



Fundação Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal



Estudo das propriedades bioquímicas e farmacológicas da peçonha de *Rhopalurus agamemnon*

Ana Carolina Martins Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Biologia Animal da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor.

Brasília, 2021

A todos que colaboraram de maneira direta ou indireta para a conclusão deste trabalho, dedico.

*O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem*

Guimarães Rosa – O Grande Sertão Veredas

Agradecimentos

Agradeço imensamente aos meus pais Ernande e Vibeque pelo apoio e compreensão ao longo desses anos.

Agradeço meu irmão Luiz Henrique pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Agradeço aos amigos que me incentivaram, aconselharam e me fortaleceram quando precisei: Rayssa, Jéssica, João, Manuela e Ariel, vocês não têm ideia o quanto me ajudaram a permanecer firme nos meus objetivos.

Agradeço profundamente ao meu orientador Professor Osmino Rodrigues Pires Júnior (UnB) pelos 10 anos de aprendizado, de amizade. Muito obrigada pelo apoio, pelas valiosas lições, pela enorme paciência comigo... Só você sabe que não foi fácil.

Agradeço especialmente o Msc Carlos José Correia de Santana (UnB) e o Professor Rafael D. Melani(NorthwesternUniversity – Chicago) pela ajuda fundamental com a análise proteômica. Muito obrigada pela disponibilidade e paciência, vocês foram essenciais neste trabalho.

Agradeço ao Professor Gilberto B. Domont(UFRJ) por ter gentilmente ter me recebido em seu laboratório, pelos conselhos e sugestões extremamente úteis.

Agradeço aos professores Mariana Castro (UnB), Wagner Fontes (UnB) e Peter Roepstorff (Universityof Southern Denmark) pela colaboração na espectrometria de massas e revisão do primeiro artigo desta tese.

Agradeço ao Professor Glenn F. King (Universityof Queensland – Australia) por ter me recebido tão gentilmente e supervisionado o Doutorado Sanduíche.

Agradeço ao Dr. Andrew Walker (Universityof Queensland – Australia) pela oportunidade de aprendizado e também pelo auxílio na análise transcriptômica.

Ao Dr. Chun Yuen Chow (Universityof Queensland – Australia) e a Dra Fernanda Caldas Cardoso pelo suporte nas análises de eletrofisiologia.

Agradeço aos colegas de laboratório Gabriel, Ariel, João, Keven, Lucas, Jessica S, Jessica O, Isadora, Daniella, Ana Luiza, pelo auxílio cotidiano, pelas ricas discussões e principalmente pelo auxílio na coleta dos escorpiões, sem os quais não teríamos este trabalho.

Agradeço a Fundação Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal pelo fomento deste trabalho em diversos momentos.

Agradeço ao CNPq e Capes pela concessão das bolsas de doutorado no país e no exterior.

A todos que colaboraram meu mais sincero muito obrigada!

Sumário

Lista de tabelas	I
Lista de figuras.....	II
Lista de abreviaturas	III
Resumo	IV
Abstract.....	VI
1-Introdução	19
1.1- Escorpiões e potencial terapêutico da peçonha	19
1.2 –Enzimas presentes em peçonhas:.....	19
1.2.1 – Hialuronidase(E.C. 3.2.1.35).....	19
1.2.2 – L-Amino ácido Oxidase(E.C.1.4.3.2)	20
1.2.3 – Proteases.....	21
1.2.5 – Fosfolipases A ₂ (E.C. 3.1.1.4).....	22
1.3 – Atividade citotóxica de peçonhas.....	23
1.3.1 – Antibacteriano e Antifúngico	23
1.3.2 - Antitumoral	23
1.4 – Análises“ômicas” de peçonhas escorpiônicas	23
1.5- <i>Rhopalurus agagemnon</i>	26
Capítulo 1 - Avaliação da atividade enzimática e citotóxica da peçonha de <i>Rhopalurus agagemnon</i>.....	28
1- Introdução	28
2 - Objetivos.....	29
3 - Materiais e métodos:	29
3.1 - Coleta e extração da peçonha.....	29
3.2- Atividades inibitórias de proteases	29
3.2.1 - Inibição de Tripsina:	29

3.2.2 – Inibição de Quimotripsina:	30
3.2.3. – Inibição de Elastase.....	30
3.3 - Atividades enzimáticas	31
3.3.1 – Atividade fosfolipásica - Turbidimetria	31
3.3.2– Atividade proteásica em Zimograma (Caseína, gelatina).	31
3.3.3 Atividade Hialuronidásica.....	31
3.3.4 - Atividade L-amino oxidase (LAAO).....	32
3.3.5- Atividade Amilolítica	32
3.3.6- Atividade Amilolítica em zimografia	33
3.4- Citotoxicidade	33
3.4.1 – Antibacteriano.....	33
3.4.2- Antifúngico.....	34
3.4.3- Viabilidade Celular.....	34
3.4.4 – Atividade Hemolítica	35
3.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE	36
4- Resultados:	36
4.1 - Atividade enzimática.....	36
4.1.1 – Atividade hialuronidásica	39
4.1.2 - Atividade L-Amino Oxidase (LAAO):	39
4.1.3 - Atividade amilolítica.....	40
4.2- Citotoxicidade	41
4.2.1 - Atividade antibacteriana e antifúngica:	41
4.2.2 – Viabilidade celular.....	42
4.2.3 - Atividade hemolítica:	44
4.3 - Gel prata.....	44
5 – Discussão	46

Capítulo 2- Análise proteômica e transcriptômica da peçonha bruta de <i>Rhopalurus agamemnon</i>	51
1- Introdução	51
2- Objetivos.....	51
3- Materiais e métodos.....	52
3.1.1 - Digestão protéica da peçonha	52
3.1.2 - Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massa LC-MS/MS ..	52
3.1.3 - Análise de dados	53
3.2.1 – Coleta das glândulas	53
3.2.2 – Extração de RNA	53
3.2.3 – Sequenciamento de RNA	54
3.2.4 – Controle de qualidade e Assembly	54
4- Resultados.....	54
4.1 - Identificação de proteínas e peptídeos na peçonha de <i>Rhopalurus agamemnon</i> utilizando proteômica <i>shotgun</i> e transcriptoma da glândula de peçonha.....	54
4.2- Classes de proteínas identificadas	55
4.2.1 - Identificação das toxinas moduladoras de canais de Sódio (NaTx)	55
4.2.2 - Identificação de toxinas moduladoras de canais de potássio (KTx)	55
4.2.3 - Identificação de enzimas	56
4.2.4 - Peptídeos sem ponte dissulfeto - NDBP.....	56
4.2.4.1 - Identificação de peptídeos antimicrobianos.....	57
4.2.4.2 - Peptídeos pontencializadores de bradicinina - BPP	57
4.2.4.3 - Peptídeos que atuam na contração muscular	57
4.2.4.4 - Imunomoduladores.....	58
4.2.5- Peptídeos ricos em cisteína (CRP).....	58
4.2.6- Scoloptoxins	59
4.2.7 -Inibidor de protease e proteínas CRISP	59

5- Discussão	65
Capítulo 3 - Caracterização da proteína Ra32 isolada da peçonha de	
<i>Rhopalurus agamemnon</i> com atividade contra adenocarcinoma mamário.	
1-Introdução	68
2 - Objetivos.....	69
3- Materiais e métodos:	69
3.1- Cromatografia líquida de Alta eficiência (HPLC)	69
3.2 - Espectrometria de massa e sequenciamento <i>de novo</i>	69
3.3–Expressão recombinante e purificação da toxina	70
3.4 - Espectroscopia por dicroísmo circular	72
2.5 - Ensaio de viabilidade celular (MTT)	72
3.5.1 - Avaliação de morte celular utilizando citometria de fluxo	72
3.6– Eletrofisiologia em QPatch – <i>automated patch clamp</i>	73
4- Resultados.....	73
4.1 - Cromatografia líquida de Alta eficiência (HPLC)	73
4.2 - Espectrometria de massa e sequenciamento <i>de novo</i>	75
4.3 – Dicroísmo circular	77
4.4 - Expressão recombinante	78
4.5 - Ensaio de viabilidade das células MCF7 e MDA MB 231	79
4.6 – Avaliação da morte celular por citometria de fluxo	81
4.7 – Eletrofisiologia	82
5- Discussão	85
6- Conclusões.....	89
7- Referências.....	90
Anexos	110
I – Licenças SISBIO e SISGen	110
II- Lista de proteínas identificadas pela proteômica shotgun	112

III –Parte das toxinas putativas a partir da glândula de peçonha	121
IV- Outros trabalhos publicados durante o período do doutorado	129
V- Artigo publicado relacionado à tese	130

Lista de tabelas

<i>Tabela 1 - Proteínas identificadas no proteoma da peçonha de <i>Rhopalurus agamemnon</i>.</i>	61
<i>Tabela 2 - Proteínas identificadas na glândula de peçonha de <i>Rhopalurus agamemnon</i>.</i>	64
<i>Tabela 3 – Screening de atividade antitumoral das frações isoladas da peçonha de <i>R. agamemnon</i> contra linhagem MCF7.</i>	74

Lista de figuras

Figura 1 - Exemplar de <i>Rhopalurus agamemnon</i> (C.L. Koch, 1839)	26
Figura 2 - Inibidor de protease.	37
Figura 3 - Atividade fosfolipásica.	37
Figura 4 - Zimograma de atividade gelatinogenolítica	38
Figura 5 – Zimograma de caseína	38
Figura 6 - Zimograma de hialuronidase	39
Figura 7 - Atividade LAAO.	40
Figura 8. Atividade amilolítica.	41
Figura 9 - Atividade antimicrobiana.	41
Figura 10 - Atividade citotóxica sobre as células de adenocarcinoma mamário (MCF7).	42
Figura 11 - Atividade citotóxica sobre células de melanoma murino (B16F10).	43
Figura 12 - Atividade citotóxica sobre células de fibroblastos murinos (NIH 3T3).	43
Figura 13 - Atividade hemolítica.	44
Figura 14 - Perfil eletroforético da peçonha bruta de <i>R. agamemnon</i>	45
Figura 15 - Proteômica total da peçonha de <i>R. agamemnon</i>	60
Figura 16 - Transcriptoma total da peçonha de <i>Ra.</i>	63
Figura 17 - Perfil cromatográfico da peçonha de <i>R. agamemnon</i>	74
Figura 18 - Espectro de massa da nRA32	75
Figura 19 - Sequenciamento de novo da fração nRA32 de <i>R. agamemnon</i>	76
Figura 20 - Alinhamento no ClustalW das β -NaTx e nRA32	76
Figura 21 - Estrutura primária da fração nRA32 da peçonha de <i>R. agamemnon</i> .	77
Figura 22 - Espectro de FAR-UV CD do peptídeo nRA32	78
Figura 23: SDS PAGE da expressão da toxina rRA32 em <i>E. coli</i> .	79
Figura 24: Espectro de massa em AB Sciex 5600 TripleTOF da fração rRA32	79
Figura 25 - IC50 da nRA32 e rRA32 para MCF7.	80
Figura 26 - IC50 da nRA32 para MDA MB231.	81
Figura 27 - Efeitos sobre a morte celular avaliados por citometria de fluxo em células MCF7 a MDA MB 231	82
Figura 28 - Correntes representativas de canais de sódio humanos: A-Nav 1.4, B -Nav 1.5 e C -Nav 1.7 na presença do veículo (cinza) e de 1 μ M da toxina nRA32 (laranja).	84

Lista de abreviaturas

AMP – Peptídeos antimicrobiano (do inglês *antimicrobialpeptide*)

BHI – Meio de cultivo infusão cérebro-coração (do inglês *brain-heartinfusion*)

Ca²⁺ - íon de cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

Cl⁻ - íon de cloreto

CO₂ – Dióxido de carbono

DMEM – Meio Dulbecco modificado (do inglês *Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNS - ácido 3 5-dinitrosalicílico

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

FeCl₃. 6H₂O – Cloreto férrico hexahidratado

HCl – ácido clorídrico

K₃[Fe^{III}(CN)₆] – Ferricianeto de potássio

LAAO – L-amino ácido oxidase

MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

SFB – Soro fetal bovino

Resumo

As peçonhas de escorpião são formadas por toxinas prejudiciais a vários organismos, incluindo humanos. Várias técnicas foram desenvolvidas para entender o papel das proteínas na peçonha de animais, incluindo abordagem proteômica. *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) é o maior escorpião da família Buthidae no Cerrado brasileiro, medindo até 110 mm de comprimento total. O acidente com *R. agamemnon* é doloroso e causa algumas reações sistêmicas, mas a peçonha da espécie permanece sem investigação.

Exploramos a composição protéica da peçonha por abordagem proteômica, transcriptômica e atividade-específica, identificando centenas de proteínas, incluindo enzimas como a hialuronidase, metaloproteinase, L-aminoácido oxidase e amilase, as duas últimas são relatadas pela primeira vez para peçonhas de escorpião. Esses relatos inéditos são importantes para demonstrar o quão distantes estamos de uma compreensão total da diversidade das peçonhas em em composição e função.

Além disso, sabe-se que peçonhas escorpiônicas são compostas majoritariamente de moduladores de canais iônicos como sódio, potássio, cálcio e cloreto. Os moduladores iônicos são conhecidos pelo efeito neurotóxico da peçonha e pelo efeito nociceptivo do envenenamento. No entanto os moduladores de canais iônicos têm mostrado potencial efeito antitumoral contra diversas linhagens de câncer de próstata, mama e gliomas.

No presente trabalho foi isolada e caracterizada uma proteína de 7118 Da com atividade sobre canais de sódio NaV 1.4 e 1.5 e atividade antitumoral específica para câncer de mama, com efeito sobre as linhagens MCF7 e MDA MB 231, provocando apoptose como demonstrado por citometria de fluxo.

A toxina denominada Ra32 foi sequenciada por espectrometria de massa, sua estrutura secundária avaliada por dicroísmo circular, além da predição *in silico*. A estrutura primária da Ra32 é semelhante a β -NaTx C_{ss}9 de *Centruroides suffusus*, que deslocam a voltagem de ativação para potenciais mais negativos, afetando assim a ativação do canal de sódio e promovendo disparos espontâneos e repetitivos.

Além da toxina nativa, a toxina recombinante foi expressa em *E. coli* com uma modificação na região C terminal, para comparação dos efeitos. A toxina nativa se mostrou mais potente contra as duas linhagens de câncer de mama testadas. A toxina nativa parece induzir apoptose pelo bloqueio dos canais NaV 1.4 e 1.5, contudo mais estudos precisam ser realizados para confirmar o mecanismo de ação da toxina.

Esses dados destacam a diversidade única das proteínas da peçonha do escorpião *R. agamemnon*, fornecem ideias sobre novos mecanismos de envenenamento e ampliam o banco de dados de proteínas de peçonhas escorpiônicas. Os nossos dados podem ser importantes para compreender o mecanismo de ação de toxinas moduladoras de canais iônicos sobre células tumorais, além de aumentarem as possibilidades de aplicação biotecnológica destas toxinas. A descoberta de novas proteínas proporciona um novo cenário para o desenvolvimento de novas drogas e sugere novos alvos moleculares para componentes da peçonha.

Abstract

Scorpion venoms are formed by toxins harmful to various organisms including humans. Several techniques have been developed to understand the role of proteins in animal venoms, including a proteomic approach. *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) is the largest scorpion of the Buthidae family living in Brazilian Cerrado, measuring up to 110 mm in total length. The accident with *R. agamemnon* is painful and causes some systemic reactions, but the venom of the species remains without investigation.

We explored the protein composition of the venom using a proteomic, transcriptomic and activity-specific approach, identifying hundreds of proteins, including enzymes such as hyaluronidase, metalloproteinase, L-amino acid oxidase, and amylase, the last two being reported for the first time for scorpion venoms. These unprecedented reports are important to demonstrate how far away we are from a total understanding of the venoms' diversity in composition and function.

In addition, it is known that scorpion venoms are mainly composed of sodium, potassium, calcium and chloride ion channel modulators. Ionic modulators are known for the venom's neurotoxic effect and the nociceptive effect of poisoning. However, ion channel modulators have shown a potential antitumor effect against several strains of prostate, breast and gliomas cancer cells.

In the present work, a 7118 Da protein with activity on hNaV 1.4 and 1.5 sodium channels and specific anti-tumor activity for breast cancer towards MCF7 and MDA MB 231 cell lines was isolated and characterized., causing apoptosis as demonstrated by flow cytometry. .

The toxin called Ra32 was sequenced by mass spectrometry, its secondary structure evaluated by circular dichroism, in addition to *in silico* prediction. The primary structure of Ra32 is similar to *Centruroides suffusus* β -NaTx C_{ss}9, which shifts the activation voltage to more negative potentials, thus affecting the activation of the sodium channel and promoting spontaneous and repetitive firing.

In addition to the native toxin, the recombinant toxin displaying a C-terminal region modification was expressed in *E. coli* to compare their activities. The native toxin proved to be more potent against the two breast cancer strains tested. The native

toxin appears to induce apoptosis by blocking the NaV 1.4 and 1.5 channels, however further studies need to be carried out to confirm the toxin's mechanism of action.

These data highlight the unique diversity of *R. agamemnon* venom proteins, provide insights into new poisoning mechanisms, and expand the scorpion venom protein database. Our data may be important to understand the mechanism of action of ion channel modulating toxins on tumoral cells, in addition to increasing the possibilities of biotechnological application of these toxins. The discovery of new proteins provides a new scenario for the development of new drugs and suggests new molecular targets for venom components.

1-Introdução

1.1- Escorpiões e potencial terapêutico da peçonha

As peçonhas de escorpiões são formadas por diversos grupos de toxinas nocivas a vários organismos, inclusive aos seres humanos [1]. Um grupo importante são as toxinas moduladoras de canais iônicos que, em sua maioria, apresentam cadeias de aminoácidos variáveis, e estruturas de α -hélice e folhas- β antiparalelas estabilizados por pontes dissulfeto[2].Essas toxinas agem principalmente em canais iônicos de membrana de células que controlam o fluxo de íons, principalmente Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} , sendo as mais estudadas as toxinas para Na^+ e K^+ [2].

Todas as espécies de escorpiões consideradas perigosas para o homem pertencem à família Buthidae, a única que têm distribuição geográfica em todos os continentes colonizados pela ordem Scorpiones. Estima-se que existam aproximadamente 1156 espécies na família, entretanto, apenas seis gêneros são capazes de provocar acidentes graves ou fatais (Androctonus, Centruroides, Hottentotta, Leiurus, Parabuthus e Tityus) [3].

As toxinas moduladoras de canais iônicos escorpiônicas apresentam propriedades farmacológicas heterogêneas, com algumas sendo mais ativas em mamíferos, outras mais ativas em artrópodes e outras que podem atuar sobre ambos[4]. Além das neurotoxinas, peçonhas escorpiônicas também apresentam uma ampla diversidade de moléculas como mucopolissacarídeos, Hialuronidases, fosfolipases, Serotonina, inibidores de proteases e liberadores de histaminas, que exercem uma ação local como coadjuvantes no envenenamento, ajudando a aumentar a absorção e disseminação da peçonha[5].

1.2 –Enzimas presentes em peçonhas:

1.2.1 – Hialuronidase(E.C. 3.2.1.35)

Hialuronidases são enzimas que participam da degradação de glicosaminoglicanos, componentes fundamentais da derme[6], como o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina. São produzidas por bactérias e fungos, estão presentes em nematóides e sanguessugas, secreções de bacteriófagos e outros vírus, tumores malignos,

parasitas, crustáceos, lisossomas, espermas de mamíferos, venenos e peçonhas de animais pertencentes a diversas famílias[7].

As Hialuronidases participam de diversos processos biológicos, como fagocitose, mitose, desenvolvimento e implantação de embriões, adesão, migração, proliferação e diferenciação celular[8].

Por estarem envolvidas em inúmeros processos relativos à manutenção e integridade da matriz extracelular, tem sido aplicada em diversas especialidades médicas [9]. Estas hialuroglicosamidases são usadas para acelerar a difusão e absorção de fluidos [10], promover a redução de edema [11], e aumentar a eficiência de anestésicos[12]entre outras aplicações.

Estas enzimas não são tóxicas, mas potencializam indiretamente a toxicidade dos venenos/peçonhas[13]ao atuarem como “fator de espalhamento”, contribuindo para o envenenamento local ou sistêmico[14]por facilitar a difusão das toxinas nos tecidos e na circulação das presas/vitimas[15].

A enzima contribui para a destruição tecidual local severa em decorrência da extensa degradação de ácido hialurônico da matriz extracelular e pode causar colapso sistêmico da vítima ao degradar o ácido hialurônico circulante na corrente sanguínea[16].

Portanto, a neutralização efetiva da atividade hialuronidásica de venenos/peçonhas deve ter prioridade clínica após envenenamentos para diminuição do dano tecidual, e da difusão de outras toxinas [13,15].

Embora esta enzima apresente importante papel no envenenamento local e sistêmico, há poucos estudos publicados para Hialuronidases de peçonhas.

1.2.2 – L-Amino ácido Oxidase(E.C.1.4.3.2)

L-Amino ácido oxidases (LAAOs) são amplamente distribuídas nas famílias de serpentes Viperidae, Crotalidae e Elapidae[17]. Além das peçonhas de cobras, diferentes LAAOs foram isoladas de animais marinhos, incluindo *Achatinafulica*, *Aplysiacalifornicae* *Aplysiapunctata*, bem como de bactérias, fungos e plantas[18].

As LAAOs são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos para formar α -cetoácidos correspondentes, peróxido de hidrogênio e

amônia. Geralmente são glicoproteínas homodiméricas de ligação ao FAD com massa molecular em torno de 110-150 kDa. Acredita-se que as LAAOs contribuam para a toxicidade da peçonha devido à produção de peróxido de hidrogênio durante a reação de oxidação[19]. As LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes podem apresentar atividade antimicrobiana[20], antiprotozoária[21], antileishmania[22], ou anticoagulante[23], podem induzir [24]ou inibir a agregação plaquetária[25], são citotóxicos e antiproliferativos em células tumorais[26–29].

1.2.3 – Proteases

As enzimas proteolíticas realizam hidrólise de ligações peptídicas e são conhecidas como peptidases ou proteinases[30]. As proteases são classificadas em quatro grupos: serino-, metalo-, cisteíno- e aspartil- proteases, as quais diferem entre si na estrutura do sítio catalítico e no mecanismo de ação[31].

O entendimento das funções das proteases e das características dos substratos é essencial para desvendar mecanismos fisiológicos e patológicos, nos quais estas enzimas estão envolvidas, o que pode sugerir que estas proteínas sejam alvos para o desenvolvimento de novas terapias[32].

De igual maneira, os inibidores de protease também têm sido descritos como possíveis agentes terapêuticos. Os inibidores de protease também têm sido utilizados como instrumentos para o entendimento a nível molecular de diversas patologias, onde as proteases possuem atividade crucial[33]. Essas enzimas são consideradas importantes instrumentos da indústria biotecnológica, devido à sua utilidade como agentes bioquímicos ou na fabricação de produtos diversos[34], aplicáveis a medicina, agricultura, nutrição e a outras tecnologias [30].

As proteases exercem uma função essencial em clivagem de proteínas, na cascata de coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, na histogênese, morfogênese, desenvolvimento de processos inflamatórios, angiogênese, ativação de zimogênios, liberação de hormônios, de peptídeos farmacologicamente ativos de proteínas precursoras bem como o transporte de proteínas através das membranas [31].

