxina Tst17, Tst26 e TstbKtx (Batista *et al.*, 2007; Diego-García *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2009). Já as toxinas que agem em canais de sódio, apesar de já terem sido identificadas e sequenciadas não foram testadas sobre estes canais, impossibilitando assim o entendimento dos seus efeitos.

Análise feita no UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot>, acessado em 20 de Junho 2022) mostram que 87 toxinas do gênero *Tityus* foram registradas, dentre elas apenas quatro do tipo α foram amplamente testadas em canais de sódio, e treze do tipo β (Housley *et al.*, 2017). Do escorpião *Tityus stigmurus*, três toxinas têm maior destaque sendo elas a Tst1 do tipo β , e as toxinas Tst2 e Tst3 do tipo α (Batista *et al.*, 2007; Becerril *et al.*, 1996). A partir dos resultados coletados neste trabalho de sequenciamento parcial e avaliação da massa molecular, foi possível concluir que as toxinas purificadas se tratava das toxinas Tst1 e Tst3 respectivamente (**Figura 18**). As mesmas foram ainda testadas de modo a contribuir para o entendimento do efeito das α e β toxinas em canais iônicos de sódio dependentes de voltagem (Nav).

A fim de comparar o efeito de diferentes toxinas de *Tityus* do tipo NaScTx, foi realizada uma análise de identidade utilizando o BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) a partir da sequência peptídica completa das toxinas Tst1 e Tst3. Como esperado, a toxina Tst1 demonstrou alta identidade com toxinas do tipo β tais como Ts1, Tb1, Tt1g, Tf1a e Tf2 (**Figura 21**). Já a toxina Tst3 apresentou uma identidade elevada com toxinas do tipo α , tais como Ts3, TbTx5, Tf3, Ts17, Tpa4, Ts5, To10, TdNa8 e To9 (**Figura 22**).

7.1 Toxina Tst1

Dentre as toxinas do tipo β , a que apresentou maior identidade com a Tst1 foi a toxina purificada da peçonha de *Tityus serrulatus* Ts1 (96,7%). Esta toxina foi testada em canais de sódio expressos em oócito de *Xenopus laevis*, causando alteração na cinética de ativação nos subtipos Nav 1.2, 1.3, 1.4 e 1.6 na concentração de 100nM. Os subtipos mais afetados foram os Nav 1.6 e Nav 1.3, com uma alteração de -25 mV e -12 mV na ativação respectivamente (Peigneur *et al.*, 2015). Utilizando uma metodologia similar de *patch clamp*, a toxina Tf2, com 75.8% de identidade com a Tst1, provocou efeito apenas em

Nav 1.3, sendo capaz de alterar a o potencial de abertura em -16 mV, em uma concentração de 1 μ M (Camargos *et al.*, 2015).

Testes com outras toxinas em células do tipo HEK e CHO também foram capazes de afeta a cinética de funcionamento dos canais de sódio (Nav). A toxina Tt1g (93,4% de identidade) purificada da peçonha de *T. trivittatus* a 500nM, ocasionou uma inibição de corrente em Nav 1.4 e Nav 1.5, alterando também o potencial de abertura dos subtipos Nav 1.2 e Nav 1.3 para potenciais hiperpolarizados (Coronas *et al.*, 2015). Já a toxina Tf1a (91,8%) de *T. fasciolatus* afetou todos os subtipos testados (Nav 1.1 – 1.7) na concentração de 100nM, alterando o potencial de abertura em Nav 1.6 mais intensamente (-9 mV) (Mata, da *et al.*, 2018). A toxina Tb1 de *T. bahiensis* possui uma identidade de 95% com a toxina Tst1, porém a mesma ainda não foi caracterizada. Como apresentado na **Tabela 8**, apesar da diferença de concentração e metodologias usada nos diferentes ensaios, a isoforma Nav 1.3 tende a ser o mais afetado pelas β -toxinas quando analisado alteração no potencial de abertura, seguido pelo subtipo Nav 1.6. Além disso, na maioria dos casos não há efeitos no subtipo Nav 1.1, com exceção da toxina Tf1a (**Tabela 8**). Ambos subtipos Nav 1.3 e 1.6 são expressos no sistema nervoso central, exercendo função de gerar potenciais de ação (Goldin, 2002), o que corrobora com a neurotoxicidade ocasionada tanto pelos peptídeos purificados quanto pela peçonha bruta dos escorpiões. Além disso, experimentos usando a toxina Tst1 demonstraram uma inativação incompleta em Nav 1.6. A mesma característica neste subtipo, mesmo em condições de controle, já foi observada anteriormente (Hampl *et al.*, 2016). Isso pode ocorrer devido a um problema no comportamento do canal causado pela redução do estado de inativação, devido a um processo de inativação lento, favorecendo a reabertura dos canais com mais facilidade mesmo em voltagens elevadas (Hampl *et al.*, 2016).