Para as peçonhas de escorpiões, baixas atividades proteásicas foram identificadas e poucos trabalhos avaliam o potencial proteolítico em peçonhas escorpiônicas,

possivelmente pela baixa relação com o envenenamento. As metaloproteases são as principais proteases encontradas na peçonha de escorpião, sendo detectadas tanto em transcriptomas quanto em *screenings* de atividade proteásica. Na peçonha de escorpião são possivelmente responsáveis por aumentar a complexidade da peçonha, aumentando o número de peptídeos ativos na síndrome do envenenamento, semelhante ao que tem sido descrito para serpentes[35], onde atual promovendo a hemorragia local e sistêmica [36].

1.2.4 – α – Amilases(E.C. 3.2.1.1)

As α -amilases são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise do amido em açúcares, como a glicose e a maltose. As amilases são divididas em três subclasses: α - β - γ -amilase de acordo com o tipo de ligação / ligação que elas são capazes de clivar[37]. Alguns estudos sugerem que as enzimas presentes em peçonhas são na verdade, enzimas digestivas derivadas ao longo da evolução/especialização do aparato bucal de alguns animais [38].

Em escorpiões amilases foram descritas em análises transcriptômicas: *Tityus serrulatus* (Uniprot P85843), *T. obscurus* (UniprotA0A1E1WVL9), *Hadrurus spadix* (Uniprot A0A1W7RB82), para o qual também já foi descrita a presença de uma Maltase no transcriptoma da glândula (Uniprot A0A1W7RA78).

Ainda não se sabe a função destas enzimas em peçonhas escorpiônicas e nem como enzimas presentes comumente encontradas em aparatos bucais podem ser encontradas no tálson destes animais,

1.2.5 – Fosfolipases A₂ (E.C. 3.1.1.4)

Fosfolipases A₂ são moléculas amplamente distribuídas em vários tipos celulares, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. São atribuídas três funções principais às fosfolipases: como enzimas digestivas; manutenção e remodelação da membrana; e regulação dos mecanismos celulares, como por exemplo, a criação de lipídeos bioativos[39].

De modo geral, as fosfolipases de peçonha alteram processos farmacológicos na presa, como atividade neurotóxicapré- e pós-sináptica, miotoxicidade, efeitos coagulantes, inibição da agregação plaquetária, atividade hipotensiva, convulsivante, e mesmo indução de edema[40].

1.3 – Atividade citotóxica de peçonhas

1.3.1 – Antibacteriano e Antifúngico

A resistência às drogas antibióticas representa um problema de saúde pública a nível global. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são distribuídos entre uma ampla gama de espécies, incluindo insetos, plantas, seres humanos e até mesmo organismos unicelulares [41]. Esses peptídeos são potentes agentes antimicrobianos contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Sua atividade de amplo espectro e baixo potencial para induzir resistência, torna estes peptídeos potenciais agentes terapêuticos[42].

A peçonha de escorpião contém uma diversidade de peptídeos bioativos que representam um recurso promissor para o *design* de novas drogas de uso terapêutico[43]. Além disso, vários AMPs foram encontrados em peçonhas de escorpião, incluindo Hadrurina[44], Escorpina[45], Opistoporinas, Parabutoporina[46], ISCTs[47], Mucroporina[48], e StCT1 [49].

1.3.2 - Antitumoral

O câncer é um grande problema de saúde pública no mundo. De fato, a luta para encontrar uma terapêutica eficaz para curar o câncer é um dos maiores desafios da humanidade. Essa incidência crescente indica a ineficácia dos métodos de tratamento atualmente disponíveis, como quimioterapia, cirurgia e radioterapia[50]. No entanto, esses tratamentos levam a efeitos adversos graves [51]. Essas desvantagens são estímulos para encontrar novos medicamentos para o tratamento do câncer a partir de fontes variadas. Assim, outras fontes naturais, como o animal, são fontes alternativas para encontrar novos agentes antitumorais. Entre os animais, alguns artrópodes peçonhentos, como abelhas, vespas, escorpiões, formigas e aranhas, produzem moléculas farmacologicamente ativas e são usadas para fins medicinais[52]. Os toxinologistas, em geral, estão considerando a peçonha de escorpião como uma potente fonte natural para o tratamento do câncer, pois contém muitos compostos bioativos, como peptídeos, aminas livres, nucleotídeos, lipídios e moléculas de interesse biotecnológico[53].

1.4 – Análises“ômicas” de peçonhas escorpiônicas

O proteoma pode ser definido como o conjunto de todas as proteínas expressas em um tecido, célula ou sistema biológico em dado momento celular, ou como o perfil

das proteínas celulares expressas pelo genoma de um organismo em condições fisiológicas específicas[54].

A abordagem proteômica das peçonhas escorpiônicas busca, portanto, uma caracterização mais abrangente, quantitativa e qualitativa das proteínas responsáveis pelo envenenamento.

A transcriptômica também tem se mostrado muito útil para identificação e caracterização de proteínas presentes em glândulas de peçonha, e requer apenas uma pequena quantidade de tecido. As abordagens transcriptômicas são relativamente imparciais, pois capturam quase toda a diversidade presente na glândula de peçonha no momento da coleta do tecido, ao contrário da proteômica, onde a supressão de íons pode confundir significativamente a ionização do analito e a detecção de certos tipos de instrumentação. No entanto, usar apenas a transcriptômica é insuficiente isso porque, dos milhares de transcritos gerados, boa parte deles não codificam para a peçonha, mas sim para as proteínas estruturais da célula. Além disso, a transcriptômica não é capaz de prever a forma madura das proteínas, com modificações pós-traducionais, e clivagens proteicas [55]. Por isso uma abordagem que combine proteômica e transcriptômica parece ser a mais recomendada para a caracterização de peçonhas animais.

Os componentes protéicos mais abundantes em peçonhas escorpiônicas sem dúvida são os moduladores de canais iônicos.

As toxinas que atuam em canais de sódio (NaTx) são, em geral, polipeptídeos de 61–76 resíduos de aminoácidos, fortemente ligados por quatro pontes dissulfeto[1] e atualmente são classificados em duas categorias, com base em seus efeitos fisiológicos no canal e suas propriedades de ligação: alfa –toxinas (α -NaTxs), que se ligam ao sítio 3 na superfície extracelular do canal e inibem o processo de inativação rápida[56]; e beta-sódio toxinas (β -NaTxs), que se ligam ao sítio 4 do canal e deslocam o limiar da ativação do canal para potenciais de membrana mais negativos[57].

Peçonhas de escorpião têm se mostrado uma fonte interessante de toxinas que atuam de maneira específica em canais de potássio (KTx). Com base nas

sequências primárias de aminoácidos e nos resíduos de cisteínas conservados, as KTx foram classificadas em quatro famílias α -, β -, γ - e κ -KTx[58].

Várias toxinas de escorpiões específicas para canais Ca^{2+} foram isoladas como, por exemplo, as Imperitoxinas (IpTxA e IpTxi) do escorpião *Pandinusimperator*[59]e Maurocalcina (Mca) do escorpião *Scorpiomauruspalmatus*[60], que ativam o receptor de Rianodina (Ryr), um canal de liberação de cálcio intracelular. Caracterizam-se por serem toxinas heterogêneas, sendo observadas diferenças de sequência de aminoácidos, quantidade de pontes dissulfeto, tamanho e estrutura.

As toxinas escorpiônicas que atuam em canais de Cl^- , são polipeptídeos de baixa massa molecular, compostos por 34-38 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. As toxinas de escorpiões que agem em canais de íons Cl^- já isoladas são: Clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* [61], Clorotoxina-like de *Androctonus australis* [62]e Clorotoxina-like Bs14 de *Hottentotta tamulus indicus* [63]. As demais toxinas para canais de cloreto descritas na literatura são putativas.

Além das neurotoxinas, outra classe de moléculas que desempenha um importante papel no envenenamento são as enzimas, que recentemente tem sido descritas por duas abordagens principais: 1) caracterização da atividade enzimática na peçonha bruta e em seguida isolamento de enzimas de interesse[7]; 2) abordagens transcriptômicas e proteômicas da peçonha[64].

Recentemente abordagens proteômicas têm sido largamente usadas para caracterização da peçonha de diversos escorpiões. Até o momento, perfis proteômicos de 22 espécies foram descritas: 8 espécies do gênero *Tityus*; 2 espécies do gênero *Leiurus*; 2 no gênero *Centruroides*; 1 espécie nos gêneros *Opisthacanthus*, *Urodacus*, *Scorpio*, *Mesobuthus*, *Androctonus*, *Rhopalurus*, *Megacormus*, *Hadrurus*, *Paravaejovis* e *Serradigitus*.

Em relação a abordagens transcriptômicas, ainda mais espécies têm sido exploradas, ao todo 37 espécies foram descritas: 1 espécie nos gêneros *Androctonus*, *Isometrus*, *Lychas*, *Odontobuthus*, *Parabuthus*, *Megacormus*, *Hadogenes*, *Hemiscorpius*, *Opistacanthus*, *Pandinus*, *Scorpio*, *Urodacus*, *Superstitionia*, *Paravaejovis*, *Serradigitus*; 2 espécies nos gêneros *Hottentotta*,

Mesobuthus, Hadrurus, Scorpiops, Heterometrus, Thorelius; 3 espécies nos gêneros Tityus, Vaejovis; e 4 espécies no gênero Centruroides.

1.5-Rhopalurus agamemnon

Rhopalurus agamemnon (Koch, 1839) é o maior escorpião da família Buthidae no Cerrado brasileiro, medindo até 110 mm de comprimento total. Apresenta coloração marrom-amarelada, com patas amareladas e segmentos terminais do metasoma, quase pretos. A espécie ocorre em áreas de cerrado nos Estados de Goiás, Bahia, Piauí, Pernambuco e Tocantins [65].

Relatos de acidentes causados por *Rhopalurus agamemnon* são extremamente escassos. Os únicos relatos, supostamente causados pela espécie, descrevem brevemente dois acidentes na região de Teresina, Piauí. Os casos relatados referem-se a uma mulher de 54 anos e um homem de 18 anos. A paciente apresentava intensa dor local, agitação, sialorréia, taquicardia, visão embaçada, lacrimejamento, espasmos musculares e hipotensão arterial. O segundo caso apresentava dor local intensa, sialorréia, sonolência e dor irradiada no ombro direito[66].



Figura 1 - Exemplo de *Rhopalurus agamemnon* (C.L. Koch, 1839)[67]. Foto tirada por Osmindo Rodrigues Pires Júnior.

A respeito da peçonha de *R. agamemnon*, apenas se tem uma tese de doutorado Largura, S.W. (2003), descrevendo a atividade da peçonha bruta sobre nervo ciático de *Lithobatesbeianus* pela técnica de *sucrose-gap*, sugerindo atividade sobre canais de sódio [68]. Não se tem registros de outros trabalhos explorando o potencial da peçonha de *R. agamemnon*.

Para melhor compreensão dos resultados a tese foi dividida em três capítulos

Capítulo 1 - Avaliação da atividade enzimática e citotóxica da peçonha de *Rhopalurus agamemnon*.

Capítulo 2- Análise proteômica e transcriptômica da peçonha bruta de *Rhopalurus agamemnon*.

Capítulo 3 - Caracterização da proteína Ra32 isolada da peçonha de *Rhopalurus agamemnon* com atividade contra adenocarcinoma mamário.

Capítulo 1 - Avaliação da atividade enzimática e citotóxica da peçonha de *Rhopalurus agamemnon*.

1- Introdução

Peçonhas escorpiônicas são misturas de vários componentes biologicamente ativos: enzimas, peptídeos, nucleotídeos e outras substâncias desconhecidas[2], sendo as enzimas as mais abundantes[69][64].

As atividades biológicas das enzimas em peçonhas de escorpião incluem proteólise, fosfolipase A2 (PLA2), hialuronidases, fosfatases e acetilcolinesterases [70]. Estas enzimas contribuem para várias alterações patológicas na pele, células sanguíneas, sistema nervoso central e cardiovascular [71]. Particularmente, as hialuronidases geralmente têm um efeito indireto no aumento da absorção de peptídeos ativos e permitem que componentes tóxicos se espalhem rapidamente e induzam reações sistêmicas[72].

Alem das hialuronidases, as proteases são importantes na síndrome do envenenamento. Podem clivar proteínas em locais específicos com base na sequência de aminoácidos, próximo aos resíduos de aminoácidos localizados no terminal N ou C, ou aleatoriamente. As proteases são classificadas em quatro grupos, de acordo com o aminoácido chave (serina, cisteína ou ácido aspártico) no sítio catalítico ou de acordo com a necessidade de um íon metálico para realizar sua função. Essas enzimas são importantes para o metabolismo celular; por exemplo, eles participam do processo pós-tradução de remoção de peptídeos e pró-peptídeos de sinal. As proteases também podem atuar como toxinas, que são bem caracterizadas em venenos de aranhas e cobras[71]. Dentre as proteases descritas para animais peçonhentos, as metaloproteases são as mais comuns. Essas proteases precisam de um íon bivalente como cofator para ter atividade proteolítica[73].

2 - Objetivos

- Identificar as atividades enzimáticas de Hialuronidase, Protease, Fosfolipase, L-aminoácido oxidase, Amilase, e inibidora de protease na peçonha bruta de *Rhopalurus agamemnon*.
- Determinar a citotoxicidade da peçonha de *Rhopalurus agamemnon* sobre bactérias, fungos, células eucarióticas tumorais e não tumorais e eritrócitos murinos.
- Avaliar a diversidade de compostos presentes na peçonha de *Rhopalurus agamemnon* utilizando espectrometria de massa.

3 - Materiais e métodos:

3.1 - Coleta e extração da peçonha

Os animais da espécie *Rhopalurus agamemnon* foram coletados na Fazenda Nossa Senhora Aparecida, no município de Monte Alegre de Goiás – GO. (Licença do SISBIO n° 51771) A coleta dos escorpiões foi feita no período diurno por procura ativa sob os cupinzeiros. A extração da peçonha foi feita por meio de estímulo elétrico (de 50 a 100 V, 300 Hz) próximo ao telson, coletada em tubos de polietileno, solubilizada em 1 mL de água deionizada. Em seguida, a peçonha bruta foi seca em sistema de *Speedvac* (ThermoSavant –SPD 2010) e mantida refrigerada (-20°C). (Cadastro SisGen n° A826A3A - Anexo I).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB e alimentados periodicamente com baratas.

3.2- Atividades inibitórias de proteases

3.2.1 - Inibição de Tripsina:

A análise da inibição de tripsina foi realizada segundo o método de Erlanger et.al., [74] com modificações, e obtida por meio de leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) com leitura feita pelo *software* SkanIt for multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). O substrato utilizado foi o BAPNA - Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,43 mg/mL. Inicialmente o substrato é diluído em 500 µl de

DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50 mM) + CaCl₂ (20 mM), pH 8,2. Para os cálculos de concentração da enzima (Tripsina) foi utilizado um espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se uma quantidade mínima de enzima em 1 mL de HCl (1mM), que foi diluída consecutivamente em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,064 mg/mL medida espectrofotômetro ($\lambda = 280$ nm) utilizando o cálculo de extinção molar $\text{Concentração (mg/mL)} = (A_{280} \times 10) / 15,9$, onde 15,9 é a $A^{1\%}_{280}$ da tripsina.

3.2.2 – Inibição de Quimotripsina:

A análise da inibição de quimotripsina foi realizada segundo o método de Erlanger [74] com modificações, e obtida por meio de leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) e a leitura foi feita pelo *software* SkanIt for Multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). O substrato GPNA - *N*-glutaryl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 0,80 mg/mL. Inicialmente o substrato é diluído em 500 μ l de DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50 mM) + CaCl₂ (20 mM), pH 7,6. Para os cálculos de concentração da enzima foi utilizado um espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se uma quantidade mínima de enzima em 1 mL de HCl (1 mM), que foi diluída consecutivamente em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,63 mg/mL medida espectrofotômetro ($\lambda = 280$ nm) utilizando o cálculo de extinção molar $\text{Concentração (mg/mL)} = (A_{280} \times 10) / 20,4$, onde 20,4 é a $A^{1\%}_{280}$ da quimotripsina.

3.2.3. – Inibição de Elastase

A análise da inibição de elastase foi obtido por meio de leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) e a leitura foi feita pelo *software* SkanIt for Multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). O substrato SAAVpNA - *n*-succinyl-ala-ala- val-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) foi utilizado em uma concentração final de 0,72 mg/mL segundo recomendações do fabricante. Inicialmente o substrato é diluído em 500 μ L de DMSO e em seguida o volume necessário é completado com tampão Tris-HCl (50 mM) pH 8,5. O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se 0,4 mg/mL de elastase

Porcina em água destilada. A atividade residual é medida a 405 nm após 15 minutos de reação.

3.3 - Atividades enzimáticas

3.3.1 – Atividade fosfolipásica - Turbidimetria

Para a avaliação da atividade fosfolipásica, utilizou-se como substrato a fosfatidilcolina 3 mM (Sigma Aldrich) em tampão Tris-HCL 100 mM a pH 8,0. Para solubilizar o substrato utilizou-se 1,0 mL de clorofórmio que foi seco utilizando-se jato de ar comprimido. A fosfatidilcolina já seca foi dissolvida em tampão, formando uma emulsão.

A secreção bruta de *R. agamemnon* foi reconstituída em 10 µl de Tris-HCl 100mM junto a 10 µl de CaCl₂ 10 mM e, posteriormente, incubadas à 37°C por 20 minutos.

Para o preparo do ensaio, pipetou-se 150 µl da emulsão e 20 µl da amostra a 37°C. Após 60 minutos, a leitura foi realizada a 405 nm (Multiskan FC - Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). Para o controle negativo foi utilizado 150 µl de emulsão, 10 µl de CaCl₂ e 10 µl de Tris-HCl; e para o controle positivo, 150 µl de emulsão, 10 µl de CaCl₂ e 10 µl peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em tampão Tris-HCL, na concentração de 10 mg/mL.

3.3.2– Atividade proteásica em Zimograma (Caseína, gelatina).

A atividade proteolítica em gel foi realizada em SDS-PAGE 12% contendo solução de gelatina 1% como substrato. As amostras em estudo, diluídas em tampão [75], em condições não redutoras, foram submetidas à eletroforese (15 mA) à 4°C. Após a migração eletroforética, os géis foram incubados 2 vezes em Triton X-100 2,5% por 20 minutos cada e em seguida incubados à 37 °C em tampão Tris-HCl 50 mM, 200 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MgCl₂ pH 7.4 para a zimografia com substrato protéico e Tris-HCl 50 mM, 150mM de NaCl e 0,5 mM de CaCl₂ pH 7.4 para zimografia com glicosaminoglicanos. Os géis foram corados pelo Azul de Coomassie. As zonas claras que se sobressaem no gel contra um fundo corado demonstram a presença de atividade proteolítica na amostra.

3.3.3 Atividade Hialuronidásica

A atividade hialuronidásica em gel foi realizada em SDS-PAGE 12% (p/v) contendo solução de ácido hialurônico (0,5 mg/mL) como substrato. A peçonha bruta diluídas

em tampão [75], em condições não redutoras, foi submetida à eletroforese (15 mA) à 4 °C. Após a migração eletroforética, o gel foi incubado 2 vezes em Triton X-100 2,5% por 20 minutos cada e em seguida incubado à 37 °C em tampão Tris-HCl 50 mM, 150 mM de NaCl e 0,5 mM de CaCl₂ pH 7.4 para zimografia. O gel foi corado pelo Azul de Coomassie. As zonas claras que se sobressaem no gel contra um fundo corado demonstram a presença de atividade hialuronidásica na amostra.

3.3.4 - Atividade L-amino oxidase (LAAO)

A avaliação da atividade LAAO foi mensurada utilizando *Prussian blue* como revelador, de acordo com Yu et.al. [76] com adaptações para meio líquido.

O método consiste em avaliar a formação de H₂O₂ após a atividade LAAO. O *Prussian blue* é preparado segundo os seguintes passos: 1- prepara-se 1g/L de FeCl₃.6H₂O (solução A), 2- prepara-se 1g/L de K₃[Fe^{III}(CN)₆] (solução B). Misturam-se as soluções A e B na hora do uso.

Como substrato utilizou-se L-Histidina, L-Fenilalanina, L-cisteína, L-triptofano ou L-leucina 30 µM (em água); e como padrão LAAO purificada de *Bothrops atrox* – sigma - (40 mg/mL em Tris-HCl 20 mM pH 7,0).

A reação se dá pela adição de 10µL da peçonha bruta de *R. agamemnon*, ou de LAAO purificada, em 90 µL de L-leucina e incubado a 37 °C por 30 min. Após esse período foi adicionado 400 µL de *Prussian blue* para avaliar a presença de H₂O₂. Após 5 min foi medida a absorbância a 620 nm (Leitor de placas Multiskan FC - Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). Quanto mais próximo ao azul, maior a presença de H₂O₂ no meio, enquanto que reações mais esverdeadas contêm menos H₂O₂ no meio.

3.3.5- Atividade Amilolítica

A determinação da atividade amilolítica foi realizada segundo Miller, 1959 [77] com adaptações.

A solução de para da é previamente preparada com DNS (acidodinitrosalicílico) dissolvendo 1g em 20 mL de NaOH 2N, então foi misturado com tartarato de sódio potássio (30g); aquecido em placa quente sob agitação (50-70°C) e o volume completado para 100mL com água destilada.

Para a atividade amilolítica em solução foi utilizado Amido solúvel (1% p/v) em tampão fosfato de sódio com NaCl 6,7mM, pH 6,9. A reação é formada pela mistura da solução de amido 50µL e saliva 50 µL. A mistura é incubada a 25 °C por 3 minutos, e então a reação é parada com DNS e a solução é fervida por 5 minutos. Após arrefecimento, a mistura é lida em espectrofotometro a 540 nm (Leitor de placas Multiskan FC - Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). Como controle de atividade enzimática foi utilizada saliva humana; e maltose foi utilizada como solução padrão (2 mg/mL)

Para determinação de unidades de atividade enzimática é feito o cálculo abaixo:

$$Ea = \frac{OD(teste) \times [] \text{maltose} (\mu M) \times DE}{OD(maltose) \times t}$$

Onde: Ea = atividade enzimática, OD = densidade ótica, [] = concentração, DE= diluição da enzima e t = tempo de incubação;

3.3.6- Atividade Amilolítica em zimografia

O zimograma da atividade amilolítica foi realizada de acordo com Upadhyay, 2005 [78]. O gel de separação foi feito com 8% de acrilamida e a concentração de amido foi de 0,2 mg/mL. A voltagem aplicada foi de 150 V a 4 °C (marcador molecular Precision Plus Protein™ Dual color - BioRad). Após a migração eletroforética, o gel foi lavado duas vezes com uma solução de Triton X-100 a 2% por 30 min, lavado com Tris-HCl 50 mM, pH 5,5 por 5 min, e incubado em Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 6 mM, NaCl 0,4 mM, NaN₃ 3 mM, pH 5,5 durante 24 h. O gel foi corado com solução de Lugol por 24h (iodo 8 mM e iodeto de potássio 602 mM em água) à temperatura ambiente.

3.4- Citotoxicidade

3.4.1 – Antibacteriano

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita em meio líquido. Para isso os microorganismos testados são cultivados em meio Mueller-Hinton por 24h a 37 °C. Após este período, os microorganismos são monitorados quanto à densidade ótica, que deve ser 1 a 595 nm [79] (Multiskan FC - Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA).

Ao constatarmos a fase de crescimento exponencial, os microorganismos são diluídos na proporção 1:50, para Gram-negativos e 1:100 para Gram-positivos até atingir a concentração de 5×10^5 células por mL. Incubou-se a solução de células com a amostra de interesse na proporção 1:1 (v/v) em uma placa de 96 poços durante 24h a 37 °C.

As bactérias utilizadas Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e as Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Como controle de crescimento usou-se o meio Mueller-Hinton e como controle de inibição Ofloxacino 400 mg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.4.2- Antifúngico

Para avaliação da atividade antifúngica, utilizou-se *Candida albicans* (ATCC 14053). Culturas destes fungos foram feitas em meio líquido estéril BHI (Brain-Heart infusion). Após incubação *overnight* a 37 °C, uma alíquota desta cultura foi transferida para 10 mL de meio fresco e incubada a 37 °C sob agitação constante, até densidade ótica de 1,0 a 595 nm (Multiskan FC - Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA).

As frações foram solubilizadas em água estéril em concentrações que variam de 3 a 300 µg. O volume final foi de 200 µl, sendo 100 µl da solução da fração a ser testada e outros 100 µl da suspensão de fungo. Os controles positivos foram feitos em triplicata e foi constituído de 100 µl da suspensão de fungo e 100 µl do meio BHI. O controle negativo, também em triplicata, foi constituído de 100 µl de formaldeído 0,4% e 100 µl de suspensão de fungo. A leitura da absorbância foi feita a 595 nm após 24h de incubação a 37 °C.

3.4.3- Viabilidade Celular

Foram utilizadas células de adenocarcinoma mamário (MCF7), fibroblastos murinos (NIH 3T3) e melanoma murino (B16F10). As células foram mantidas em garrafas de cultivo de 75 cm², contendo meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) com antibiótico 1% v/v (estreptomicina e penicilina) enriquecido com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB). As garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. A adesão e o crescimento celular foram acompanhados pela observação em microscópio invertido. Após evidenciar a adesão e crescimento celular sem contaminação, realizou-se a contagem das células em câmara de

Neubauer. A contagem permitia a obtenção de suspensões de células na concentração de 8×10^3 células/mL de DMEM, para a execução do ensaio de viabilidade celular.

A viabilidade celular foi avaliada por meio do método MTT, que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente (MTT) em um composto colorido denominado azul de formazan. Para isso 100 μ l de células foram depositadas em placas de 96 poços. Após 24h de incubação, o meio de cultura foi removido e o meio fresco contendo as frações diluídas foi adicionado. Os controles positivos foram feitos em triplicata, nos quais as células receberam meio novo sem adição de amostras. Os controles negativos, também em triplicata, as células não receberam um novo meio. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ por 24h. Após esse período, o meio foi desprezado e acrescentou-se 150 μ l de uma solução de meio e MTT 5 mg/mL. As microplacas foram incubadas por 3h a 37 °C para incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente, esses foram solubilizados pela adição de 100 μ l de DMSO. A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de placas a 590nm (Multiskan FC - Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). A viabilidade celular foi determinada pela média da triplicata decada fração testada.

3.4.4 – Atividade Hemolítica

Para mensurar a taxa de hemólise foi utilizado o protocolo modificado de Onuma et.al. (1999). Uma suspensão de eritrócitos murinos cedidos pelo biotério da Universidade de Brasília foi preparada em tampão salino (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, e CaCl₂ 10 mM pH 7,4) no momento do uso.

As hemácias foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas três vezes com tampão salino. Após a lavagem foi preparada uma solução de 2% de hemácias em tampão, e 150 μ L desta solução foi incubada com 150 μ L da amostra a ser testada.

Todas as amostras foram dissolvidas em tampão e testadas em triplicata. A leitura foi feita a 405 nm em leitora de placa (Multiskan FC, ThermoScientific, USA) e como controles foram utilizados Triton X-100 1% como controle de hemólise, e tampão salino como ausência de hemólise.

3.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE

A separação dos componentes proteicos presentes na secreção bruta foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras[75]. O gel de poliacrilamida 15% separador foi preparado em tampão Tris pH 8,8 na presença de SDS. As amostras foram preparadas na concentração de 10 µg em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de bromofenol 0,5%). O gel foi submetido a eletroforese em sistema mini-gel a 4 °C, sob voltagem de 180 V e corrente de 40 mA. Ao final da corrida, o gel foi lavado 3 vezes (20 min. cada) com Triton-X 100 2,5% e em seguida com água destilada para coloração com nitrato de prata

Baseado no método descrito por Blum et al, 1987 [80], os géis foram deixados em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético glacial 12% e formaldeído 0,05%), sob leve agitação durante duas horas. Logo depois, lavados três vezes em solução de etanol 50% durante 20 minutos cada lavagem. Em seguida, pré-tratados durante 1 minuto com solução de tiosulfato de sódio 0,01%, e lavados três vezes com água destilada por 20 segundos. Após pré-tratamento, o gel foi transferido para a solução corante (nitrato de prata 0,2% e formaldeído 0,075%). Após 20 minutos foram lavados três vezes com água destilada durante 20 segundos, e colocados na solução reveladora (carbonato de sódio 6%, formaldeído 0,05% e tiosulfato de sódio 0,01%), até a visualização das bandas de proteína. A revelação foi interrompida pela adição da solução de parada (metanol 50% e ácido acético glacial 12%).

4- Resultados:

4.1 - Atividade enzimática

Os ensaios para atividades como inibidor de tripsina, quimotripsina e elastase, atividade fosfolipásica, atividade gelatinolítica e proteásica, não tem atividade para as condições testadas como apresentados nas figuras 2 a 4 abaixo.

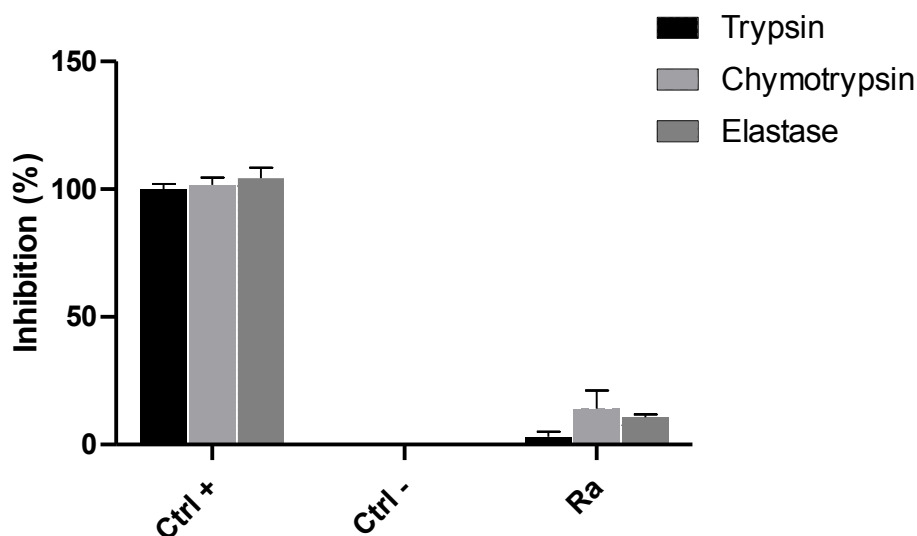


Figura 2 - Inibidor de protease. Preto - Atividade inibitória de tripsina da peçonha de *R. agamemnon* sobre BApNA. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl com CaCl_2 pH 8,2 a 25°C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. Cinza claro - Atividade inibitória de quimotripsina da peçonha de *R. agamemnon* sobre GApNA. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl, pH 7,6 a 37 °C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. Cinza escuro - Atividade inibitória de Elastase Porcina da peçonha de *R. agamemnon* sobre SAAVpNA. O tampão usado foi Tris-HCl pH 8,5 a 25° C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. Todas as reações foram lidas em espectrofotômetro a 405nm.

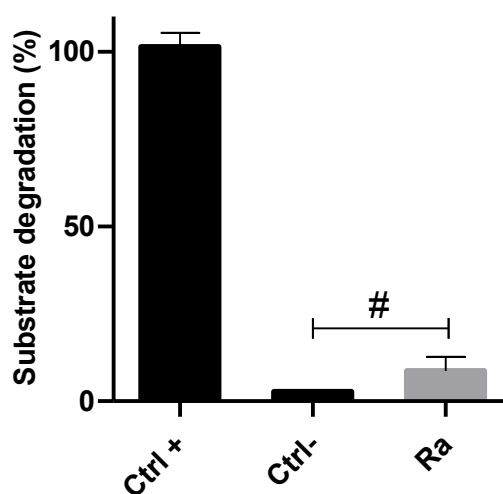


Figura 3 - Atividade fosfolipásica. Atividade fosfolipásica da peçonha de *R. agamemnon* sobre fosfatidilcolina (Sigma Aldrich). O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl pH 8,0 a 25 °C por 15 minutos. O controle positivo contém peçonha de *Bothrops moojeni* e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. A reação foi lida em espectrofotômetro a 405nm. # - é a diferença significativa entre a peçonha de *R. agamemnon* e o controle negativo ($p \leq 0.05$)

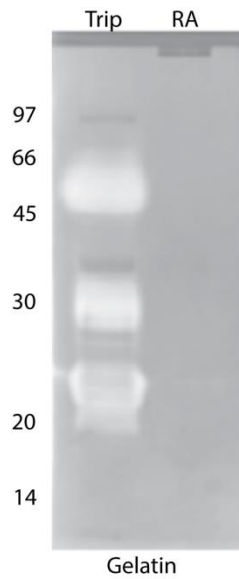


Figura 4 - Zimograma de atividade gelatinogênica em SDS- PAGE 12 % da peçonha de bruta de *R. agamemnon*. Trip: controle com tripsina. RA: 10µg da peçonha bruta de *R. agamemnon* não reduzida. O gel foi corado com Comassie blue G250.

A atividade caseinolítica em zimografia, SDS-PAGE 12% copolimerizado com caseína 0,5% (p/v), incubado em pH 8,0, revelou uma pequena banda em torno de 23 kDa para a peçonha não reduzida, como mostrado na figura 4 abaixo:

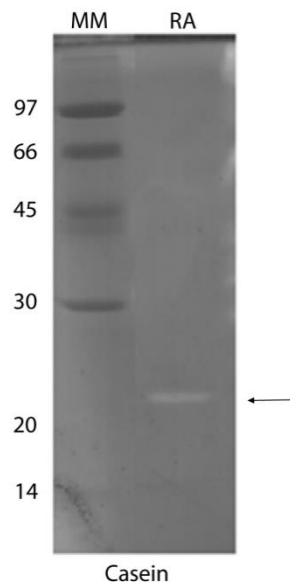


Figura 5–Zimogramade caseína em SDS-PAGE 12 % da peçonha bruta de *R. agamemnon*. MM: molecular. RA: 10µg da peçonha bruta de *R. agamemnon* não reduzida. O gel foi corado com Comassie blue G250.

4.1.1 – Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi avaliada por meio de zimografia. A aplicação de 10µg de peçonha bruta de *R. agamemnon* em gel SDS-PAGE 12% copolimerizado com 0,1% (p/v) de ácido hialurônico, incubado em pH 8,0, revelou uma banda com atividade hialuronidásica, por volta de 45kDa para a amostra não reduzida, como mostrado na figura 5 abaixo:

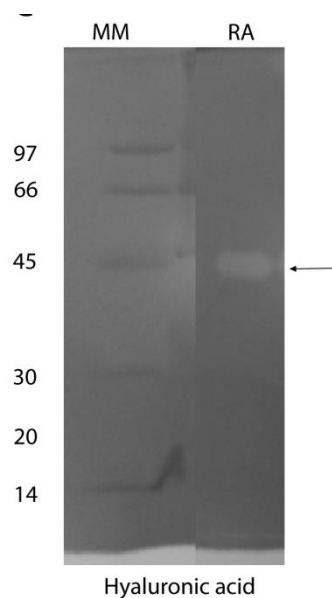


Figura 6 - Zimograma de hialuronidase da peçonha de bruta de *Rhopalurus agamemnon*. MM: marcador molecular. RA: 10 µg da peçonha bruta de *R. agamemnon* não reduzida. O gel foi corado com Comassie blue G250.

4.1.2 - Atividade L-Amino Oxidase (LAAO):

A atividade L-amino oxidase foi avaliada utilizando como substrato o aminoácido L-leucina 30 µM. A figura 3 a seguir apresenta a atividade LAAO segundo o método de *Prussian blue*, comparando a quantidade de oxigênio liberado pela reação entre o substrato e as peçonhas brutas de *Bothrops moojeni*, *Crotalus* sp., e *R. agamemnon*. Como controle positivo de LAAO foi utilizado uma L-amino oxidase purificada de *Bothrops atrox* (Sigma Aldrich), e como controle negativo, o tampão de ensaio Tris-HCl pH 7,0.

A figura 7 ainda demonstra que a peçonha bruta de *B. moojeni* e a LAAO comercial produzem praticamente a mesma quantidade de peróxido de oxigênio; muito

semelhante ao que é demonstrado também para a peçonha bruta de *R. agamemnon*. Em contrapartida, a peçonha de *Crotalusdurissus*, apresentou baixa atividade amino oxidásica quando comparado aos controles.

Todas as peçonhas, bem como a LAAO comercial, foram utilizadas em uma concentração de 4mg/mL.

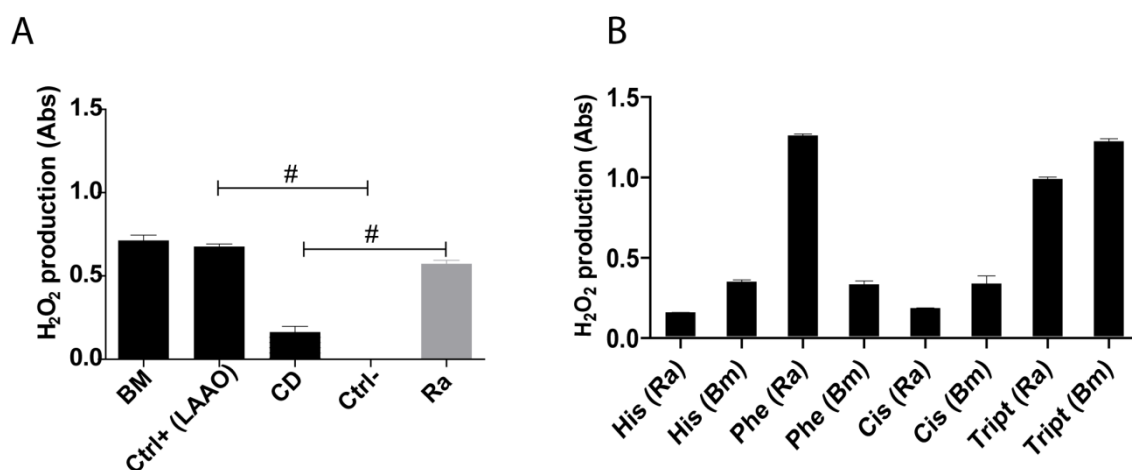


Figura 7 - Atividade LAAO. A - Atividade de diferentes peçonhas para L-Leucina. B - Atividade das peçonhas brutas de *Rhopalurusagamemnon* e *Bothropsmoojeni* para diferentes L-aminoácidos. Tris-HCl controle negativo de atividade LAAO. Bm: peçonha bruta de *Bothropsmoojeni* 4 mg/mL. LAAO: L-amino oxidase comercial, purificada a partir da peçonha bruta de *Bothropsatrox*, 4 mg/mL (Sigma Aldrich). Cd: peçonha bruta de *Crotalusdurissus* 4mg/mL. Ra: peçonha bruta de *Rhopalurusagamemnon* 4 mg/mL. ## - é a diferença significativa entre a peçonha de *R. agamemnon* e as peçonhas de *C. durissus* e *B. atrox* - LAAO comercial ($p \leq 0.05$).

4.1.3 - Atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi avaliada utilizando o ácido dinitrosalicílico e também por zimografia utilizando amido de milho como substrato. A figura 8A a seguir apresenta a quantidade de produto formado após três minutos de atividade enzimática. Como controles foram usados saliva humana (para atividade amilase positiva) e o próprio tampão de ensaio (amilase negativo). A figura 8B apresenta a atividade amilolítica em gel da peçonha de *R. agamemnon* com uma única banda em torno de 50kDa.

A peçonha bruta de *R. agamemnon* utilizando o ácido dinitrosalicílico apresentou atividade amilolítica quase 50% maior que a saliva testada. Os resultados são apresentados em unidades de atividade enzimática.

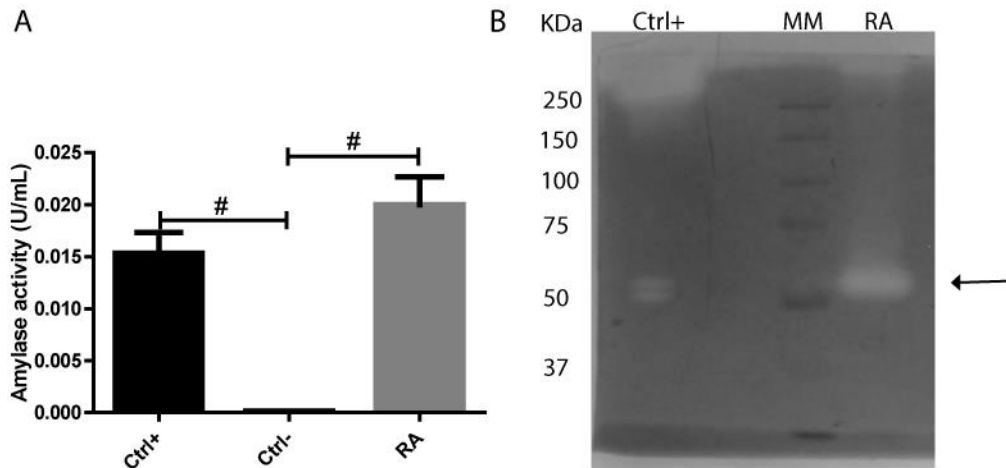


Figura 8. A - Atividade amilolítica da peçonha bruta de *R. agamemnon*. Tampão fosfato de sódio 0,02M controle negativo de atividade. Saliva: 1mL de saliva humana centrifugada. RA: peçonha bruta de *Rhopalurus agamemnon* 4mg/mL. B - Atividade amilolítica em gel: Ctrl+ é saliva humana centrifugada; MM é o marcador molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards); e RA é peçonha bruta de *Rhopalurus agamemnon* (46 µg). # - é a diferença significativa entre a peçonha de *R. agamemnon* e o controle negativo, bem como entre a saliva e o controle negativo ($p \leq 0.05$).

4.2- Citotoxicidade

4.2.1 - Atividade antibacteriana e antifúngica:

A peçonha bruta de *R. agamemnon* não apresentou atividade inibitória contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* nas condições e concentrações testadas como apresentado na figura 9 abaixo:

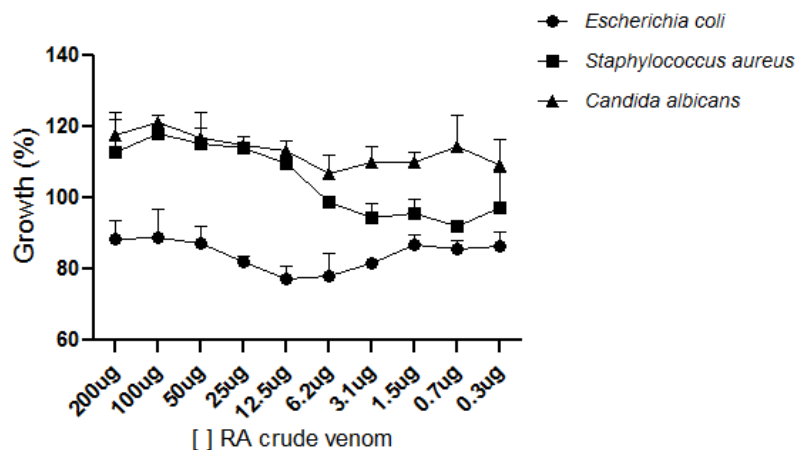


Figura 9 - Atividade antimicrobiana. Efeito da peçonha bruta de *R. agamemnon* sobre linhagens de bactérias Gram-positivas - *S. aureus* (SA); Gram-negativas - *E. coli* (EC); e o fungo *C. albicans* (CA). O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações de peçonha (200-0.3 µg/mL). A viabilidade celular foi avaliada por turbidimetria a 595 nm. Os dados são expressos em média \pm SD (desvio padrão) de experimentos realizados em triplicata.

4.2.2 – Viabilidade celular

Para avaliar o potencial citotóxico da peçonha bruta de *R. agamemnon* foram realizados testes de viabilidade, por meio do método do MTT, em células de adenocarcinoma mamário (MCF7), melanoma murino (B16F10) e fibroblastos murinos (NIH 3T3). As células foram tratadas com diferentes concentrações de peçonha e após 24h foram avaliadas quanto à sobrevivência.

Os resultados obtidos mostraram que a peçonha bruta foi citotóxica, de maneira dose-dependente, para células MCF7. O efeito da peçonha de *R. agamemnon* sobre a viabilidade de células MCF7 é mostrado na figura 10. Foram testadas concentrações de 11,5 a 1500 $\mu\text{g/mL}$, e o IC50 foi calculado em 101.2 $\mu\text{g/mL}$ (concentração capaz de reduzir o número de células viáveis pela metade).

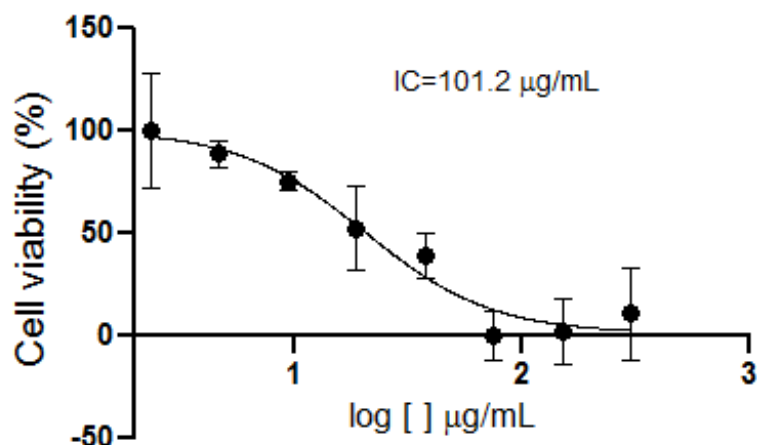


Figura 10 - Atividade citotóxica. Efeito da peçonha bruta de *R. agamemnon* sobre as células de adenocarcinoma mamário (MCF7). O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações de peçonha (1500-11.5 $\mu\text{g/mL}$). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, e o IC50 determinado em 101.2 $\mu\text{g/mL}$ de peçonha bruta. Os dados são expressos em média \pm SD (desvio padrão) de experimentos realizados em triplicata.

O efeito citotóxico da peçonha bruta sobre células B16F10 e NIH 3T3 é mostrado nas figuras 11 e 12 respectivamente. Foram testadas concentrações de 11,5 a 1500 $\mu\text{g/mL}$, e após 24 horas de tratamento o efeito citotóxico não pôde ser observado. O efeito da peçonha bruta sobre estas linhagens não foi dose-dependente, na faixa de concentrações avaliadas, e mesmo a maior concentração de peçonha testada sobre essas células não foi capaz de reduzir o número de células viáveis, o que impossibilitou o cálculo do IC50 por meio deste experimento. Este resultado sugere

que o melanoma e os fibroblastos murinos são resistentes ao efeito citotóxico da peçonha bruta de *R. agamemnon*.