Tabela 8 Representação do efeito no potencial de abertura das toxinas relacionadas a Tst1 em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). (-) Representa sem efeito; (+++) Representa o subtipo mais afetado pela toxina; (++) Representa o segundo subtipo mais afetado pela toxina; (+) Representa o subtipo com efeito baixo; (NT) canal não testado.

Toxina	Concentração	Nav 1.1	Nav 1.2	Nav 1.3	Nav 1.4	Nav 1.5	Nav 1.6	Nav 1.7
Tst1	100nM	-	++	+++	+	+	+	+
Ts1	100nM	-	+	++	+	-	+++	-
Tt1g	500nM	-	++	+++	-	-	-	NT
Tf1a	100nM	+	+	+	+	+	+++	++
Tf2	1µM	-	-	+++	-	-	-	-

Como descrito em trabalhos anteriores, aminoácidos em regiões conservadas exercem um papel fundamental na interação e atividade sobre os canais de sódio (Chen e Chung, 2012; Hassani *et al.*, 1999). Observando a **Figura 21**, é possível observar que os aminoácidos chave, destacados em negrito, estão na mesma posição em quase todas as toxinas, com exceção da toxina Tf2, o que podendo explicar a ação análoga destes peptídeos. Comparando a sequência das toxinas Ts1 e Tst1, três aminoácidos são diferentes entre elas, havendo a troca de uma Gly (G) por uma Thr (T) na posição 29 (usando a posição da toxina Tst1 como referência), uma Ile (I) por uma Leu (L) na posição 30, e a presença de Gly (G) na posição 1, que em grande parte das toxinas mostradas não está presente, apenas na toxina Tf2. A primeira alteração (G por T) é a que mais se destaca, uma vez que temos a modificação de um resíduo não polar por um polar. A **Figura 21** também destaca que as modificações que diferenciam essas toxinas normalmente ocorrem em uma região variante (destacada em amarelo), que não está diretamente ligada as regiões de interação, podendo ser responsável pela alteração do grau de interação e atividade destas diferentes toxinas sobre os canais de sódio, necessitando assim de maiores estudos para avaliar estas diferenças.

Em relação à comparação dos subtipos de canais de sódio (Nav), trabalhos anteriores feitos com a toxina CssIV, purificada da peçonha de *Centruroides suffuses* em canais de sódios mutados, mostraram que alterações na região extracelular (loops) dos canais são capazes de modificar e reduzir a interação das toxinas do tipo β com os mesmos, mais especificamente no S5-SS1 do domínio 1, S1-S2 e S3-S4 do domínio 2, e SS2-S6 do domínio 3, tendo dois aminoácidos (Gly845 e Pro783) como fundamental para a ligação (Cestèle *et al.*, 1998). Alinhamentos utilizando a sequência proteica da subunidade alfa

de Nav 1.1,1.2,1.3 e 1.6 obtidos do UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot>) mostram que esses dois aminoácidos estão localizadas na posição indicada, evidenciando assim que ainda não é possível explicar a diferença de interação e ação das toxinas nas diferentes isoformas de canal.

Como evidenciado a toxina Tst1 causou um efeito significativo no subtipo Nav 1.3, sendo capaz de alterar seu potencial de abertura em -35 mV e inibir sua corrente em aproximadamente 85%, sendo a toxina descrita que mais afetou um canal de sódio dependente de voltagem até o momento na concentração de 100 nM levando em consideração o uso de células HEK e os parâmetros utilizados no ensaio eletrofisiológico. Além disso, raramente são realizadas curvas dose-resposta com β -toxinas purificadas de peçonhas de escorpião tendo em vista que estes compostos são moduladores capazes de interferir em funções diferentes do canal de sódio. Porém neste trabalho foi possível realizar uma curva dose-resposta da toxina Tst1, testada em três concentrações diferentes (1 nM, 10 nM e 100 nM) utilizando como parâmetro a inibição de corrente ocasionada no subtipo mais afetado (Nav 1.3). Foi possível demonstrar uma dose-dependência e ainda um IC₅₀ de 8,79 nM, incentivando assim que novos ensaios realizados com toxinas de sódio purificadas de peçonhas de escorpião possam fazer esse novo tipo de análise.

A isoforma Nav 1.3 é codificada pelo gene SCN3A, sendo expressa principalmente no cérebro humano durante o período fetal, diminuindo seus níveis durante o desenvolvimento humano e retornando em casos de lesões nos nervos (Liao *et al.*, 2022). Mutações pontuais já foram descritas e caracterizadas, sendo responsáveis por causar epilepsia, convulsões e má formação cerebral (Helbig e Goldberg, 2022; Huang *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2022). Grande parte dos pacientes afetados por esses problemas possuem resistência e dificuldade no tratamento, justificando a importância na descoberta de novos compostos capazes de agir em Nav 1.3 (Kang, Stouffs e Jansen, 2020).

7.2 Toxina Tst3

Poucas toxinas do tipo α do gênero *Tityus* foram estudadas até o momento, sendo apenas quatro delas amplamente caracterizadas em ensaio eletrofisiológicos (Housley *et al.*, 2017). A toxina Tst3 demonstrou identidade com outras toxinas do tipo α reportadas no banco de dados (**Figura 22**), porém apenas duas (Ts3 e Ts5) já foram caracterizadas em canais de sódio.

A toxina Ts3 (96,7% de identidade com a Tst3) foi testada em duas ocasiões diferentes, sendo a primeira em células do tipo GH3 contendo canais de sódio endógenos, e posteriormente em oócito de *Xenopus laevis* expressando canais do tipo Nav 1.4 (Campos *et al.*, 2008; Campos, Coronas e Beirão, 2004). Nas células GH3 o potencial de ativação foi alterado em -4,2 mV, e a inativação rápida em +5 mV, aumentando também a corrente de sódio gerada a 0,2 μ M (Campos, Coronas e Beirão, 2004). Nos ensaios em Nav 1.4, a toxina Ts3, à 200nM, também demonstrou aumento de corrente, afetando a inativação desse canal (Campos *et al.*, 2008).

Já a toxina Ts5 (77% de identidade com a toxina Tst3) foi caracterizada nos subtipos Nav 1.2-1.8, DmNav (*Drosophila melanogaster*) e NaChBac (*Bacillus halodurans*) também expressos em oócito de *Xenopus laevis* (Pucca *et al.*, 2015). Na concentração de 1 μ M, a toxinas Ts5 inibiu a inativação rápida em todos os subtipos testados, com exceção de Nav 1.8 e NachBac, tendo um efeito considerável em DmNav. A presença desta toxina gerou um aumento de corrente em Nav 1.3 (35,4%) e Nav 1.6 (17,7%), sem alterar o potencial de abertura. Nos canais Nav 1.2-1.7 a curva de inativação se manteve incompleta, porém apenas em Nav 1.3 o potencial da inativação ($V_{1/2}$) foi alterado em -10 mV (Pucca *et al.*, 2015).

Comparando a sequência das toxinas Ts3 e Tst3 duas modificações pontuais são encontradas, a primeira na posição 41 (Valina por uma Alanina) e a segunda na posição 44 (Leucina por uma Treonina). Na primeira alteração é entre aminoácidos do mesmo grupo (apolares), entretanto a segunda ocorre entre um aminoácido apolar e um polar. Porém a **Figura 22** mostra que o grau de identidade entre as toxinas do tipo α é menor que o encontrado para as toxinas β , evidenciando a alta variabilidade e dificultando a comparação tanto de sequência quanto de efeitos causados nos canais de sódio (Nav).