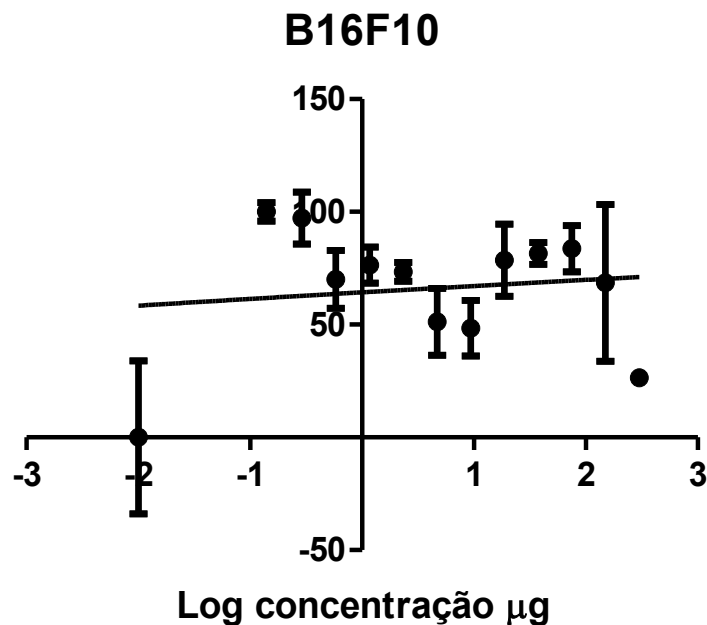


Figura 11 - Atividade citotóxica. Efeito da peçonha bruta de *R. agamemnon* sobre células de melanoma murino (B16F10). O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações de peçonha (1500-11.5 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. A maior concentração testada não foi suficiente para diminuir a viabilidade celular. Os dados são expressos em média \pm SD (desvio padrão) de experimentos realizados em triplicata.

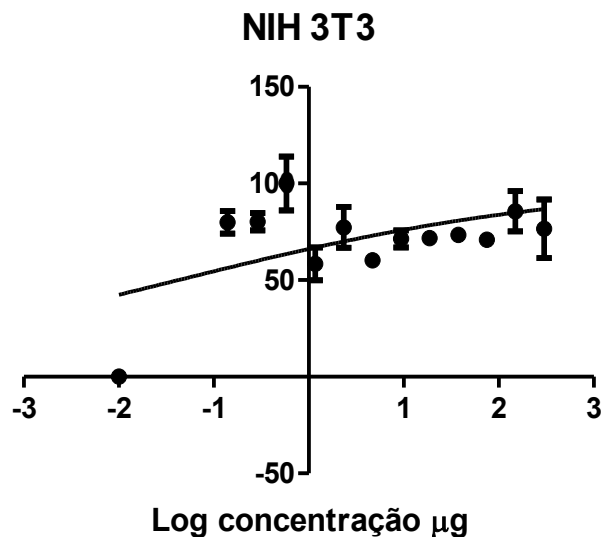


Figura 12 - Atividade citotóxica. Efeito da peçonha bruta de *R. agamemnon* sobre células de fibroblastos murinos (NIH 3T3). O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações de peçonha (1500-11.5 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. A maior concentração testada não foi suficiente para diminuir a viabilidade celular. Os dados são expressos em média \pm SD (desvio padrão) de experimentos realizados em triplicata.

4.2.3 - Atividade hemolítica:

A peçonha bruta de *R. agamemnon* foi testada também quanto ao seu potencial hemolítico. Após 1 h incubada com eritrócitos murinos a 2%, é possível notar que a peçonha bruta não apresenta hemólise nas concentrações testadas, apresentando na dose mais alta apenas 24 ± 0.5 % de hemólise quando comparado com Triton-X 100.

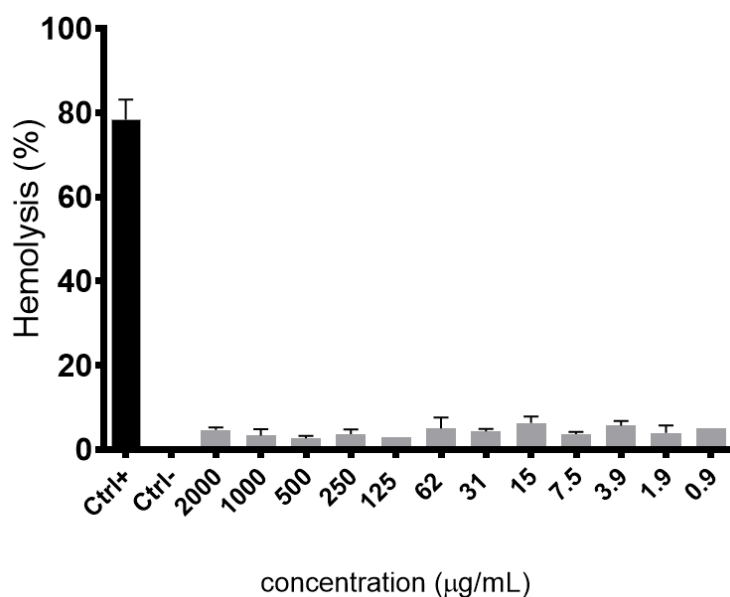


Figura 13 - Atividade hemolítica. Avaliação do efeito da peçonha bruta de *R. agamemnon* sobre eritrócitos murinos. O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações de peçonha (2000-0.9 µg/mL). Triton X-100 foi utilizado como controle de hemólise e Tris-salina foi utilizado como controle de não hemólise. A maior concentração testada não foi suficiente para obter uma hemólise significativa. Os dados são expressos em média \pm SD (desvio padrão) de experimentos realizados em triplicata.

4.3 - Gel prata

A análise do perfil proteico do gel SDS-PAGE da peçonha de *R. agamemnon* apresentou bandas de 97, 67, 50, 45, 40, 32 kDa, além de muitas bandas menores entre 14-30 kDa (figura 14).

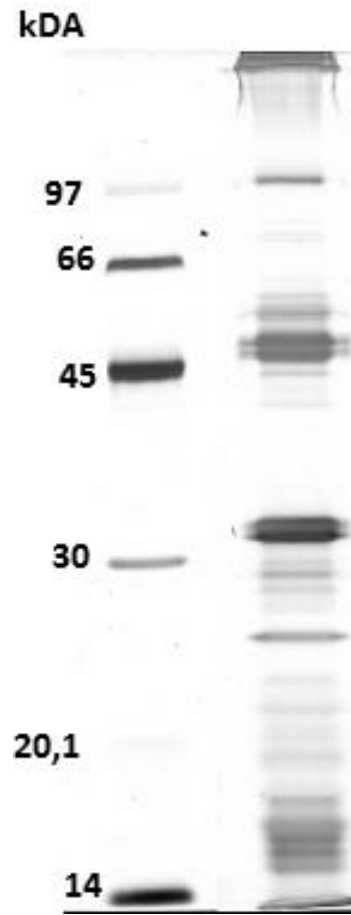


Figura 14 - SDS-PAGE. Perfil eletroforético da peçonha bruta de *R. agamemnon* reduzido em SDS-PAGE 15% seguido por coloração com nitrato de prata. A peçonha foi aplicada em uma concentração de 10 µg. À esquerda é possível ver o marcador molecular.

5 – Discussão

A maior parte dos trabalhos que se propõem a isolar componentes da peçonha de escorpiões direciona os esforços para caracterizar moduladores de canais iônicos, o que faz destes polipeptídeos os componentes melhor estudados em peçonhas escorpiônicas. Em geral, acredita-se que a atividade tóxica da peçonha de escorpiões é predominantemente atribuída aos moduladores de canais iônicos, especialmente os canais de Na⁺, K⁺, Ca⁺ e Cl⁻ [2]. Estudos recentes têm apresentado, além desses peptídeos, outras moléculas que desempenham um papel no envenenamento ou que possuem potencial biotecnológico também estão presentes nas peçonhas de escorpiões, como mucopolissacarídeos, nucleotídeos, aminas vasoativas (serotonina ou histamina), inibidores da protease e enzimas [81,82].

É hipotetizado que os inibidores de protease desempenham um papel essencial na sobrevivência de animais peçonhentos através da proteção de toxinas peptídicas contra a degradação por proteases em suas presas ou predadores [83]. No entanto, a função biológica dos inibidores de protease em peçonhas de escorpiões permanece desconhecida. Diferente do que se tem descrito para algumas espécies de escorpiões da família Buthidae, como, por exemplo, o inibidor de protease de *Mesobuthus europaeus* [83] e o inibidor de tripsina de *Lychas mucronatus* [81], a peçonha de *Rhopalurus agamemnon* não apresentou atividades como inibidor de tripsina, quimotripsina e elastase.

As fosfolipases atuam catalisando a hidrólise dos glicerofosfolipídeos, produzindo ácidos graxos. Esses ácidos graxos estão envolvidos na formação de ácido araquidônico e prostaglandinas durante a formação do edema pulmonar, bem como na destruição tecidual atribuída à lise das membranas lipídicas durante a difusão da peçonha na síndrome do envenenamento [84]. Apesar da descrição das fosfolipases nas peçonhas de escorpião, nenhuma atividade foi detectada nas peçonhas de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus* [82]. Resultados semelhantes também foram relatados por Almeida et al. (2012), que também não encontraram a presença de fosfolipases na glândula de peçonha de *Tityus* spp utilizando análise transcriptômica [85]. Além disso atividade fosfolipásica também não foi detectada para *Rhopalurus junceus* [72], resultados que corroboram os resultados encontrados no presente trabalho. A ausência da atividade fosfolipásica pode justificar porque o

envenenamento em humanos é menos severo quando comparado a outras espécies da família Buthidae.

Proteases são importantes componentes de peçonhas em geral. Essas enzimas estão envolvidas no processamento pós-traducional de outros componentes contidos na peçonha, assim como na inibição da agregação plaquetária, na modulação da produção de citocinas ou na ativação do sistema complemento. A atividade de protease foi detectada em várias peçonhas de escorpião. Entretanto, pouca informação sobre sua estrutura primária foi acessível. Em nosso trabalho, não detectamos atividade gelatinolítica na peçonha de *Rhopalurus agamemnon*. No trabalho de Almeida et al. (2002) [70], uma atividade de gelatinase associada a serino proteases foi observada em peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Além disso, uma atividade de gelatinase atribuída à presença de uma metaloprotease foi observada na peçonha de *Hemiscorpius lepturus*[71].

A atividade proteásica detectada para a peçonha de *R. agamemnon* se deu quando o substrato usado foi caseína, apresentando uma banda em aproximadamente 23 kDa. Ao testarmos a atividade proteásica em substratos colorimétricos, a peçonha bruta de *R. agamemnon* não apresentou atividade para as condições testadas. Essas discrepâncias podem ser devido aos métodos utilizados e/ou variações intraespecíficas / interespecíficas na composição da peçonha [82], ou ainda a peçonha de *R. agamemnon* pode possuir outros tipos de proteases como cisteino e metaloproteases que não seriam detectadas com o substrato BapNa.

A hialuronidase é uma enzima conhecida pela sua função difusora nos tecidos, e está presente nas peçonhas de muitas cobras, abelhas, aranhas e escorpiões. Sua atividade potencializa a toxicidade da peçonha promovendo a perda da integridade da matriz extracelular nos tecidos conectivos moles que circundam os vasos sanguíneos, aumentando assim a difusão sistêmica de toxinas [86]. Um componente de 44,8 kDa exibindo atividade de hialuronidase foi encontrado nas peçonhas de *T. stigmurus*, *T. pachyuruse* *T. costatus* [87]. Em *T. serrulatus*, uma molécula de 51 kDa exibindo atividade de espalhamento de toxina também foi purificada [5], bem como uma hialuronidase foi isolada a partir da peçonha de *T. bahiensis* [82]. Em *Rhopalurus junceus* uma fração foi identificada com atividade hialuronidásica e massa molecular de aproximadamente 45kDa [72,88]. Nossos

resultados são semelhantes aos encontrados para *R. junceus*, também apresentando atividade hialuronidásica em zimograma, com massa molecular aproximada de 45 kDa.

L-aminoácidos oxidases são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em α -cetoácidos com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [89]. São amplamente encontrados em peçonhas de cobra e acredita-se que contribuam para a toxicidade do envenenamento. O mecanismo desses efeitos tóxicos e se eles são resultantes da atividade enzimática ainda é incerto, embora muitos trabalhos tenham descrito os efeitos biológicos e farmacológicos das L-aminoácido oxidases. Exercem uma variedade de efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo citotoxicidade, indução de apoptose, ativação e inibição da agregação plaquetária, hemorragia, hemólise, edema e morte de bactérias e parasitas [18,90]. Essa é a primeira descrição de uma L-aminoácido oxidase para peçonha de escorpião e a sua função na peçonha é desconhecida, o que torna a peçonha de *Rhopalurus agamemnon* uma fonte muito interessante de compostos biologicamente ativos, e que merecem ser melhor explorados.

As amilases são hidrolases que tem a função de degradar carboidratos. Elas são predominantemente produzidas pelas glândulas parótidas e pâncreas. A digestão do amido tem início na boca por ação da enzima α -amilase salivar, conhecida também por ptialina, que hidrolisa as ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ das cadeias do amido, produzindo glicose, maltose e oligossacarídeos. Até o presente momento não existem descrições de atividade amilásica em peçonhas escorpiônicas. Sabe-se, no entanto, que picadas escorpiônicas graves aumentam os níveis de amilase sérica devido aos danos no pâncreas. O papel desta enzima na peçonha não está claro e até agora não podemos afirmar se a enzima por si só seria uma toxina.

A peçonha bruta de *R. agamemnon* não apresentou atividade inibitória contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e tão pouco contra o fungo *C. albicans* nas condições e concentrações testadas. Esse resultado é inesperado quando se trata de toxinas escorpiônicas. De maneira geral peçonhas escorpiônicas apresentam atividade antimicrobiana e antitumoral, principalmente devido aos peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBP's), como por exemplo, a Mauriporin, um NBDP isolado a partir da peçonha de *Androctonus mauritanicus*, que além de sua potente atividade seletiva

contra células de câncer de próstata, apresenta uma potente atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, e Gram-negativas [91]. Outros peptídeos antimicrobianos descritos na peçonha de escorpião são as Opistoporinas 1 e 2 de *Opistophtalmus carinatus*; as Pandininas 1 e 2 e a Scorpina de *Pandinus imperator*; a Hadrurina de *Hadrurus aztecus*; a Parabutorina de *Parabuthus schlechteri*; o peptídeo BmKbpp de *Buthus martensii*; os peptídeos IsCT 1 e 2 de *Opisthacanthus madascariensis* [45].

Por outro lado, ao contrario dos NDBP's, outros componentes da peçonha escorpiônica podem ser altamente específicos, como por exemplo, os moduladores de canais iônicos.

Os canais de cloreto e potássio, por exemplo, são superexpressos em algumas células de glioma, o que os torna alternativas promissoras e alvos de terapias anticancerígenas.

Esta uma propriedade característica da clorotoxina, um peptídeo isolado a partir da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, que se liga especificamente aos canais de cloreto [61,92] que estão firmemente envolvidos no mecanismo de mobilidade das células cancerosas [93]; e prejudica a invasão de glioma in vitro [94,95].

O mesmo se dá para os canais de sódio voltagem dependentes que são funcionalmente superexpressos em vários tipos de cânceres humanos, e diretamente relacionados com a progressão metastática [96,97]. Aparentemente, eles estão envolvidos no processo metastático através de suas interações com diferentes tipos de proteínas citoplasmáticas e enzimas, como a adenilato ciclase e fosfoquinase que medeiam à transdução de sinais regulando a motilidade celular [97].

Peptídeo Analgésico-Antitumoral (AGAP), foi purificado da peçonha do escorpião chinês *Buthus martensii* [98], tem 66 resíduos de aminoácidos com quatro pontes dissulfeto e pertence às toxinas escorpiônicas de cadeia longa que reconhecem canais de sódio [99]. AGAP tem atividade antiproliferativa por parar o ciclo celular na fase G1 de células SW480 de adenocarcinoma do cólon humano[100]. AGAP também inibe a proliferação de células de gliomas SHG-44[101].

Esses estudos anteriores podem justificar, em parte, porque a peçonha de *Rhopalurus agamemnon* apresentou atividade inibitória para MCF-7 e nenhuma atividade inibitória para B16F10 e NIH3T3. Esses resultados são semelhantes aos encontrados para *Buthus martensii*, cuja peçonha bruta inibiu seletivamente o crescimento e a proliferação de células MCF-7, induzindo apoptose [102]. Possivelmente diferenças estruturais entre esses tipos celulares justificam a diferença de sensibilidade observada.

A banda em torno de 45 kDa é semelhante ao que já foi descrito para *Tityus bahiensis*, *T. obscurus*, *T. serrulatus*; A banda visualizada em 67 kDa para *R. agamemnon* é semelhante à encontrada em 63 kDa exclusivamente na peçonha de *T. obscurus*. Já as bandas abaixo de 14 kDa não foram exploradas pela eletroforese, mas foram detectadas pela espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, que favorece a ionização de componentes de baixa massa, como peptídeos moduladores de canais iônicos [2]. As duas abordagens são importantes para demonstrar a riqueza de compostos na peçonha de *Rhopalurus agamemnon*, no entanto uma abordagem mais profunda precisa ser realizada para que seja possível fazer uma melhor caracterização química da peçonha.

Capítulo 2- Análise proteômica e transcriptômica da peçonha bruta de *Rhopalurus agamemnon*.

1-Introdução

Os escorpiões artrópodes carnívoros muito bem-sucedidos que habitam o planeta há 450 milhões de anos, e habitam todos os principais ecossistemas terrestres de nosso planeta [103]. Seu sucesso depende da produção da peçonha rica em compostos neurotóxicos muito potente que paralisa e mata suas presas e repele suas competidores ou predadores [43].

Muitos componentes da peçonha escorpiônica são potenciais para o desenvolvimento de drogas [11,45,104] ou são ferramentas úteis para pesquisa, portanto é de extrema importância caracterizar sua rica complexidade. É importante ressaltar que estima-se que menos de 2% dos componentes da peçonha escorpiônica tenham sido identificados das mais de 2000 espécies de escorpiões descritas atualmente [105].

Uma das razões para a lacuna de conhecimento da constituição de peçonhas está nas dificuldades impostas pela necessidade de coletar um número relativamente grande de espécimes de ambientes naturais para extrair a peçonha e purificá-la em quantidade grande para avaliar as atividades biológicas. Portanto, alternativas devem ser propostas para superar a falta de espécimes para caracterização bioquímica clássica. Duas tecnologias ajudaram parcialmente lidar com esta limitação no passado recente: a triagem de bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNAs de glândula de peçonha [106,107] e a expressão heteróloga dos peptídeos codificados para caracterização [108].

Com o advento de técnicas de alto rendimento para análises transcriptômicas e proteômicas é possível aumentar o número de proteínas identificadas em peçonhas. Apenas alguns indivíduos são necessários para caracterização proteômica e transcriptômica [69,107].

2- Objetivos

- Realizar o sequenciamento *de novo* dos peptídeos originados da digestão trípica da peçonha bruta de *R. agamemnon* utilizando fragmentação do tipo ETD.

- Descrever por meio de análise do transcriptoma da glândula de peçonha o possível conteúdo protéico presente na glândula.
- Caracterizar o proteoma da peçonha do escorpião brasileiro *Rhopalurusagamemnon* pela abordagem de *Shotgun*.
- Descrever o transcriptoma da glândula de peçonha de *Rhopalurusagamemnon*

3- Materiais e métodos

3.1 PROTEÔMICA

3.1.1 - Digestão protéica da peçonha

A peçonha foi extraída como descrito no item 1.1 do capítulo 1 desta tese.

Uma alíquota de cem microgramas de proteína foi digerida com Tripsina (SIGMA-proteomic grade). À solução de proteína foi adicionado 15ul de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM e 1,5 μL de 1, 4-Dithio- DL-threitol (DTT) 100 mM e incubado a 90 °C durante 7 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, adicionou-se 3 μL de iodoacetamida (IAA) 100 mM e incubou-se durante 25 minutos no escuro. Após esse período acrescentou-se 1 μL de 0,1 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de tripsina modificada para espectrometria de massas e incubou-se a 37 ° C durante 4 h. Finalmente, adicionou-se mais 1 μL de tripsina e incubou-se durante a noite a 30 °C.

3.1.2 - Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massa LC-MS/MS

As amostras de peptídeos foram ressuspensas em ácido fórmico a 0,5% (FA) e fracionadas utilizando um sistema nano HPLC Easy-nLC II (Proxeon) numa embalagem interna 2 cm \times 150 μm ; Pré-coluna (Reprosil-Pur C18-AQ, 5 μm , 120 Å, Dr. Maisch) e 20 cm \times 75 μm i.d. (Reprosil-Pur C18-AQ, 3 μm , 120 Å, Dr. Maisch) acoplado a um espectrômetro de massa LTQ Velos Orbitrap (ThermoScientific). A cromatografia foi realizada a 300 nL / min com 95% de água, 5% de ACN e 0,1% de FA como fase móvel A e 95%, 5% de água e 0,1% de FA como fase B. O espectrômetro de massa Orbitrap foi controlado pelo software Tune 2.6.0 e Xcalibur 2.1 e foi configurado para operar no modo de aquisição dependente de dados (DDA)

para alternar automaticamente entre MS completo e aquisição de MS / MS. Os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por ETD-MS / MS.

3.1.3 - Análise de dados

“Para a análise dos dados, os arquivos com a extensão “.raw” gerados pelo espectrômetro, foram importados pelo software Peaks Studio 7 para a realização de sequenciamento *de novo* dos peptídeos a partir dos espectros e buscas em bancos de dados. Como parâmetros de análise foram escolhidos íon precursor de 15ppm e tolerância de fragmentação 0,6 Da. Como modificações fixas Carbamidometilação de cisteína e oxidação, metilação, hexose e amidação como modificações variáveis.

As sequências encontradas foram confrontadas contra o Banco de dados Buthidae do Uniprot (3849 entradas em 02/2019), bem como o banco de LAAO do Uniprot (65547 entradas em 02/2019) gerados no formato FASTA, Apenas as proteínas possuindo pelo menos um peptídeo único foram aceitos e as proteínas foram filtradas a 1% de FDR. Os dados estão disponíveis no ProteomeXchange sob o número [PXD020465](#).

3.2 - TRANSCRIPTÔMICA

3.2.1 – Coleta das glândulas

Para remover as glândulas de peçonha, os escorpiões foram primeiro anestesiados por aproximadamente 15 minutos em hipotermia (4 °C). Uma vez totalmente anestesiado, o telson foi removido com tesoura cirúrgica e cortado com uma lâmina microcirúrgica da base até a ponta. Pinças foram usadas para descascar cada lado do telson para acessar as glândulas de peçonha. As glândulas foram removidas usando pinças cirúrgicas curvas raspando o interior de cada lado telson. O tecido da glândula foi imediatamente transferido para 100 µL de *RNA/ater*. As glândulas no *RNA/ater* foram mantidas a 4 °C durante a noite e transferidas para -80° C até o uso posterior.

3.2.2 – Extração de RNA

A glândula de peçonha foi retirada do *RNA/ater* e colocada em um tubo RNA-free com 20 µL de Trizol (Invitrogen). Na solução de Trizol a glândula foi macerada com uma alça plástica e, em seguida, mais 480 µL de Trizol foram adicionados à amostra e homogeneizado até dissolver completamente o tecido. As amostras foram

colocadas em gelo por 5 minutos e adicionados 100 µL de clorofórmio, homogeneizadas e deixadas à temperatura ambiente por 2 minutos.