Relacionando a ação das toxinas Ts5 e Tst3, nos dois casos o subtipo Nav 1.2-1.7 mantiveram sua curva da inativação incompleta, porém a toxina Tst3 alterou o potencial na ativação e inativação na maioria dos subtipos testados, com exceção de Nav 1.6 na ativação e Nav 1.4 na inativação, o que não é normalmente observado como efeito das α -toxinas. Entretanto ambas demonstraram um aumento de corrente maior no subtipo Nav 1.3. Os resultados observados demonstram um certo grau de abrangência entre as toxinas α , dificultando a geração de novos fármacos, porém seu estudo ainda é de extrema importância para o entendimento da estrutura e cinética dos canais de sódio. Ainda assim a toxina Ts5 demonstrou uma ação forte em canais de inseto do tipo DmNav (Pucca *et al.*, 2015), indicando assim a necessidade da caracterização do efeito da toxina Tst3 em canais de sódio de insetos.

Estudos utilizando as toxinas BmkM1 e AaH2, purificadas de *Mesobuthus martensii* Karsch e *Androctonus australis* respectivamente, evidenciaram os sítios de interação com os canais de sódio dependentes de voltagem, através de técnicas de mutação e crio-microscopia eletrônica (Clairfeuille *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2003). Entretanto a baixa identidade destas toxinas com as do gênero *Tityus* dificulta a comparação das sequências e da posição destes aminoácidos (**Figura 31**). Porém alguns aminoácidos-chaves descritos estão na mesma posição após a realização do alinhamento, tais como os resíduos aromáticos conservados descritos por Sun *et al.* (2003) (**Figura 31**). Além disso, como descrito por Clairfeuille *et al.* (2019) e Sun *et al.* (2003) a região C-terminal é chave para a formação do complexo toxina/canal, e interfere diretamente no efeito causado pelas α toxinas (Clairfeuille *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2003). Como destacado na **Figura 31**, quando esta região é comparada dentre as toxinas citadas, mudanças importantes são encontradas, dificultando assim o entendimento da interatividade das toxinas com os canais, demonstrando que novos estudos devem ser realizados.

Toxina	Sequência							Id%	
	1	10	20	30	40	50	60	70	
Tst3	KKDG	Y PVE	Y DNCAYICWNYDNAYCDKLC	KDKKADSGYCYWAH	--IT	CYCYGLPDS	---EPTKTNG	-KCKS-	100%
Ts5	-KDG	Y PVEG	DNCAFAFCFGYDNAYCDKLC	KDKKADSGYCVWSP	---DC	YCYGLPEHILKEPTKTS	G-RC---		77%
AaH2	-KDG	Y IVD	DNCTYFCGR-N-AYCNEECTK	LGESGYCQWASPYGNAC	YCYKLPDHVR	---TKGPG	-RCHGR		52,5%
BmKm1	-RDA	Y IAKP	HNCVYECAR-N-EYCNDLCT	KNGAKSGYCQWVGKY	GNGCWCIE	LPDNVP	---IRVPG	-KCHR-	40,6%
	:*. *	.. **	: * . *	* . *	.. * : *	* : *	** :	* : *	

Figura 31 Alinhamento das toxinas de *Tityus* (Tst3 e Ts5) com as toxinas AaH2 e BmKm1. Em destaque amarelo estão as regiões chave para interação das α toxinas com o canal.

Apesar de já descrito os efeitos das α toxinas sobre os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav), o método de análise ainda é algo pouco claro e descritivo, dificultando assim a comparação do efeito entre as próprias toxinas e os diferentes subtipos de canal. Tendo isso em vista, neste estudo está sendo proposto um novo método de avaliação das α toxinas baseadas na área da curva gerada pelos dados de corrente. Esta metodologia tem como objetivo criar um padrão novo de comparação entre as toxinas do tipo α , de modo que futuros trabalhos possam empregar esse novo modelo de análise, facilitando assim o entendimento do efeito das mesmas sobre os canais iônicos de sódio.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram amplamente caracterizadas as primeiras toxinas do tipo NaScTx purificadas da peçonha de *Tityus stigmurus*, denominadas Tst1 e Tst3, em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). A toxina Tst1 demonstrou feitos eletrofisiológicos característico das β -toxinas, alterando o potencial de abertura dos canais de sódio (Nav) e inibindo a corrente dos mesmos, agindo mais intensamente em Nav 1.3. Foi também possível realizar uma curva dose resposta com a toxina Tst1 no subtipo Nav 1.3, o que não é usualmente feito com β -toxinas de escorpião. Já a toxina Tst3 apresentou uma atividade característica das α -toxinas, alterando a inativação dos canais de sódio, prolongando assim seu potencial de ação e tendo efeitos em diferentes isoformas. Além disso, foi proposto um novo método de análise com intuito de adicionar no entendimento das α -toxinas e comparar os seus efeitos das mesmas sobre os diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem.