As amostras foram então centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante (contendo RNA) transferido para outro tubo com 250 µL de isopropanol gelado (4 °C), homogeneizado e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida foram novamente centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o pellet dissolvido em 500 µL de etanol 75% v/v.

As amostras foram centrifugadas pela terceira vez a 12000 xg por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o pellet seco por evaporação a temperatura ambiente. A amostra de RNA foi quantificada em um espectrofotômetro de micro volume tipo Nanodrop (ThermoScientific) segundo recomendações do fabricante.

3.2.3 – Sequenciamento de RNA

O mRNA foi transcrito reversamente, fragmentado e ligado a um identificador multiplex (MID) exclusivo de 10 bases preparado usando protocolos padrão e aplicado a um PicoTitrePlate (PTP) para amplificação e sequenciamento simultâneos em uma plataforma Roche 454 GS FLX + Titanium (Australian GenomeResearchFacility).

3.2.4 – Controle de qualidade e Assembly

As sequências foram processadas para remover sequências de baixa qualidade antes da montagem *de novo* em sequências contíguas (*contigs*) usando a v3.4.0.1 do software MIRA. Os contigs foram processados usando CLC MainWorkBench (CLC-Bio) e o conjunto Blast2GO. As sequências foram confrontadas com oBLASTp e anotadas.

4- Resultados

4.1 - Identificação de proteínas e peptídeos na peçonha de *Rhopalurus agamemnon* utilizando proteômica *shotgun* e transcriptoma da glândula de peçonha.

A análise proteômica identificou 230 componentes protéicos presentes da peçonha analisada. (anexo II) quando confrontados com o banco de dados 'Buthidae' do Uniprot.

A análise transcriptômica sequenciou 20200 fragmentos protéicos, destes 1235 seqüências foram identificados/classificados como componentes da peçonha.

Dentre as classes de proteínas identificadas tanto no proteoma quanto no transcriptoma estão os moduladores de canais iônicos, enzimas, peptídeos antimicrobianos, peptídeos imunomoduladores, peptídeos miotóxicos, peptídeos ricos em cisteína, inibidor de proteases e proteínas CRISP.

Apenas uma classe de proteínas foi encontrada exclusivamente em uma das análises: Os peptídeos potencializadores de bradicinina foram encontrados exclusivamente na análise proteômica, e as Scoloptoxinas foram encontradas apenas na análise do transcriptoma.

4.2- Classes de proteínas identificadas

4.2.1 - Identificação das toxinas moduladoras de canais de Sódio (NaTx)

Os componentes da peçonha de escorpião mais bem estudados são as toxinas moduladoras de canais iônicos, em especial as que modulam canais de sódio (NaTx). São os componentes mais abundantes na peçonha e responsáveis pela toxicidade em humanos [4]. Este grupo pode ser dividido em duas classes: α -toxinas que se ligam ao Sítio 3 e β -toxinas que se ligam ao Sítio 4. Possuem de 60-80 resíduos de aminoácidos estruturados em quatro pontes dissulfeto altamente conservadas [56].

A análise proteômica da peçonha bruta de *R. agamemnon* em LC-MS identificou 39 toxinas moduladoras de canais de sódio correspondendo a mais de 46% das toxinas identificadas (figura 14).

3.2.2 - Identificação de toxinas moduladoras de canais de potássio (KTx)

Os canais de potássio, assim como os canais de sódio, são uma grande família de proteínas transmembrana com papel importante em processos celulares como manutenção do potencial de membrana em repouso, liberação de neurotransmissores e excitabilidade neuronal. Muitas toxinas escorpiônicas que

atuam em canais de potássio (KTx) tem sido caracterizadas devido ao potencial para prospecção contra células tumorais, tratamento de doenças autoimunes e distúrbios neurológicos. As KTx de escorpião podem ser divididas em quatro grupos principais: α , β , γ e κ -KTx segundo as estruturas secundárias [109].

O proteoma da peçonha bruta de *R. agamemnon* identificou cinco KTxs, aproximadamente 6% das toxinas identificadas, o que sugere que estas estejam em menor quantidade na peçonha desta espécie (figura 14).

A análise do transcriptoma identificou 519 sequências como moduladores de canais iônicos como sódio, potássio e cálcio, representando 42% dos componentes identificados no transcriptoma da glândula (figura 15).

4.2.3 - Identificação de enzimas

Das enzimas encontradas pela análise proteômica a maioria são metaloproteases (50% do total de enzimas), seguidas de amilase (23%), Enzima conversora de angiotensina (11.5%), CRISP - *Cystein-rich secretory protein* (7.6%), Hialuronidase (3.8%) e Fosfodiesterase (3.8%).

Resultados similares são observados na análise do transcriptoma que apresenta uma maior porcentagem de metaloproteases (59%), seguidas por enzimas conversoras de angiotensina – ACE (9%), cisteino protease (8%), serino protease (7%), hialuronidase (6%), quimotripsina-*like* (5%), maltase e fosfolipase (3% cada) e acetilcolinesterase (0.6%).

Estudos prévios demonstraram atividade L-amino oxidase (LAAO) na peçonha bruta de *R. agamemnon*, o que nos fez buscar alguma ocorrência desta proteína na análise proteômica. Como não existem LAAOs descritas para peçonha de escorpião, um banco de dados de LAAOs do Uniprot foi confrontado com as proteínas sequenciadas. Dois peptídeos foram compatíveis com uma LAAO da peçonha da cobra *Daboia russeii*, representando 10% de cobertura (tabela 1). Nenhuma sequência similar a LAAO foi encontrada no transcriptoma.

4.2.4 - Peptídeos sem ponte dissulfeto - NDBP

Os peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBP) formam um grande grupo de toxinas escorpiônicas que abriga moléculas estruturalmente muito diferentes e com múltiplas atividades biológicas, entre elas atividades antimicrobianas, antitumorais,

hemolíticas, antiinflamatórias, imunomodulatórias e potencializadora de bradicinina. [110].

4.2.4.1 - Identificação de peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos estão incluídos no grande grupo de peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBP).

A análise proteômica da peçonha de *R. agamemnon* identificou quatro peptídeos antimicrobianos semelhante a Scorpin de *Pandinus imperator* que possui atividade antimalárica e antimicrobiana (tabela 1) .

O transcriptoma identificou 41 sequências de peptídeos antimicrobianos, a maioria da família das defensinas de *Rhipicephalus microplus* (carrapato-de-boi), *Bombyx mori* (bicho-da-seda); além de peptídeos semelhantes à Mauriporin de *Androctonus mauritanicus* e Ponericin-W-like de *Lychas mucronatus*.

A baixa ocorrência de peptídeos antimicrobianos no proteoma (~4%) (figuras 1 e 2), e no transcriptoma (~3%), além da ausência de atividade biológica (vide capítulo 1) sugerem que estes NDBP possam ter outras atividades biológicas ou atividade antimicrobiana insignificante.

4.2.4.2 - Peptídeos potencializadores de bradicinina - BPP

A bradicinina é um peptídeo vasoativo que desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial, pois aumenta a vaso dilatação e permeabilidade capilar e conseqüentemente reduz a pressão arterial. A enzima conversora da angiotensina (ECA) inativa proteoliticamente a bradicinina. Os BPPs atuam como inibidores da ECA e são candidatos a fármacos para tratamento de hipertensão. Neste trabalho, a análise proteômica identificou dois peptídeos escorpiônicos possivelmente com atividade potencializadora de bradicinina e entre as enzimas pelo menos uma entrada compatível com a ECA (figura 15), sugerindo a presença destas proteínas na peçonha, apesar de aparentemente terem atividades opostas [110].

4.2.4.3 - Peptídeos que atuam na contração muscular

Neste trabalho foi encontrado, no proteoma e no transcriptoma, um peptídeo semelhante à Fulicilin (Fulicin-like) (tabela 1). A Fulicilin é um neuropeptídeo inicialmente isolado do gânglio do caramujo-gigante-africano *Achatina fulica*. Este

peptídeo possui resíduos de aminoácidos na isomeria D, neste caso D-Asn, e atua prolongando a contração tetânica do músculo retrator peniano do caramujo além de modular a contração dos músculos bucais e ventriculares [111].

Além da Fulicin também foi identificado, tanto no proteoma como no transcriptoma, o peptídeo Orcokinin que também atua na contração de musculatura lisa e foi descrito em crustáceos, mas não descritos para aracnídeos [112].

4.2.4.4 - Imunomoduladores

Os peptídeos imunomoduladores da peçonha de escorpião pertencem à grande família de peptídeos catiônicos de defesa. Geralmente interagem com as membranas biológicas e atuam como formadores de poros, causando a desestabilização da membrana celular que, eventualmente, leva à lise e morte celular. No entanto, estes peptídeos também podem estar relacionados à função celular, interagindo com moléculas de sinalização celular e, conseqüentemente, modulando a resposta imune da célula [110].

No proteoma apenas dois peptídeos *venom allergen 5-like* (figura 15) foram identificados na peçonha de *R. agamemnon*. Estes peptídeos foram primeiramente isolados na peçonha da vespa *Polybia paulista* [113]. Sua função é ainda desconhecida, mas tem sido relacionada à resposta alérgica em humanos[114].

No transcriptoma 45 seqüências identificadas como *Venom allergen 5*, semelhantes às encontradas em *Tityus serrulatus*, *Microctonus hyperodae* (vespa-parasita) e *Lycosa singoriensis* (aranha-de-grama).

4.2.5- Peptídeos ricos em cisteína (CRP).

Os peptídeos ricos em pontes dissulfeto (CRP) de peçonhas animais como cobras, aranhas, escorpiões e certos caramujos marinhos do gênero *Conus*, representam uma das grandes bibliotecas de diversidade de moléculas bioativas da natureza. Os CRPs isolados da peçonha de *Conus* são os mais bem elucidados pela sua capacidade de alterar a função de canais iônicos específicos [115]. Os CRPs de escorpião possivelmente atuam modulando canais iônicos, mas sua função específica nestes animais ainda não foi elucidada [116].

No proteoma da peçonha de *R. agamemnon* dois CRPs (figuras 1 e 2) semelhantes aos encontrados no cDNA de *Tityus serrulatus* foram identificados; e no

transcriptoma 14 sequências de CRPs semelhantes aos de *Tityus costatus* foram identificados. No entanto investigações mais detalhadas são necessárias para sugerir o papel destes CRPs na peçonha e no envenenamento.

4.2.6- Scoloptoxins

Scoloptoxins (SLPTXs) são toxinas de centípedes que atuam em canais de cálcio, potássio e sódio [117] e estão entre os grupos mais diversos e abundantes de toxinas presentes nesses animais [118]. As SLPTXs estão classificadas em 31 famílias reconhecidas com tamanhos de proteína de 3 a 24 kDa, que contêm de 3 a 18 resíduos de cisteína, ou podem ser também peptídeos lineares [118,119].

Apenas na análise do transcriptoma da glândula de *R. agamemnon* identificou 89 sequências similares a U-Scoloptoxin com até 12 cisteínas na estrutura primária e massa maior de 11 kDa.

4.2.7 -Inibidor de protease e proteínas CRISP

Apesar da peçonha de *R. agamemnon* não apresentar atividade inibitória de serino proteases (vide capítulo 1), 75% dos inibidores de protease identificados no transcriptoma, são sequências de inibidores de serino proteases, contra 16% de cisteino proteases e 7% de inibidores de metaloproteases. A maior parte dos inibidores de serino protease é similar ao BmKTT-3 encontrados na peçonha de *Mesobuthus martensii*, que além da atividade inibidora de tripsina, também inibe as correntes em canais de potássio Kv1.3 [120].

Outra proteína identificada no transcriptoma foi a proteína CRISP (*Cysteine-rich secretory protein*) que tem sido relacionadas ao influxo de íons em alguns processos biológicos, como capacitação espermática [121], no entanto a função destas proteínas em peçonhas de artrópodes ainda não está elucidada.

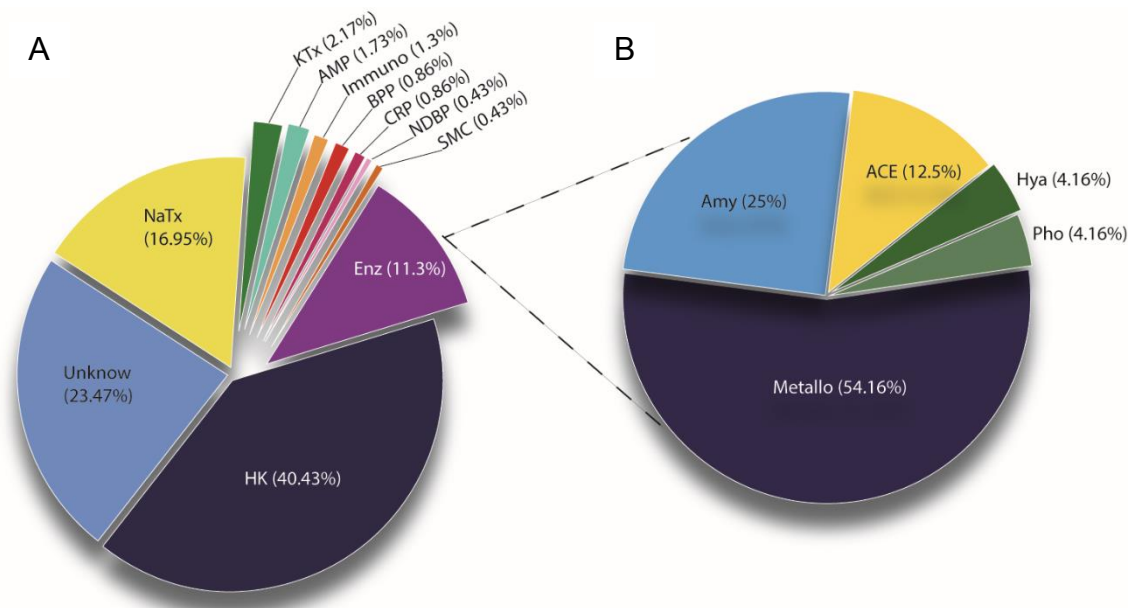


Figura 15 - A - Proteômica total da peçonha de *R. agamemnon* confrontada com o banco 'Buthidae' do NCBI. HK: Proteínas de manutenção; Desconhecido: proteínas com função desconhecida; NaTX: toxinas que atuam nos canais de sódio; Enz: Enzimas; AMP: Peptídeos antimicrobianos; BPP: peptídeos potenciadores de bradicinina; SMC: contração do músculo liso; KTx: toxinas que atuam nos canais de potássio; Imuno: Proteínas imunomoduladoras; CRP: proteínas ricas em cisteína; e NDBP: peptídeos em ponte de dissulfeto. B - Enzimas identificadas no veneno de Ra. Listamos desde as mais abundantes até as menos abundantes Metaloproteinasas (Metallo), Amilases (Amy), Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), Hialuronidase (Hya) e Fosfodiesterase (Pho). Ao todo 230 proteínas foram listadas

Tabela 1 - Proteínas identificadas no proteoma da peçonha de *Rhopalurus agamemnon*. Proteínas identificadas na peçonha de *Rhopalurus agamemnon*. As proteínas foram identificadas nos bancos Buthidae do Uniprot e NCBI. A L-amino oxidase (LAAO) marcada com (*) só foi identificada quando os dados de proteômica foram confrontados com um banco de dados específico de LAAOs do Uniprot. Da esquerda para a direita a tabela apresenta: 1- a proteína identificada; 2- a percentagem de cobertura no Peaks; 3- número de acesso no Uniprot; 4- massa molecular da proteína original; 5- fragmento sequenciado; 6- numero de peptídeos sequenciados; e 7- organismo de referência no banco de dados. Foram listadas na tabela as proteínas características de cada grupo protéico.

Proteína	Cobertura	n° acesso	MM	Peptídeos sequenciados	#peptídeos	Org referencia
Orcokinin-A like	61%	XP_023222256.1	21971	...NLYFQDPAFYLHANRYFRHPGG..	55	<i>Centruroides sculpturatus</i>
Hialuronidase (fragmento)	47%	XP_023226974	17433	...KEEWEKSAKEWMLKTLKLTQD...	5	<i>Isometroides vescus</i>
β-NaTX (fragmento)	100%	tr Q6V4Y4 Q6V4Y4	7137	...KEGYLVKSDGCKYDCFWLGEN...	6	<i>Centruroides sculpturatus</i>
α-KTx	50%	sp Q9TXD1 KAX24	4189	...TIINEKCFATSQCWTPCKK...	1	<i>Centruroides noxius</i>
BPP	40%	sp C9X4J0 NDB2	8731	...FKFGGFLKMWKS LAKLRAK...	31	<i>Tityus discrepans</i>
Antimicrobiano putativo	34%	tr A0A218QXF7 A0A218QXF7	8421	...LIPSLVGGLISAFK...	7	<i>Tityus serrulatus</i>
Metaloprotease	32%	tr A0A1E1WVY7 A0A1E1WVY7	45165	...DGKCVIEFLSVLESNFTKRFLN...	2	<i>Tityus obscurus</i>
Fulicilin-like	27%	XP_023218547.1	22515	...VSEPEQAMSNRGWSV...	7	<i>Centruroides sculpturatus</i>
α-amilase	8%	tr A0A1E1WVL9 A0A1E1WVL9	59579	...MAVAFMLAWPYGLPR...	4	<i>Tityus obscurus</i>

Fosfolipaseputativa	6%	tr A0A218QXE2 A0A218QXE2	32741	...GIFDIADEILPITTNFFR...	1	<i>Tityus serrulatus</i>
LAO*	10%	G8XQX1 OXLA_DABR	56888	...EGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGY R ...	2	<i>Daboia russelii</i>

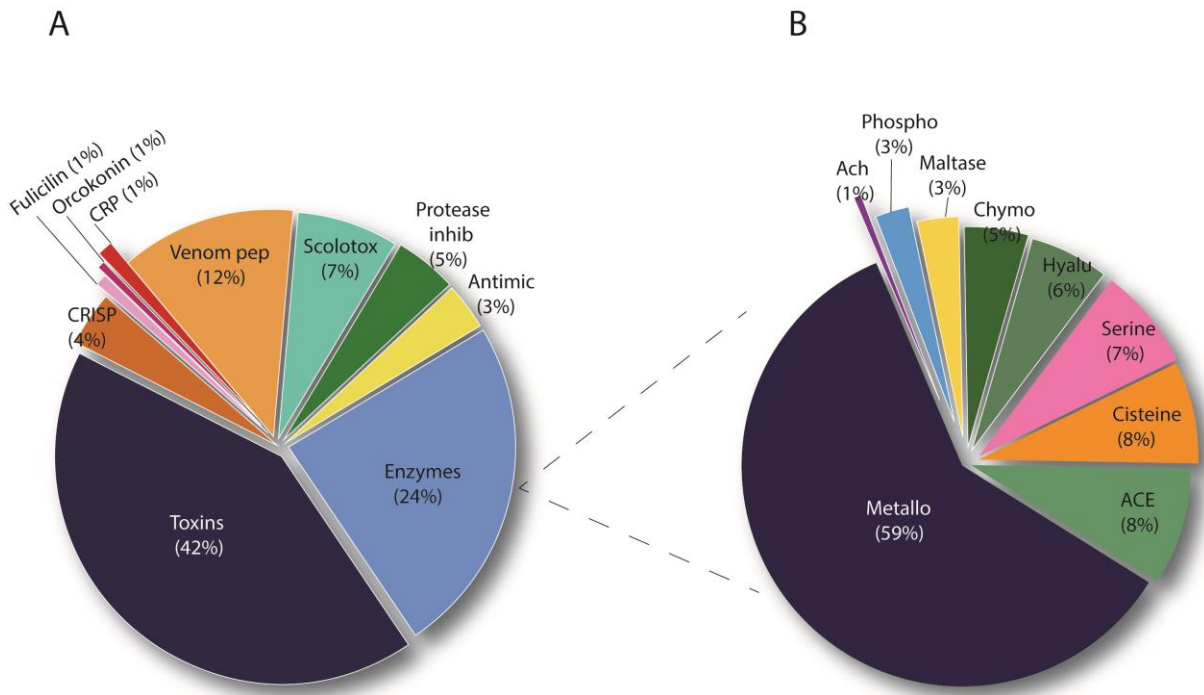


Figura 16 - A - Transcriptoma total da peçonha de Ra. HK: Proteínas de manutenção; Desconhecido: proteínas com função desconhecida; NaTX: toxinas que atuam nos canais de sódio; Enz: Enzimas; AMP: Peptídeos antimicrobianos; BPP: peptídeos potenciadores de bradicinina; SMC: contração do músculo liso; KTx: toxinas que atuam nos canais de potássio; Imuno: Proteínas imunomoduladoras; CRP: proteínas ricas em cisteína; e NDBP: peptídeos em ponte de dissulfeto. B - Enzimas identificadas no veneno de Ra. Listamos desde as mais abundantes até as menos abundantes Metaloproteinasas (Metallo), Amilases (Amy), Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), Hialuronidase (Hya) e Fosfodiesterase (Pho). B – Enzimas identificadas no transcriptoma da glândula de peçonha de *R. agamemnon*. Em ordem de abundância foram identificadas: metaloproteases (metalloy), Enzima conversora de angiotensina (ACE) e cisteíno protease (cisteine), serino proteases (serine), Hialuronidase (hyalu), Quimotripsina (Chymo), Maltase (maltase), Fosfolipase (phospho) e Acetilcolinesterase (ACh).

Tabela 2 - Proteínas identificadas na glândula de peçonha de *Rhopalurus agamemnon*. Da esquerda para a direita a tabela apresenta: 1- a proteína identificada; 2- a percentagem de cobertura no Blastp; 3- numero de acesso no NCBI; 4- massa molecular da proteína madura; 5- número de aminoácidos na proteína; 6- identificação do gene ao qual pertence a proteína; e 7- organismo de referência no banco de dados. Foram selecionadas proteínas representativas de cada grupo protéico.

Proteína	Cobertura blast	n° acesso	MM	#aminoácidos	Gene ID	Org referencia
maltase A2-like	100%	XP_023234442.1	75529	659	111634004	<i>Centruroides sculpturatus</i>
Venomallergen 5-like	99%	XP_023241578.1	47216	418	111639863	<i>Centruroides sculpturatus</i>
alpha-toxin CvIV4	100%	XP_023238166.1	9263	83	111636994	<i>Centruroides sculpturatus</i>
KTx Ts15	93%	QPD99020.1	6870	63	NI	<i>Tityus serrulatus</i>
ToAP2	100%	SBQ16531	9654	79	ToAP2	<i>Tityus obscurus</i>
Putative antimicrobial peptide clone 4	100%	Q5G8B5	8412	73	NI	<i>Tityus costatus</i>
SjAPI-2-like	100%	XP_023229070	8773	81	111629404	<i>Centruroides sculpturatus</i>
kunitz-type serine protease inhibitor A-like	97%	XP_023212076	16300	144	111614934	<i>Centruroides sculpturatus</i>

5- Discussão

Neste estudo, um total de 7435 peptídeos foram sequenciados e destes, 230 sequências de proteínas foram confirmadas na peçonha de *R. agamemnon* pela análise proteômica. Nas peçonhas de escorpião, os componentes protéicos são responsáveis por 30 a 75% do peso seco obtido pela eletro estimulação [122]. Com o desenvolvimento de técnicas proteômicas, como cromatografia líquida e espectrometria de massa, números crescentes de componentes da peçonha podem ser efetivamente separados e identificados. Até agora, existem aproximadamente 790 proteínas registradas no Programa de Anotação Animal UniProt (www.uniprot.org/program/Toxins) de peçonhas de escorpião, mas isso ainda é 1% menor do que o número total esperado de componentes na ordem Scorpiones[123].

Na análise transcriptômica foram identificadas 1235 sequências de proteínas classificadas como toxinas, e que foram divididas em toxinas clássicas com atividade neurotóxica, enzimas, peptídeos antimicrobianos, entre outros, como apresentado na figura 15. Além disso, a análise transcriptômica identificou aproximadamente 18000 sequências de proteínas estruturais e não identificadas. As análises proteômica e transcriptômica foram feitas em momentos diferentes e apresentaram um grande consenso, identificando os mesmos grupos de proteína em ambas as análises, o que reforça a presença destas proteínas na peçonha de *R. agamemnon*.

No que diz respeito aos NDBPs, alguns peptídeos antimicrobianos já foram isolados da peçonha de escorpiões, como por exemplo, a Mauriporin [91] que foi identificada no cDNA da glândula do escorpião *Androctonus mauritanicus* e possui atividade antiproliferativa contra linhagens de câncer de próstata, bem potente atividade antimicrobiana de amplo espectro com valores de MIC (*minimal inhibitory concentration*) entre 5 e 10 μM e atividade antibiofilme.

Neste estudo foram identificados quatro peptídeos antimicrobianos semelhantes à Scorpion de *Pandinus imperator* que possui atividade antimalárica e antimicrobiana, no entanto experimentalmente a atividade antimicrobiana da peçonha bruta não foi detectada.

Os peptídeos de peçonha de escorpião com atividade em contração muscular, geralmente estão relacionados à liberação de cálcio, o que torna interessante encontrar um peptídeo como o Fulicilin que possui um mecanismo de ação diferente; mas a baixa ocorrência não sugere uma potente atividade sobre musculatura lisa na peçonha bruta, no entanto

ensaios farmacológicos precisam ser feitos para afirmar a presença de atividade biológica.

Dentre as proteínas identificadas também podemos destacar 6 que representam classes proteicas distintas: peptídeos orcoquinin-A like que é uma classe de peptídeos miotrópicos que aumentam a frequência e a amplitude das contrações espontâneas do intestino posterior (21kDa). Não existem estudos sobre o potencial farmacológico destes peptídeos na peçonha de escorpiões;

E também as enzimas como hialuronidase (fragmento com 17 kDa), metaloproteases (45 kDa), amilase (59 kDa), fosfolipase (32 kDa) e L-amino oxidase (56 kDa), representando as enzimas. Supõe-se que as enzimas tenham um papel secundário no envenenamento, seja atuando como fator de espalhamento, como as hialuronidases, ou contribuindo para a formação de edema, como as fosfolipases [71] e/ou causando a resposta sistêmica ao acidente [124].

Além dos efeitos relacionados ao quadro de envenenamento, as enzimas presentes em peçonhas podem apresentar um potencial biotecnológico. A LAAO, especialmente as isoladas a partir de peçonhas de cobra, pode ter atividade como antiviral, antiparasitária, bactericida, citotóxica, entre outras [125]. A presença desta enzima na peçonha escorpiônica é uma ocorrência nova e que merece uma investigação mais detalhada.

Outra enzima inesperada encontrada na peçonha de *R. agamemnon* é a α -amilase. Até o momento não existem registros desta enzima em toxinas escorpiônicas, mas sabe-se que acidentes com algumas espécies de *Tityus* causa pancreatite causando alterações estruturais no pâncreas e provocando uma hiperestimulação e liberação de enzimas pancreáticas [126]. Sugerimos que a amilase presente na peçonha possa causar falha pancreática em modelos *in vivo*, necessitando estudos para confirmar esta hipótese. A análise transcriptômica indicou a presença de maltase no tecido da glândula, no entanto o papel destas enzimas em peçonhas ainda é desconhecido.

Outros componentes considerados atípicos também foram encontrados, por exemplo, *venom allergens*. Os alérgenos de veneno de inseto conhecidos são proteínas de 10–50 kDa contendo 100–400 resíduos de aminoácidos, que possivelmente atuam modulando o sistema imune do hospedeiro [127]. Em artrópodes que se alimentam de sangue, como carrapatos e mosquitos as proteínas do alérgeno 5 fazem parte de um coquetel de proteínas salivares que se acredita funcionar tanto em a supressão do sistema

imunológico do hospedeiro ou na prevenção da coagulação para prolongar a alimentação [128]. Em escorpiões não existe uma relação óbvia entre a severidade dos acidentes e a presença de compostos alérgicos [129] o que pode sugerir que estes compostos sejam adjuvantes a outros componentes da peçonha.

Esses componentes podem apresentar uma ampla gama de atividades biológicas, como alergia, imunorregulação e desempenham papéis semelhantes a hormônios, que enriqueceram o conhecimento da diversidade acerca de peçonhas em geral pela variedade em composição e funções [130].

O inibidor BmKTT-3, identificado no transcriptoma da glândula de *R. agamemnon*, além da atividade inibidora de tripsina, também possui atividade inibidora de canal de potássio Kv1.3, o que pode sugerir que os inibidores de serino protease de *R. agamemnon* tenham atividades secundárias em canais iônicos e por isso a atividade biológica não foi identificada. Isso aumenta o potencial uso da peçonha de *R. agamemnon* em alvos importantes como o canal Kv 1.3, alvo de estudo em doenças auto-imunes [131].

Proteínas CRISP também identificada no transcriptoma de *R. agamemnon* pertence a uma ampla família de proteínas encontradas em peçonhas de serpentes [132], lagartos [133], aranhas [134], escorpiões [135] e caramujos do gênero *Conus* [136]. Essas proteínas não têm função biológica definida em peçonhas animais, no entanto tem sido largamente identificada em análises “ômicas” de diversas peçonhas.

Capítulo 3 - Caracterização da proteína Ra32 isolada da peçonha de *Rhopalurus agamemnon* com atividade contra adenocarcinoma mamário.

1-Introdução

O câncer é um grande problema de saúde pública no mundo. De fato, a luta para encontrar uma terapêutica eficaz para curar o câncer é um dos maiores desafios da humanidade. Essa incidência crescente indica a ineficácia dos métodos de tratamento atualmente disponíveis, como quimioterapia, cirurgia e radioterapia [50]. No entanto, esses tratamentos levam a efeitos adversos graves [52]. Essas desvantagens são estímulos para encontrar novos medicamentos para o tratamento do câncer a partir de fontes variadas. Assim, outras fontes naturais, como o animal, são fontes alternativas para encontrar um novo agente anticâncer. Entre os animais, alguns artrópodes peçonhentos, como abelhas, vespas, escorpiões, formigas, aranhas e lagartas, produzem moléculas farmacologicamente ativas e são usadas para fins medicinais [104]. Os toxicologistas em geral, estão considerando a peçonha de escorpião como uma potente fonte natural para o tratamento do câncer, pois contêm muitos compostos bioativos, como peptídeos, aminas livres, nucleotídeos, lipídios e moléculas de interesse biotecnológico.

O câncer de mama é o mais incidente no Brasil e responsável por 16% dos óbitos em 2020 [137,138]. O câncer é caracterizado por resistência à morte celular, evasão de supressores de crescimento e proliferação, angiogênese, ganho de propriedades metastáticas e evasão de morte celular, que são marcas registradas da doença [139]. Durante o processo de aquisição dessas características, as células tumorais modificam vários mecanismos normais de sinalização celular e usam proteínas funcionalmente diversas. Entre eles destacamos a função dos canais iônicos, cuja relação com o câncer ainda não está bem esclarecida.

Alguns trabalhos têm relacionado a superexpressão funcional de canais iônicos com o comportamento de progressão e metástase tumoral, e sugerem que estes canais sejam alvos para o tratamento de algumas linhagens tumorais [43,101].

Peçonhas escorpiônicas são ricas fontes de moduladores de canais iônicos [95,140], o que permite aos pesquisadores explorar o potencial destas peçonhas no tratamento do câncer.

2 - Objetivos

- Descrever a atividade antitumoral contra câncer de mama humano *in vitro* usando como modelo as linhagens MCF7 e MDA MB 231.
- Avaliar o mecanismo de morte celular das linhagens de câncer de mama utilizando citometria de fluxo.
- Hipotetizar a possível relação entre a atividade antitumoral de um modulador de canal de sódio voltagem dependente utilizando a técnica de *whole-cell patch clamp*.

3- Materiais e métodos:

A coleta dos animais bem como a extração da peçonha foi feita tal como descrito no capítulo 1 desta tese.

3.1- Cromatografia líquida de Alta eficiência (HPLC)

Alíquotas de 1mg da peçonha de *Rhopalurus agamemnon* foram fracionadas em HPLC (Shimadzu Co. Kyoto, Japan serie LC 20A), utilizando uma coluna de fase reversa Shimadzu shimpack GIST C18 (250 x 4.6mm, 5 μ , Analítica, Inc., USA). A cromatografia foi realizada em gradiente linear da solução A (0,12% de ácido trifluoracético - TFA em água) a 60% da solução B (0,10% de TFA em acetonitrila), a um fluxo de 1.0 mL/min., por 60 minutos. A detecção foi feita por ultravioleta a 216 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente e secas em um concentrador a vácuo (ThermoSavant SPD121P – ThermoScientific).

A fração de interesse foi purificada em uma segunda etapa cromatográfica em HPLC (Shimadzu Co. Kyoto, Japan serie LC 20A), utilizando uma coluna de fase reversa Shimadzu shimpack GIST C18 (250 x 4.6mm, 5 μ , Analítica, Inc., USA). A cromatografia foi realizada em gradiente linear da solução A (0,12% de ácido trifluoracético - TFA em água) a 60% da solução B (0,10% de TFA em acetonitrila), a um fluxo de 1.0 mL/min., por 40 minutos. A detecção foi feita por ultravioleta a 216 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente e secas em um concentrador a vácuo (ThermoSavant SPD121P – ThermoScientific).

3.2 - Espectrometria de massa e sequenciamento *de novo*

A inspeção das massas moleculares dos compostos foi realizada em sistema MALDI-TOF (MS). As frações foram misturadas em uma matriz saturada de ácido sinapínico dissolvida

em acetonitrila/água/TFA 0.12%, na proporção 1:1 v/v (matriz:amostra). As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (BrukerDaltonics, Alemanha) operando no modo linear positivo, utilizando calibração externa.

O sequenciamento de novo da toxina de interesse foi feito utilizando o espectrômetro de massa AB Sciex 5600 Electrospray Triple TOF system. Para tanto, 10 µg da toxina purificada foi reduzida, alquilada e digerida. Para a redução e alquilação foi utilizada uma solução de 2-iodoetanol e trietilfosfina (100 µL de iodoethanol, 25 µL de Trietilfosfina, 0.5 mL de carbonato de amônio 1M pH11, 4.875 mL de acetonitrila e 4.5 mL de água deionizada – volume final 10 mL). À fração cromatográfica foi adicionada 40 µL da solução de redução e alquilação, a solução com a amostra foi incubada a 37 °C por 1h e seca a vácuo por 3h para retirada da solução de redução e alquilação. Depois de reduzida e alquilada, a amostra foi incubada com 25 µL de Tripsina (40 ng/µL) dissolvida em 50 mM de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila pH 8.0. Após a digestão à amostra foi adicionado 50 µL do reagente de extração (50% acetonitrila e 5% ácido fórmico v/v) para inativar a tripsina e facilitar a degradação do bicarbonato de amônio, e secas a vácuo.

Para análise em espectrômetro de massa, a amostra foi dissolvida em 30 µL de ácido fórmico (1% v/v), homogeneizada em vórtex e centrifugada a 10.000 rpm/10 min a 4 °C. Do sobrenadante foram retirados 20 µL e injetado em espectrômetro de massa AB Sciex 5600 Electrospray Triple TOF system.

O espectro de massa multi cargas obtido no AB Sciex 5600 foi deconvoluído pelo software Unidec. UniDec é um algoritmo de deconvolução Bayesiana que pode ser usado para deconvoluir espectros de massa. Foi desenvolvido pelo Dr. Michael Marty e está disponível gratuitamente sob a licença BSD modificada [141] <http://proteomicsnews.blogspot.com/2018/04/metaunidec-deconvolution-software-that.html>.

3.3–Expressão recombinante e purificação da toxina

A toxina de interesse foi expressa em *E.coli*, o plasmídeo foi produzido pela GeneArt™ – Invitrogen. No laboratório 5 µg do plasmídeo foi reconstituído em 50 µL água deionizada e estocado a -20 °C até a transformação.

Para a expressão protéica o plasmídeo precisa ser introduzido em um vetor, neste caso, *E. coli* BL21 (DE3). Para isso 1 µL do plasmídeo (100 ng/µL) foi adicionada a 100 µL de

células competentes e incubadas em gelo por 30 minutos. Então as células levaram um choque térmico a 42 °C por 60 segundos e colocadas novamente no gelo por 2 minutos.

As células foram incubadas em 1 mL de meio LB *broth* sem antibiótico a 37 °C por 1h e depois 50 µL do meio foi transferido para uma placa de LB-agar com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 18h.

Uma colônia isolada foi retirada e transferida para um tubo com 50 mL de meio LB/Ampicilina e crescido sob agitação (250 rpm) por 18h a 37 °C.

Para expressão em larga escala, cada tubo com 50 mL é usado para inocular 1L de meio LB/Ampicilina. Os frascos são incubados a 37 °C sob agitação (250 rpm) por 3h até que a OD₆₀₀ = 0.8-1.0. Então abaixa-se a temperatura para 16 °C e incuba por 45 minutos quando então acrescenta-se IPTG a uma concentração final de 1 mM e deixa expressar por 18h.

No dia seguinte as culturas foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 a 4 °C e o pellet dissolvido em tampão TN (10 mM Tris-HCL e 10 mM NaCl) com 15mM de imidazol, pH 7.5. Para cada 1g de pellet são necessários 20 mL de tampão. As células foram então lisadas (28kpsi, 4 °C) e centrifugadas a 18500 rpm por 15 minutos a 4 °C.

O sobrenadante contém a proteína de interesse e foi purificado em uma coluna de afinidade contendo beads de níquel (Ni-NTA beads Thermo-Scientific). A coluna foi equilibrada com tampão TN com 15 mM de imidazol pH 7.5, e o complexo com a toxina de interesse foi eluído com tampão TN com 500 mM de imidazol pH 7.5.

A proteína eluída foi lavada com tampão TN sem imidazol e concentrada até o volume de 5 mL em tubos de centrífuga com filtro de 30kDa, centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

O complexo protéico foi clivado utilizando TEV protease (concentração final 0.5 mg/mL) em um tampão redox com GSH (concentração final 0.18 mg/mL) e GSSG (concentração final 0.24 mg/mL), sob agitação por 24h a temperatura ambiente.

Para a purificação em HPLC, o complexo protéico clivado foi precipitado com 100 µL de TFA, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e aplicado em uma coluna semi preparativa Phenomenex Jupiter C4 (250 x 10 mm, 10µ, 300A). As amostras foram coletadas manualmente e secas a vácuo.

3.4 - Espectroscopia por dicroísmo circular

O perfil estrutura secundária da fração F32 foi caracterizada por medidas de dicroísmo circular (CD) realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815, equipado com um sistema Peltier (Jasco, Japão) e uma bomba de água. A Ra32 (25 μ M) foi analisada em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na presença de água e de SDS 35 mM a 25 °C. Cinco medidas consecutivas foram realizadas na região distante da UV visível (190-260 nm), a média final entre os espectros foi obtida, da média dos espectros subtraíram-se os espectros referentes à linha de base da água e SDS. A elipticidade observada foi convertida em elipticidade molar ($[\theta]$) (deg.cm².dmol⁻¹) baseada na massa molecular por resíduo de 115 Da [142].

A obtenção da helicidade foi estimada considerando os valores de $[\theta]_{\lambda 208\text{nm}}$ usando a equação determinada por Greenfield & Fasman (1969) [143].

2.5 - Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT estabelecido por Mosmann– 1983 [144]. A linhagem mantida no banco de células em nitrogênio líquido foram descongeladas e 500 μ l das alíquotas foram lentamente adicionadas em um frasco de cultura de células com 5 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h.

Ao atingir o crescimento ótimo, as células foram removidas com uma solução de tripsina (0.25% p/v em EDTA 0.53 mM) e centrifugadas a 750g por 5 minutos. O sobrenadante é descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura. Para determinação do número de células foi usada câmara de Neubauer, onde as células são contadas em microscópio invertido.

As linhagens utilizadas foram MCF7 (ATCC HTB-22) MDA MB 231 (ATCC HTB-26), e cada fração foi diluída em meio de cultura e adicionada aos poços. Os ensaios foram realizados em triplicata. O grupo controle é feito apenas com células e meio de cultura e a viabilidade celular será determinada pela média da triplicata de cada fração testada.

3.5.1 - Avaliação de morte celular utilizando citometria de fluxo

A linhagem de adenocarcinoma mamário humano (MCF7) e a linhagem de adenocarcinoma mamário humano metastático (MDA MB 231) foram transferidas para uma placa de 12 poços na concentração de 5 x 10⁴ células/poço e incubadas a

temperatura de 37 °C. As células foram tratadas com a concentração do IC₅₀ da fração Ra32 por 24 horas 37 °C. O meio de cultura foi então descartado e as células lavadas duas vezes com meio de cultura sem soro. As células foram removidas dos poços com a adição de 500 µL de solução de tripsina-EDTA e incubadas a 37 °C por 2 minutos. A suspensão (meio de cultura, tripsina e células) foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos, e as células ressuspensas em 100 µL de PBS gelado. As células foram tratadas com Anexina V-FITC (Sigma Aldrich) e iodeto de propídio (Sigma Aldrich), incubadas por 15 minutos sobre o gelo e analisadas no citômetro Guava Muse – Luminex® segundo protocolo do fabricante.

3.6– Eletrofisiologia em QPatch – *automated patch clamp*

Para avaliação do efeito da toxina sobre canais de sódio, foi feito o ensaio de Whole-cell patch-clamp no sistema QPatch-16X automated electrophysiology platform (Sophion Biosciences, Ballerup, Denmark), a 24 °C. Como solução externa foi usado 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 4 mM KCl, 145 mM NaCl, 10 mM sucrose, pH 7.4 com NaOH, e 305 mOsm. E como solução interna foi usado 140 mM CsF, 1 mM EGTA, 5 mM CsOH, 10 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7.4 com CsOH, e 320 mOsm.

As células foram mantidas em um potencial de repouso de -80 mV, seguido de um pré-pulso de -120 mV por 200 ms e então uma despolarização até 0 mV por 50ms

4- Resultados

4.1 - Cromatografia líquida de Alta eficiência (HPLC)

Alíquotas de 1,0 mg da peçonha bruta de *R. agamemnon* foram fracionadas em coluna Shimadzu shimpack GISTC₁₈ por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo (Figura 17). Cada corrida cromatográfica resultou, em média, em 39 frações que foram coletadas manualmente.

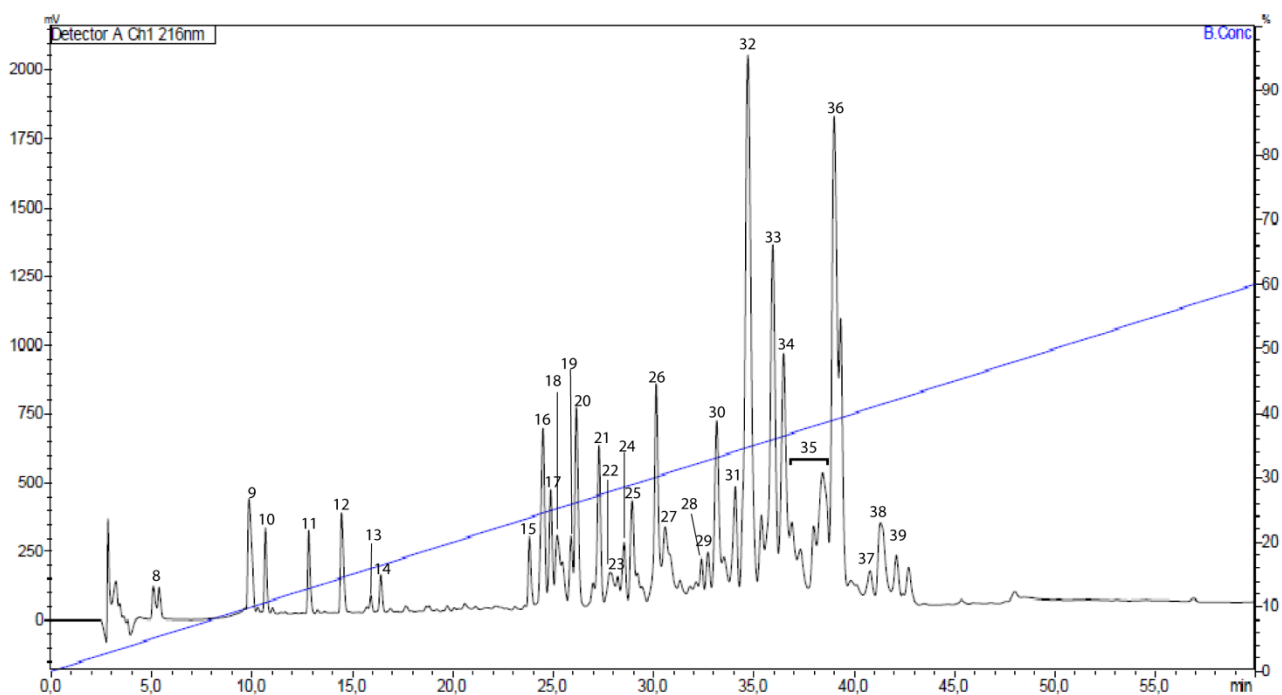


Figura 17 - A - Perfil cromatográfico da peçonha de *R. agamemnon* em coluna C18 (Shimadzu shimpack GIST C18 250 x 4.6mm, 5 μ , Analítica, Inc., USA) em sistema HPLC com um fluxo de 1 mL/min e monitoramento realizado a 216 nm.

As frações cromatográficas foram submetidas a um *screening* de atividade antitumoral como ilustrado na tabela 3:

Tabela 3 – *Screening* de atividade antitumoral das frações isoladas da peçonha de *R. agamemnon* contra linhagem MCF7.

Fração	Massa (Da)	Peso (mg/mL)	Antitumoral (%)
F8	316	0,044	37,5
F13	554 e 583	0,054	14
F14	4432, 4436 e 4440	0,006	22,3
F15	3973 e 4438	0,053	-
F17	884, 2091, 3843, 4036 e 4184	0,056	14,1
F25	625, 1282, 1693, 1787, 3387, 3978, 5265, 6710 e 7108	0,038	28
F26	626, 686, 874, 1120, 3384, 3980, 5260, 6713, 6718 e 7110	0,087	30
F27	1283, 1835, 2379	0,433	62,5
F28	1835, 3800, 5219 e 7053	0,032	42,6
F29	7113	0,185	-
F31	7000, 7226 e 7364.	0,068	13,3
F32	1282, 1514, 1787, 3774, 6981, 7189, 7562 e 9099.	0,671	49,6

F34	1283, 1787, 6622, 6944, 7168, 7423 e 7471	0,046	35,6
F35	1282, 1787, 5884, 6620	0,060	-
F36	1282, 1786, 3537, 7086	0,344	-
F37	7123	0,035	86
F38	4151, 4783, 7124, 7655, 8060 e 8468	0,048	24,1
F39	7178	0,096	34,3

A fração F32 foi selecionada para continuar o trabalho devido a abundância no cromatograma e atividade antitumoral de 49,6% contra MCF7.