9. PERSPECTIVAS

- Realização de análises computacionais a fim de esclarecer a especificidade e interatividade das toxinas de escorpião do tipo α e β em diferentes subtipos de canais;
- Realização de ensaios em subtipos de canais de inseto (DmNav);

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, S. *et al.* Scorpion venom: Detriments and benefits. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, p. 1–31, 2020.
- ALBUQUERQUE, C. M. R. DE *et al.* Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 484–489, 8 ago. 2013.
- ALMEIDA, D. D. *et al.* Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 362, 2012.
- ALMEIDA, D. D. *et al.* Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: CDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 113–118, 2013.
- AMORIM-CARMO, B. *et al.* Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide stigmurin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–21, 2019.
- BAGAL, S. K. *et al.* Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 360–366, 2015.
- BATISTA, C. V. F. *et al.* Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 147–157, 2007.
- BECERRIL, B. *et al.* Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **The Biochemical journal**, v. 313, n. 3, p. 753–60, 1 fev. 1996.
- BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 821–835, jun. 1997.
- BERTANI, R.; GIUPPONI, A. P. L.; MORENO-GONZÁLEZ, J. A. **ESCORPIÕES DO BRASIL**. Disponível em: <<https://ecoevo.com.br/escorpioes.php>>. Acesso em: 19 jun. 2022.
- BOSMANS, F. *et al.* Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 142–158, 2007.
- BRAZIL, T. K. *et al.* ESCORPIÕES: BIOLOGIA E ACIDENTES. **Journal of**

Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 1931, n. 91, p. 1–7, 2010.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os Escorpiões**. Salvador: EDUFBA, 2010.

BUTANTAN, I. **Escorpiões: entenda por que eles estão cada vez mais próximos dos homens**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/escorpioes-entenda-por-que-eles-estao-cada-vez-mais-proximos-dos-homens>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

CAMARGOS, T. S. *et al.* The Scorpion Toxin Tf2 from *Tityus fasciolatus* Promotes Nav1.3 Opening. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128578, 17 jun. 2015.

CAMPOS, F. V. *et al.* α -Scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. **Journal of General Physiology**, v. 132, n. 2, p. 251–263, 2008.

CAMPOS, F. V.; CORONAS, F. I. V.; BEIRÃO, P. S. L. Voltage-dependent displacement of the scorpion toxin Ts3 from sodium channels and its implication on the control of inactivation. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 7, p. 1115–1122, 2004.

CATTERALL, W. A. Molecular Properties of Voltage-Sensitive Sodium Channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 953–985, jun. 1986.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 11, p. 2577–2589, 1 jun. 2012.

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, abr. 2000.

CESTÈLE, S. *et al.* Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 919–931, 1998a.

CESTÈLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 883–892, 2000.

CHEN, R.; CHUNG, S. Conserved Functional Surface of Antimammalian Scorpion β -Toxins. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 116, p. 4796–4800, 2012.

CLAIRFEUILLE, T. *et al.* Structural basis of α -scorpion toxin action on Nav channels. **Science**, v. 363, n. 6433, p. 1–25, 2019.

CLARE JJ, TATE, SN, NOBBS, R. M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. **Drug Discov Today**, v. 5, n. 11, p. 506–20, 2000.

CONFORTI, L. **Patch-clamp techniques**. Fourth Ed. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012.

CORDEIRO, F. A. *et al.* Arachnids of medical importance in Brazil: Main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2015.

CORONAS, F. I. V. *et al.* Biochemical and physiological characterization of a new Na⁺-channel specific peptide from the venom of the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. **Peptides**, v. 68, p. 11–16, jun. 2015.

DANIELE-SILVA, A. *et al.* Stigmurin and TsAP-2 from *Tityus stigmurus* scorpion venom: Assessment of structure and therapeutic potential in experimental sepsis. **Toxicon**, v. 121, p. 10–21, 2016.

DANIELE SILVA, A. *et al.* NMR three-dimensional structure of the cationic peptide Stigmurin from *Tityus stigmurus* scorpion venom: In vitro antioxidant and in vivo antibacterial and healing activity. **Peptides**, v. 137, n. January, p. 170478, mar. 2021.

DIEGO-GARCÍA, E. *et al.* Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 1, p. 187–200, 20 jan. 2008.

ESCALON, M. P.; POSSANI, L. D. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, p. 572–587, 2013.

FLETCHER, P. L. *et al.* Action of new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. **Toxicon**, v. 34, n. 11–12, p. 1399–1411, 1996.

FREIRE, M. C. L. C. *et al.* Molecular basis of *Tityus stigmurus* alpha toxin and potassium channel kV1.2 interactions. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 87, p. 197–203, 2018.

FURTADO, A. A. *et al.* Biology, venom composition, and scorpionism induced by brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae): A mini-review. **Toxicon**, v. 185, n. April, p. 36–45, 2020.

GOLDIN, A. L. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 5, p. 575–584, 1 mar. 2002.

GOLDSCHEN-OHM, M. P. *et al.* Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. **Nature Communications**, v. 4, p. 1350, 15 jan. 2013.

GORDON, D. *et al.* Functional Anatomy of Scorpion Toxins Affecting Sodium Channels. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 17, n. 2, p. 131–159, 2 jan. 1998.

GREENER, M. The next generation of venom-based drugs. **Prescriber**, v. 31, n. 4, p. 28–32, 2020.

GUERRERO-VARGAS, J. A. *et al.* Identification and Phylogenetic Analysis of Tityus pachyurus and Tityus obscurus Novel Putative Na⁺-Channel Scorpion Toxins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30478, 15 fev. 2012.

GWEE, M. C. E. *et al.* Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 9, p. 795–801, 2002.

HAMPL, M. *et al.* Sodium channel slow inactivation interferes with open channel block. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2016.

HASSANI, O. *et al.* Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Tsy) from the scorpion Tityus serrulatus. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 1, p. 76–86, 1999.

HELBIG, K. L.; GOLDBERG, E. M. SCN3A- Related Neurodevelopmental Disorder Summary Genetic counseling. **Gene Reviews**, p. 1–24, 2022.

HMED, B.; SERRIA, H. T.; MOUNIR, Z. K. Scorpion peptides: potential use for new drug development. **Journal of toxicology**, v. 2013, p. 958797, 2013.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 52, n. 1–2, p. 25–71, 1990.

HOLADAY, S. K. *et al.* NMR solution structure of butantoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 1, p. 18–27, 2000.

HOUSLEY, D. M. *et al.* Scorpion toxin peptide action at the ion channel subunit level. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 46–78, dez. 2017.

HUANG, W. *et al.* Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels. **Protein & Cell**, v. 8, n. 6, p. 401–438, 1 jun. 2017.

JIANG, D. *et al.* Structure of the Cardiac Sodium Channel. **Cell**, v. 180, n. 1, p.

122- 134.e10, 2020.

KANG, S. K.; STOUFFS, K.; JANSEN, A. E. SCN3A-related neurodevelopmental disorder: A spectrum of epilepsy and brain malformation. **Annals of Neurology**, v. 88, n. 2, p. 348–362, 2020.

KASIMOVA, M. A.; GRANATA, D.; CARNEVALE, V. Voltage-Gated Sodium Channels: Evolutionary History and Distinctive Sequence Features. **Current Topics in Membranes**, v. 78, p. 261–286, 2016.

KORNREICH, B. G. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 9, n. 1, p. 25–37, 2007.

LERARUIZ, M. DE; KRAUS, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 7093–7118, 2015.

LIAO, S. *et al.* Structure and Function of Sodium Channel Nav1.3 in Neurological Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2022.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; BRAZIL, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 239–245, 2000.

LOURENÇO, W. R. What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, p. 1–12, 2015.

MACHADO, R. J. A. *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, jul. 2015.

MACHADO, R. J. A. *et al.* Characterization of TistH, a multifunctional peptide from the scorpion *Tityus stigmurus*: Structure, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Toxicon**, v. 119, p. 362–370, set. 2016.