4.2 - Espectrometria de massa e sequenciamento *de novo*

A fração 32 que apresentou atividade contra o crescimento de MCF7 apresentou um único componente de massa após a etapa de purificação, como mostrado na figura 18 abaixo:

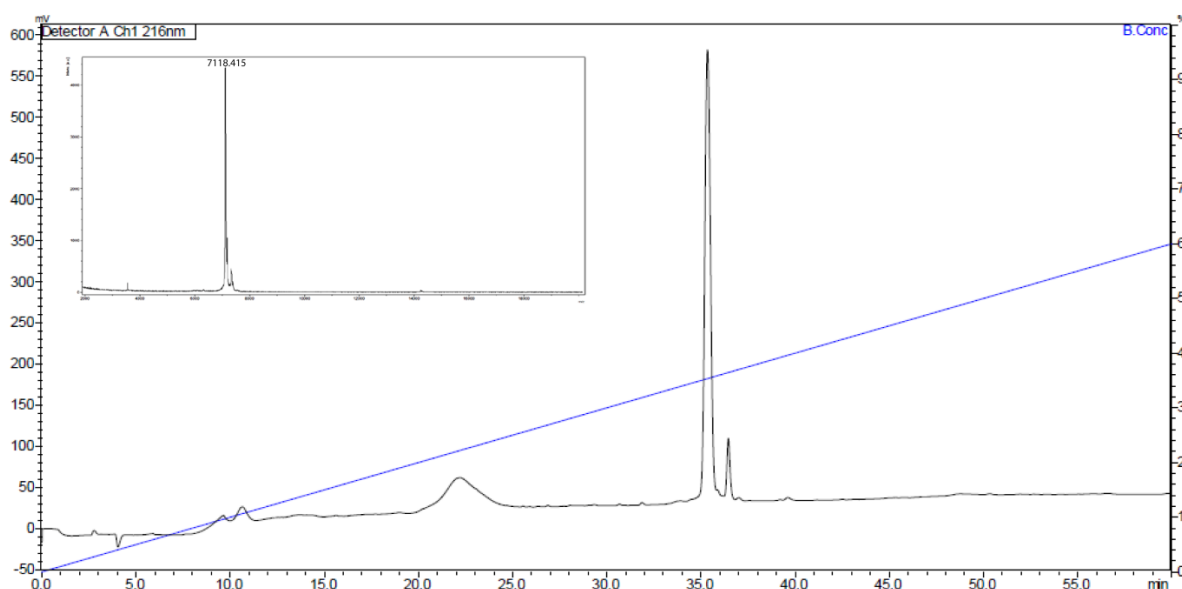


Figura 18 - Espectro de massa. A –Recromatografia da nRA32 apresentando grau de pureza satisfatório e inserto da espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF modo linear na faixa de 3000 a 18000 Da da fração nRA32 com massa de 7118.41 Da.

A fração nRA32 foi reduzida, alquilada, digerida com tripsina e sequenciada por sequenciamento *de novo*, como ilustrado na figura 19 abaixo:

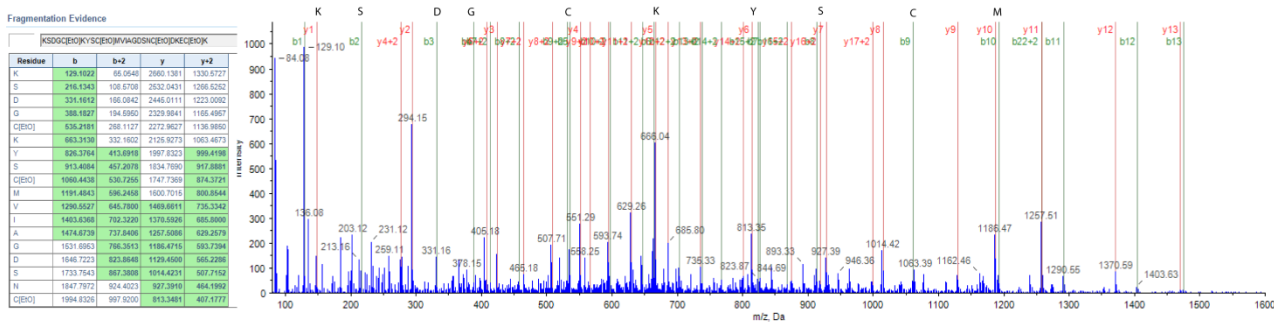


Figura 19 - Sequenciamento de novo da fração nRA32 de *R. agamemnon* pelo software ProteinPilot (AB Sciex) apresentando os fragmentos tripticos das séries b e y com sequencia primária KSDGCKYSCM, como ilustrado no quadro a esquerda.

A sequência da nRA32 foi buscada no banco de dados Blastp, e algumas sequências semelhantes foram encontradas como CII5c de *Centruroides sculpturatus*, C_{ss} 39 de *C. suffusus* e Cn5 de *C. noxius* (figura 20).Essas toxinas são classificadas como β -NaTx, que se ligam aos canais de sódio dependente (Nav) e mudam a voltagem de ativação para potenciais mais negativos, afetando assim a ativação do canal de sódio e promovendo disparos espontâneos e repetitivos. Essas toxinas são letais para crustáceos (*Cambarellus montezumae spp.*), provocam paralisia reversível em insetos (*Achaeta spp.*), mas não é tóxica para os ratos [145].

Ra32	KEGYLVKKS SDGCKYSCM VIAGDS NC DK CKSKT WEGSYGYCYAGGCYCTGMPENKQVYPL PGKSC---	65
C _{ss} 39	KEGYLVNK STGCKY GCLLL GKNE GCDK CKAKN QGGSYGYCYAFGCWCEGLPE STPT YPL PNK SCSK K	68
Cn5	KEGYLVNK STGCKY GCLLL GKNE GCDK CKAKN QGGSYGYCYAFGCWCEGLPE STPT YPL PNK SCSK K	68
CII5c	KEGYLVNK STGCKY SC FWL GKNQ NC DL CKAKN QGGSYGYCYAFGCWCEGLPE STPT YPI PGK SCSK S	68

*****:****** *******:******: :*****: :***** ******:****** ***** ******:******:******:***** ******:****** ******:******

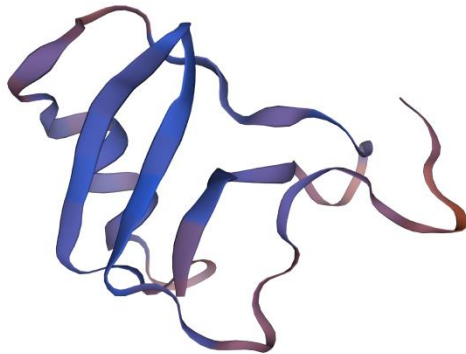
Figura 20 - Alinhamento no ClustalW das β -NaTx e nRA32:CII5c de *Centruroides sculpturatus*, C_{ss} 39 de *C. suffusus* e Cn5 de *C. noxius*. O (*) indica uma posição conservada, (:) indica que os resíduos contém características físico-químicas muito similares, ou com pouca similaridade ().

Os resultados do sequenciamento de novo foram confrontados com as sequências encontradas pela análise transcriptômica, manualmente checados para a obtenção da sequência completa da fração nRA32. A sequência do peptídeo maduro foi utilizada para fazer a modelagem *in silico* utilizando a plataforma Swiss-Model do expasy, como demonstrado na figura 21 abaixo:

A

KEGYLVKKS~~GD~~G~~CK~~YS~~CM~~VIAG~~DS~~N~~CD~~KE~~CK~~SKT~~WE~~GSYGY~~CY~~AG~~GC~~Y~~CT~~GMPENKQVYPLPGKSC-amide

B



C

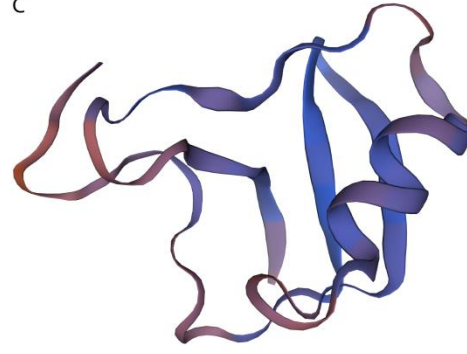


Figura 21 - A – Estrutura primária da fração nRA32 da peçonha de *R. agamemnon*. B - Predição da estrutura terciária da fração nRA32 pelo software online SWISS-MODEL vista frontal e C) vista posterior da fração nRA32.. Como modelo foi utilizada a toxina 1jza.1.A NEUROTOXIN 2 de *Centruroides sculpturatus* Ewing.

4.3 – Dicroísmo circular

Os espectros dicróicos obtidos em água a 25 °C mostram que o peptídeo nRA32 apresenta características típicas de peptídeos com estrutura desordenada (Figura 22). Em água essas moléculas normalmente se apresentam de forma randômica. Entretanto, quando submetidos à presença de surfactantes como SDS, os peptídeos tendem a apresentar mudanças conformacionais, assumindo diferentes conteúdos de estrutura secundária, geralmente apresentam aumento no conteúdo de alfa hélice[11]. Os resultados obtidos na presença de SDS mostram deslocamento da banda de 230 nm, formando uma banda dicróica negativa com sinal em 208 nm (-1.426 deg.cm²/dmol⁻¹). O perfil de estrutura secundária observado para o peptídeo nRA32 é característico de conformação em hélice alfa. O percentual de hélice alfa para nRA32 em água foi de 10,5%, com um aumento de 4% na presença de SDS (14,7%).

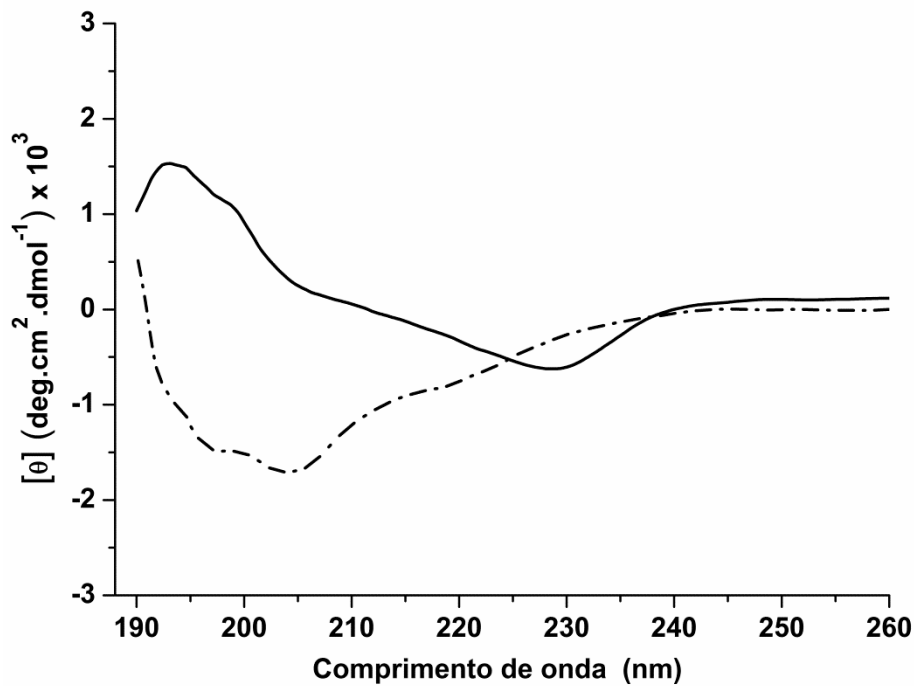


Figura 22 - Espectro de FAR-UV CD do peptídeo nRA32 em água (linha sólida) e SDS (35 mM) (linha de traços).

4.4 - Expressão recombinante

A partir da sequência de aminoácidos da fração 32 nativa (nRA32), foi construído um plasmídeo para expressão recombinante em *E. coli* (rRA32). Após a transformação do vetor nas células de *E. coli* (DE3), realizou-se um ensaio piloto para a verificação da expressão da rRA32 recombinante. Dentre as condições testadas para cada linhagem, a que apresentou maior rendimento de expressão e solubilidade foi selecionado para a expressão em maior escala.

Foram testados os meios de cultivo LB, TB induzidos com IPTG; e ZYP 5052 por auto-indução. Após avaliação em SDS PAGE, foi escolhido o meio TB induzido com IPTG por apresentar a maior quantidade de proteína solúvel. A metodologia utilizada expressa um complexo protéico de 42 kDa somado à proteína de interesse, neste caso a toxina rRA32 com aproximadamente 7 kDa (sem amidação C terminal), como apresentado na figura 21. A toxina rRA32 foi purificada por HPLC, após a clivagem com TEV, em uma coluna semipreparativa C4 e apresentou uma fração que elui com 90% de acetonitrila (figura 23).

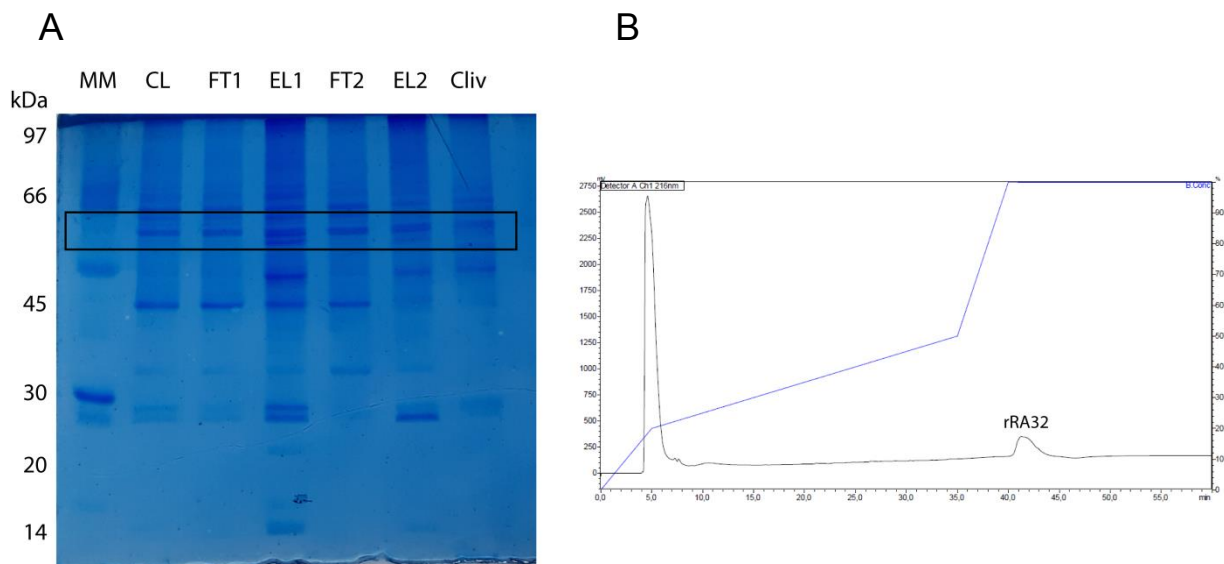


Figura 23: A -SDS PAGE da expressão da toxina rRA32 em *E. coli*. MM é o marcador molecular; CL é o lisado de *E. coli* antes da purificação; FT1 é a primeira lavagem em coluna de afinidade com niNTAbeads; EL1 é a primeira etapa de eluição na coluna de afinidade; FT2 é a segunda lavagem da coluna de afinidade com niNTAbeads; EL2 é a segunda etapa de eluição na coluna de afinidade; Cliv é a presença do complexo protéico (42 kDa) e a proteína (aprox 7 kDa) após a clivagem com TEV protease. Nesta metodologia não é possível visualizar uma banda em 7 kDa, mas é possível perceber uma banda menos corada em torno de 50 kDa. B - cromatograma em HPLC da toxina rRA32 após clivagem com TEV protease.

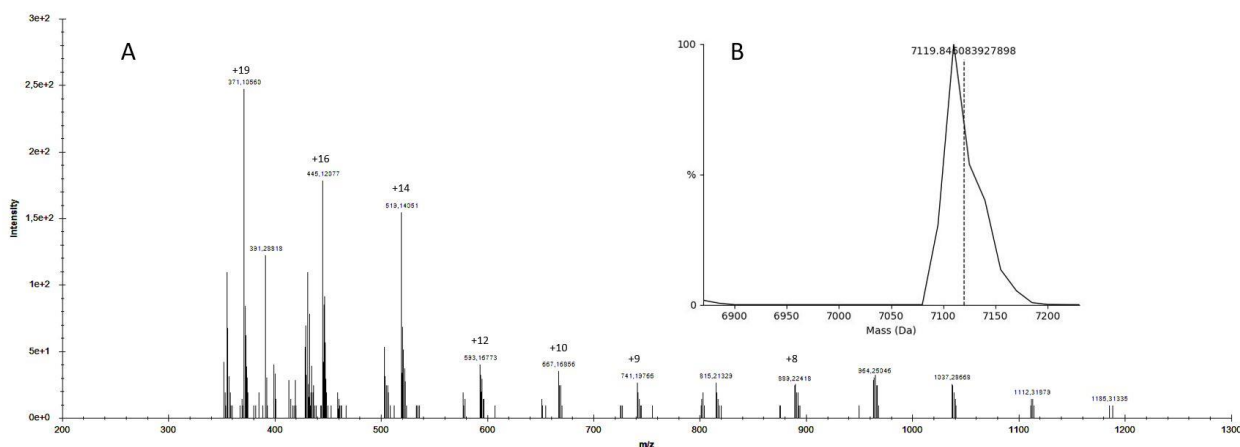


Figura 24: A - Espectro de massa em AB Sciex 5600 TripleTOF da fração rRA32 apresentando envelope de cargas (+19 a +6). B - Espectro deconvolvido da rRA32 pelo Unidec.

4.5 - Ensaio de viabilidade das células MCF7 e MDA MB 231

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com as proteínas nRA32 e rRA32. O IC₅₀ da nRA32 para MCF7 foi 6.88 μ M e para MDA MB 231 foi 23.78 μ M. A toxina rRA32 foi testada apenas contra MCF7 e apresentou um IC₅₀ de 23.74 μ M (figura 24). A Doxorubicin, um fármaco utilizado na clínica com graves efeitos colaterais, foi utilizado a título de comparação de morte celular e teve um IC₅₀ determinado experimentalmente em

165.6 nM para MCF7 e 184 nM para MDA MB 231. A quantidade expressa da toxina recombinante não foi suficiente para avaliar os efeitos em MDA MB 231 bem como o mecanismo de morte celular por citometria de fluxo.

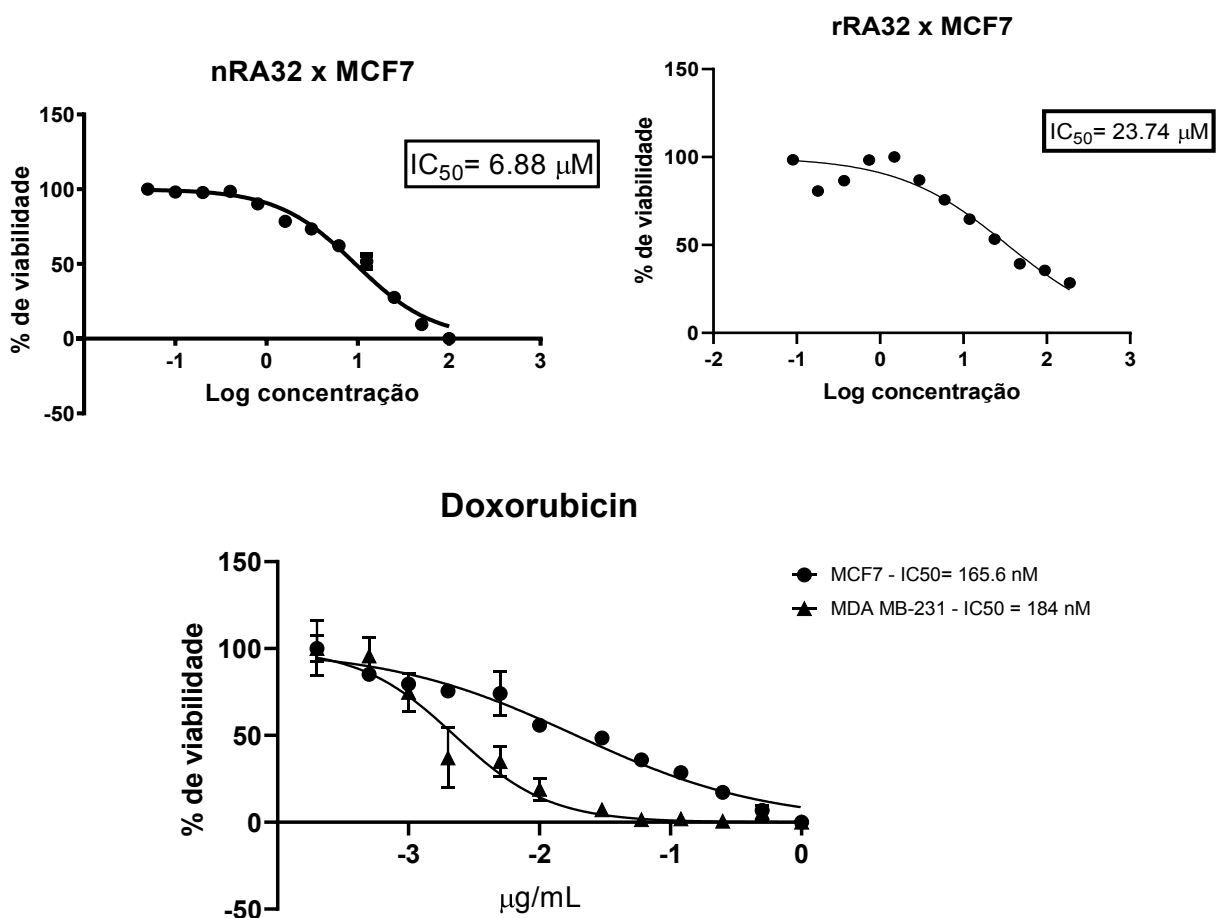


Figura 25 - IC_{50} da nRA32 e rRA32 para MCF7. O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações da fração nativa (100-0.05 $\mu g/mL$) e recombinante (200 - 0.09 $\mu g/mL$). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, e o IC_{50} determinado em 6.88 μM para nRA32 e calculado em 23.74 μM para rRA32. A título de comparação foi utilizada Doxorubicin com $IC_{50} = 165.6$ nM para MCF7 e 84 nM para MDA MB-231. Os dados são expressos em média \pm SD (desvio padrão). * $p < 0.01$ comparado ao grupo controle.

A viabilidade celular somente de MDA MB 231 também foi medida na presença de lidocaína para comparar o efeito da toxina nativa com um clássico bloqueador de canal de sódio.