MARBAN, E. Structure and function of voltage-gated sodium channels. **The Journal of physiology**, v. 508, n. 3, p. 647–657, 1998.

MATA, D. O. DA *et al.* Subtype specificity of β -toxin Tf1a from *Tityus fasciolatus* in voltage gated sodium channels. **Toxins**, 2018.

MELO, E. T. DE *et al.* Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. **Peptides**, v. 68, p. 3–10, jun. 2015.

MELO, M. M. A. *et al.* Structure and in vitro activities of a Copper II-chelating

anionic peptide from the venom of the scorpion *Tityus stigmurus*. **Peptides**, v. 94, p. 91–98, 2017.

MELO, M. M. A. DE *et al.* TanP: A Multifunctional Anionic Peptide From *Tityus stigmurus* Scorpion Venom. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. January, p. 1–14, 2022.

NASCIMENTO, D. G. *et al.* Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 628–639, 2006.

NENCIONI, A. L. A. *et al.* Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 2018.

OGDEN, D.; STANFIELD, P. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. **Currents**, v. 2, n. 7, p. 53–78, 1981.

PAPP, F. *et al.* Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 379–389, 2009.

PARENTE, A. *et al.* Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 161, 18 abr. 2018.

PAYANDEH, J. *et al.* The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 1–7, 10 jul. 2011.

PEIGNEUR, S. *et al.* A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on NaV-type isoforms. **Neuropharmacology**, v. 95, n. April, p. 269–277, ago. 2015.

POPE, J. E.; DEER, T. R. Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 7, p. 957–966, 28 maio 2013.

POSSANI, L. D. *et al.* Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 287–300, set. 1999.

POSSANI, L. D. *et al.* Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 861–868, 2000.

PUCCA, M. B. *et al.* Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8–16, 2015.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. *et al.* Scorpion venom components that affect ion-

channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328–342, dez. 2013.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. 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, dez. 2005.

RODRIGUEZ, M.; REGINA, S. ESCORPIÕES : BIOLOGIA E ACIDENTES. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, 2008.

SANTOS, M. D. DOS *et al.* Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenço, 1997 and notes about males of *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). **ZooKeys**, v. 435, n. 435, p. 49–61, 15 ago. 2014.

SHEN, H. *et al.* Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. **Science**, v. 355, n. 6328, 2017.

SILVA, M. A. *et al.* *Tityus stigmurus* venom causes genetic damage in blood and testicular cells and affects the number and morphology of gametogenic lineage cells in mice. **Toxicon**, v. 185, n. February, p. 114–119, 2020.

SILVA, N. A. *et al.* Effects of *Tityus stigmurus* (Thorell 1876) (Scorpiones: Buthidae) venom in isolated perfused rat kidneys. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. suppl 1, p. 665–675, 29 abr. 2016.

STEVENS, M.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Neurotoxins and Their Binding Areas on Voltage-Gated Sodium Channels. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, n. November 2011, 2011.

STOCKMANN, R. Introduction to Scorpion Biology and Ecology. **Toxinology**, p. 1–29, 2013.

SUN, Y. M. *et al.* Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion β -like toxin BmK M1. The hydrophobic surface region revisited. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24125–24131, 2003.

TOBASSUM, S. *et al.* Nature and applications of scorpion venom: an overview. **Toxin Reviews**, v. 39, n. 3, p. 214–225, 2020.

TORQUATO, S. *et al.* Escorpiões, Aranhas e Serpentes : aspectos gerais e espécies de interesse médico no Estado de Alagoas. 2005.

TORRES-RÊGO, M. *et al.* Biodegradable cross-linked chitosan nanoparticles improve anti-*Candida* and anti-biofilm activity of TistH, a peptide identified in the venom gland of the *Tityus stigmurus* scorpion. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, n. May, p. 109830, 2019.

YAN, Z. *et al.* Structure of the Nav1.4- β 1 Complex from Electric Eel. **Cell**, v. 170, n. 3, p. 470- 482.e11, 2017.

ZHANG, S.; GAO, B.; ZHU, S. Target-Driven Evolution of Scorpion Toxins. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–13, 2015.

ZHANG, X. *et al.* Analysis of the selectivity filter of the voltage-gated sodium channel NavRh. **Cell Research**, v. 23, n. 3, p. 409–422, 2013.