MDA-MB231

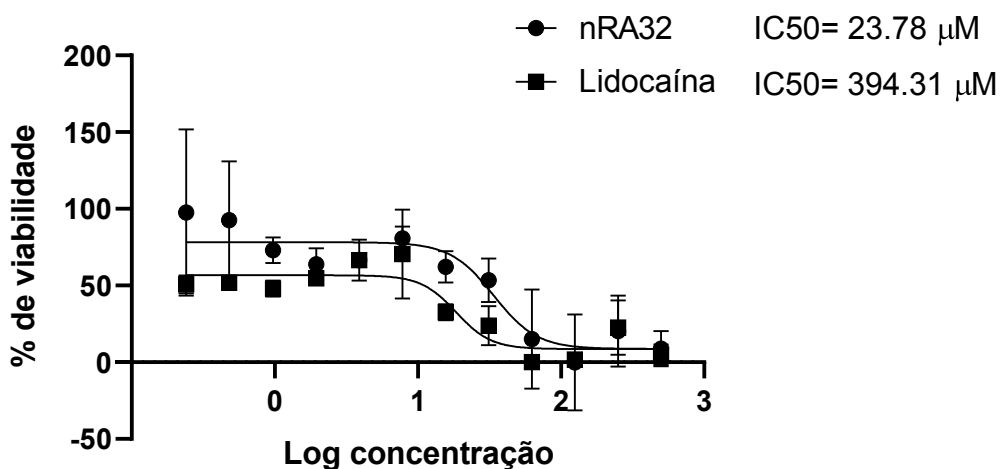
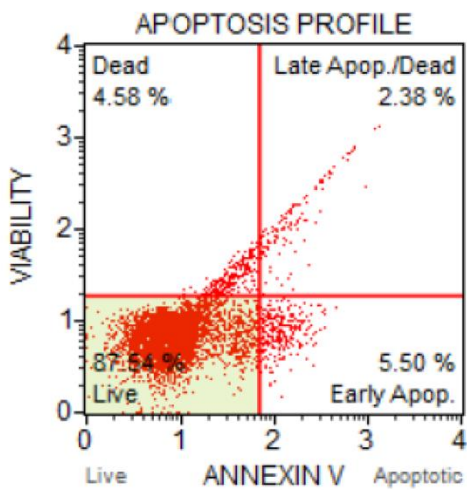


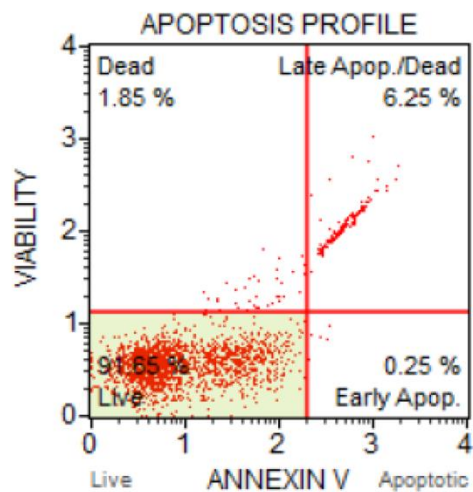
Figura 26 - IC₅₀ da nRA32 para MDA MB231. O tratamento foi realizado com a incubação por 24h das células com diferentes concentrações da fração nativa (500-0.2 µg/mL). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, e o IC₅₀ determinado em 23.78µM para nRA32. A viabilidade celular também foi avaliada na presença de lidocaína nativa (500-0.2 µg/mL) para comparar os efeitos de um bloqueador de canal de sódio conhecido. Os dados são expressos em média ± SD (desvio padrão). *p<0.01 comparado ao grupo controle.

4.6 – Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

Após o tratamento das células com a nRA32 na concentração do IC₅₀, é possível notar uma diferença no tamanho e granulosidade das células, além de serem marcadas com anexina e iodeto de propídio, o que é um forte indicador de apoptose.



nRA32 x MCF7



nRA32 x MDA MB 231

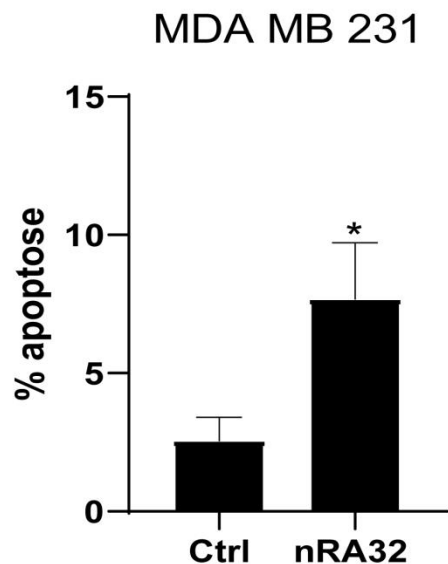
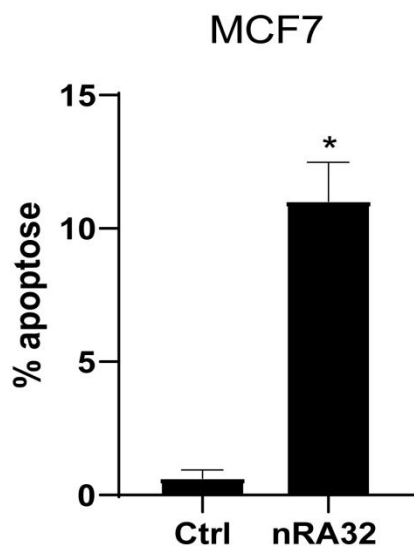


Figura 27 - Efeitos sobre a morte celular avaliados por citometria de fluxo em células MCF7 a MDA MB 231 tratadas por 24 h (n = 3) com o IC50 da toxina para cada linhagem. * = p < 0,05.

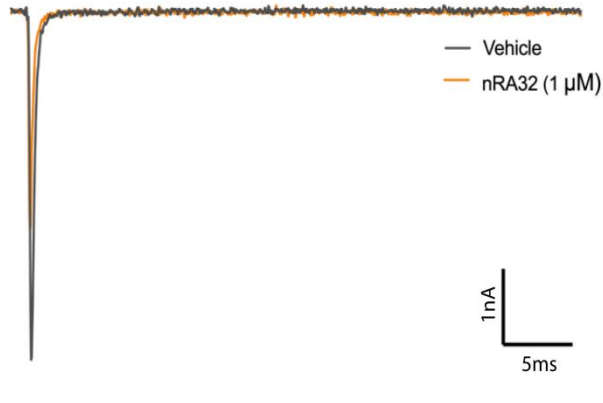
4.7 – Eletrofisiologia

As toxinas nRA32 e rRA32 foram testadas em canais de sódio voltagem dependentes super expressos em linhagens de câncer de mama MCF7 e MDA MB 231, sendo os principais Nav 1.4, 1.5 e 1.7, na tentativa de sugerir um possível mecanismo de ação das toxinas de maneira específica sobre esse câncer [146,147].

A toxina nRA32 apresentou um bloqueio de 40% para o canal Nav 1.4 e 11% para o canal Nav 1.5. Já a toxina rRA32 apresentou um bloqueio de 33% do canal Nav 1.5. Nenhum efeito foi notado para o canal Nav 1.7, como apresentado na figura 27.

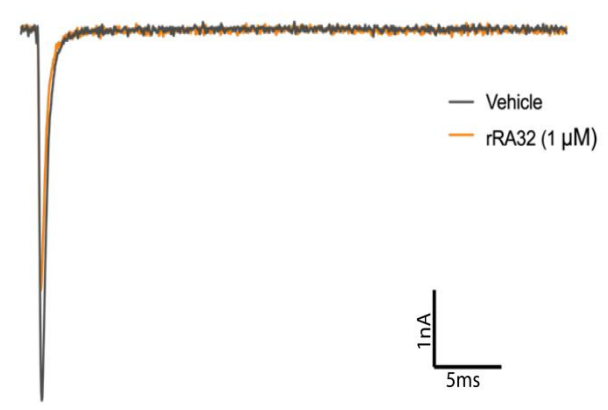
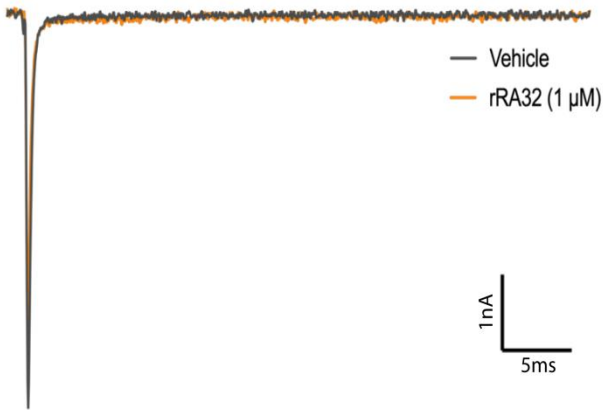
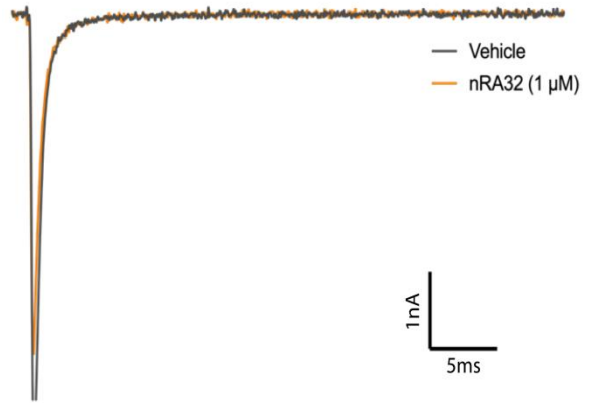
A

NaV 1.4



B

NaV 1.5



NaV 1.7

C

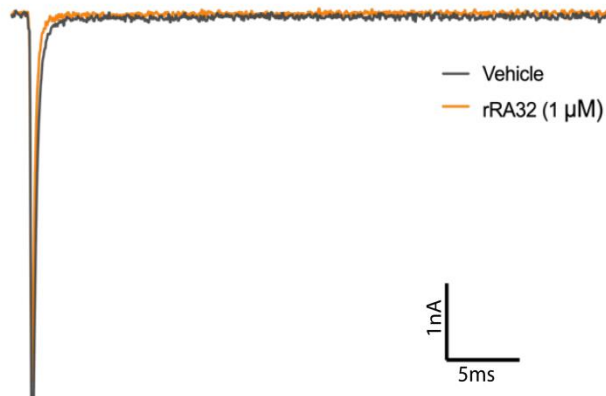
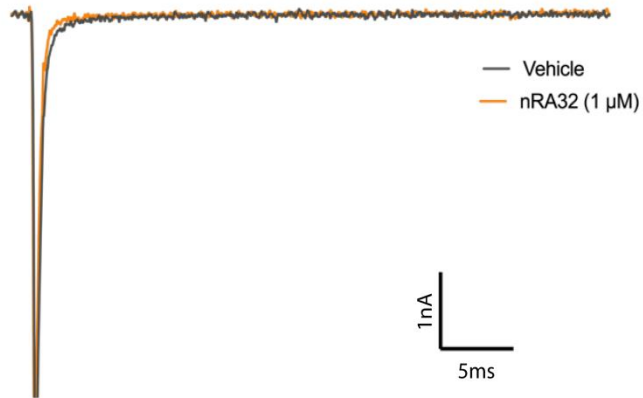


Figura 28 - Correntes representativas de canais de sódio humanos: A-Nav 1.4, B -Nav 1.5 e C -Nav 1.7 na presença do veículo (cinza) e de 1 μ M da toxina nRA32 (laranja). As correntes internas de sódio foram medidas usando um potencial de repouso de -80 mV, seguido por um pré-pulso de -120 mV por 200 ms e, em seguida, uma despolarização em etapas de 50 ms para 0 mV. Na presença da toxina nativa (nRA32), os canais NaV1.4 e NaV1.5 apresentaram um bloqueio sutil; e o canal NaV 1.5 apresentou um bloqueio também na presença da toxina recombinante (rRA32).

5- Discussão

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 9.6 milhões de mortes em 2018. O câncer de mama é o segundo mais frequente (2.09mi de casos em 2018) e ocupa o quinto lugar como causa de morte (627 mil mortes em 2018) [139].

Peçonhas de escorpião têm sido usadas na medicina popular chinesa para curar pacientes com câncer. Nosso estudo caracteriza o efeito antitumoral de uma proteína isolada da peçonha do escorpião brasileiro *Rhopalurus agamemnon*.

As toxinas de escorpião que atuam em canais de sódio (NaTx) possuem em média 64 resíduos de aminoácidos, tamanho entre 6 e 8 kDa, e quatro pontes dissulfeto [1]. A fração nRA32 isolada no presente trabalho possui 7118 Da e apresenta similaridade com a Css9, uma toxina moduladora de canal de sódio isolada a partir da peçonha de *Centruroides suffusus*.

Tanto a proliferação celular como a apoptose envolvem em algum momento a ativação dos canais de Cl^- , Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Como os moduladores de canais iônicos têm sido descritos por interferir tanto na proliferação celular como na apoptose, atuando na maquinaria celular, levando à duplicação ou morte de uma dada célula[148]. Os canais iônicos atuam em alguns estágios de progressão do câncer em pelo menos seis características: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento, 2) insensibilidade a sinais anti-crescimento, 3) evasão de morte celular programada (apoptose), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogênese sustentada e 6) invasão tecidual e metástase[149], o que facilita o desenvolvimento de células malignas e a subsequente replicação, contribuindo assim para o crescimento do tumor. Portanto, os fluxos iônicos mediados por canais iônicos são mecanismos de regulação da apoptose extremamente importantes[150]e podem ser utilizados como ferramentas regulatórias da morte para induzir a apoptose e otimizar tratamentos antitumorais.

A regulação do sódio está intimamente relacionada com a regulação do volume celular, que é regulada pela atividade adequada da bomba Na^+/K^+ -ATPase. Após uma lesão ou a inibição direta ou indireta do canal de sódio, as células ficam “inchadas” porque a quantidade de Na^+ aumenta substancialmente. Qualquer condição que reduza ou aumente o Na^+ extracelular, favorece o acúmulo de Ca^{2+} que, por sua vez, está relacionado à morte celular por necrose[151]. A sobrecarga pode causar ruptura ou citotoxicidade intracelular e resultar em apoptose, necrose ou autofagia. Quando uma

célula é exposta a compostos que ativam os canais de sódio voltagem-dependentes (Nav) ocorre o influxo de Na⁺ e então a morte celular [152]. Estas informações, aliadas a resultados de eletrofisiologia e citometria de fluxo, podem sugerir o mecanismo de ação das toxinas escorpionicas moduladoras de canais de sódio sobre células tumorais.

V No presente estudo as toxinas nativa e recombinante (nRA32 e rRA32) foram testados quanto ao potencial antitumoral contra as linhagens MCF7 e MDA MB 231. A linhagem MCF7 se mostrou mais suscetível a toxina nRA32 em relação a linhagem MDA MB 231. Isso pode ser explicado pela natural diferença entre as linhagens: a linhagem MCF7 é não metastática, luminal e apresenta receptores para estrógeno e progesterona, mas não apresenta receptores para fatores de crescimento epidermal, o que faz desta linhagem candidata ideal para hormônio terapia [153]; Já a linhagem MDA MB 231 é metastática, basal e receptor negativa para estrógeno, progesterona, e fator de crescimento epidermal, o que faz esta linhagem ideal para estudos de quimioterapia [154]. Estas características afetam a sensibilidades às terapias e pode justificar as diferentes respostas à mesma toxina nRA32.

Além disso, a toxina rRA32 também apresentou atividade antitumoral para MCF7, no entanto se mostrou menos eficaz que a toxina nativa. As toxinas nativa e recombinante apresentam a mesma sequência de aminoácidos, no entanto a toxina nativa apresenta uma amidação C-terminal. A amidação C terminal apresenta um papel importante na estabilização das proteínas [155], bem como aumenta a interação das proteínas com membranas celulares [156], o que pode justificar a diferença de morte celular após o tratamento com as toxinas nativa e recombinante.

Sabe-se que os canais de sódio são também expressos durante a fase tardia da progressão do tumor, motilidade celular e regulação potencial da invasão celular e metástase [157]. As isoformas dos canais NaV 1.4 e NaV1.7 são predominantemente expressas em diferentes linhagens celulares de câncer da próstata PC-3 e LNCaP [158], pulmão NCI-H146 [159], bem como em câncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-468, e MCF-7, principalmente com expressão do canal NaV1.5 [146]. Devido à correlação positiva entre a expressão dos canais de Na⁺ e a metástase alguns bloqueadores de NaV podem ser potenciais rotas terapêuticas para vários tipos de câncer [157].

A toxina nRA32 apresentou um bloqueio de 40% para o canal Nav 1.4 e 11% para o canal Nav 1.5. Já a toxina rRA32 apresentou um bloqueio de 33% do canal Nav 1.5. Nenhum efeito foi notado para o canal Nav 1.7, a 1 µM.

O influxo de Na⁺ pelos canais Nav1.5 possivelmente provoca alcalinização intracelular e consequente acidificação do espaço extracelular próximo à membrana celular [160]. A mudança na ativação dos canais, bem como o bloqueio dos mesmos, poderia diminuir o pH intracelular e induzir apoptose [161].

O bloqueio dos canais de sódio pelas toxinas nRA32 e rRA32, nas concentrações utilizadas, foi considerado baixo, o que pode sugerir que talvez outros mecanismos de ação sejam responsáveis pela resposta antitumoral específica. Para lidocaína, por exemplo, o mecanismo de citotoxicidade contra linhagens tumorais parece não estar relacionado com o bloqueio direto do canal de sódio [162]. A lidocaína apresentou efeito inibidor para tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) em células tumorais de língua humana [163].

O mecanismo de ação antitumoral de maneira específica ainda não está claro, mas as diversas teorias parecem concordar que esta especificidade se dá pelas próprias características aberrantes das células tumorais: superexpressão de canais iônicos, receptores de membrana, diferente captação de glicose, etc [164,165].

Os resultados da citometria de fluxo para células MCF7 tratadas com nRA32 apresentam a maior parte das células mortas em apoptose; enquanto que as células MDA MB 231 apresentam a maior parte das células mortas em apoptose tardia ou necrose.

Estudos anteriores identificaram três NaV em dois tipos de células de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. Neste caso, Nav1.5 (resistente à tetrodotoxina), Nav1.6 e Nav1.7 (sensível à tetrodotoxina). A superexpressão de NaV 1.4 é 100 vezes maior na linhagem MDA-MB-231 em comparação com as células MCF-7; o mesmo acontece com o canal Nav1.5 (\pm 1.800 vezes maior nas células MDA-MB-231); e Nav1.7. O canal Nav1.6 é expresso em níveis relativamente baixos, semelhantes nas duas linhas celulares [146]. O bloqueio farmacológico ou a regulação positiva de NaVs podem ser a resposta para o tratamento de certos tipos de câncer, geralmente, a interação específica de drogas com canais de Na⁺ resulta em uma diminuição de diferentes tipos de células malignas [149]. Sugerimos que a atividade antitumoral da nRA32, especificamente sobre células de câncer de mama, seja devido à modulação positiva dos NaVs 1.4 e 1.5 provocando apoptose, possivelmente impedindo a entrada de sódio, a célula libera no citoplasma uma grande quantidade de cálcio que ativa a via intrínseca da apoptose [166]. Isso reforça a importância destes canais para linhagens de câncer de mama, e o possível mecanismo de ação dos moduladores de canal de sódio como agentes antitumorais.

Alguns trabalhos exploraram o potencial de bloqueadores de canais de sódio sobre a viabilidade celular de células de câncer de mama, no entanto nenhum deles tinha investigado a relação dos canais iônicos com a morte celular [146,160,166]. No entanto em Janeiro de 2021 Liu et. al, investigaram o mecanismo de ação da lidocaína sobre a viabilidade e migração de células de câncer mamárias (MDA MB 231, AU565, T47D, MDA MB 468, MCF 7, BT474 e BT-20), sugerindo que um dos alvos da lidocaína seriam os canais TRPM7, responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} e também super expressos em diversos tipos de câncer [167]. Isso sugere que os moduladores de canais iônicos têm uma ação mais complexa do que se imagina sobre linhagens tumorais.

A espectroscopia de dicroísmo circular da nRA32 é ligeiramente diferente do que se tem descrito para toxinas escorpiônicas. Os resultados obtidos do dicroísmo circular da nRA32 na presença de SDS mostram deslocamento da banda de 230 nm, formando uma banda dicroica negativa com sinal em 208 nm. Já a C_{ss} II de *Centruroides suffusus* mostrou baixa absorção para a estrutura secundária da α -hélice e um alto conteúdo em β -folhas e é caracterizada por elipticidades negativas a 208 e 222 nm e bandas positivas a 196 nm[108]. Outras abordagens devem ser usadas para elucidação da estrutura secundária da toxina, isso porque a modelagem in silico sugere a presença de uma α -hélice e três folha β .

6- Conclusões

- Este trabalho teve como propósito ampliar o conhecimento acerca dos componentes protéicos presentes na peçonha e na glândula de peçonha do escorpião brasileiro *Rhopalurus agamemnon*.
- A variedade de compostos protéicos encontrados ampliou a visão a respeito de peçonhas escorpiônicas, inclusive relatando pela primeira vez a presença de L-aminoácido oxidase e amilase em peçonha de escorpião.
- O trabalho teve duas abordagens principais de elucidação dos compostos: a primeira consiste na análise proteômica e transcriptômica da peçonha; e a segunda uma análise direcionada utilizando purificação e identificação de compostos com atividade antitumoral.
- As análises ômicas apresentaram uma grande quantidade de enzimas e moduladores de canais iônicos.
- Foi isolada uma toxina denominada nRA32 que possui 65 resíduos de aminoácidos e massa média de 7118 Da.
- A toxina nRA32 possui sequência similar a Css9 uma β sódio toxina de *Centruroides suffusus*.
- A partir da nRA32 foi produzida uma toxina recombinante em *E. coli* denominada rRA32.
- As toxinas nRA32 e rRA32 apresentam atividade antitumoral específica para linhagens de câncer de mama MCF7 e MDA MB 231 causando apoptose, sugerindo uma modulação dos canais NaV 1.4 e 1.5.
- Este trabalho foi o primeiro a usar a abordagem de viabilidade celular, citometria de fluxo e eletrofisiologia para canais de sódio voltagem dependentes, com objetivo de elucidar o mecanismo de uma toxina com atividade antitumoral específica para câncer de mama.
- Mais experimentos precisam ser feitos para confirmar o mecanismo de ação das toxinas de *R. agamemnon* sobre linhagens e câncer de mama, como ensaio de caspase e eletrofisiologia sobre outros canais iônicos.

7- Referências

- [1] L.D. Possani, B. Becerril, M. Delepierre, J. Tytgat, Scorpion toxins specific for Na⁺-channels., *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 287–300. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x>.
- [2] L.D. Possani, E. Merino, M. Corona, F. Bolivar, B. Becerril, Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels., *Biochimie.* 82 (2000) 861–868. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01167-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01167-6).
- [3] J. Cardoso, F. Franca, F.H. WEN, C. Malaque, V. Junior, Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes, *Rev. Do Inst. Med. Trop. Sao Paulo - REV INST MED TROP SAO PAULO.* 45 (2003). <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000600009>.
- [4] F. Couraud, E. Jover, J.M. Dubois, H. Rochat, Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel., *Toxicon.* 20 (1982) 9–16. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90138-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90138-6).
- [5] A.C. Pessini, T.T. Takao, E.C. Cavalheiro, W. Vichnewski, S. V Sampaio, J.R. Giglio, E.C. Arantes, A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids, *Toxicon.* 39 (2001) 1495–1504. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00122-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00122-2).
- [6] G. Kreil, Hyaluronidases--a group of neglected enzymes., *Protein Sci.* 4 (1995) 1666–1669. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040902>.
- [7] L. Feng, R. Gao, P. Gopalakrishnakone, Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148 (2008) 250–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.003>.
- [8] B.P. Toole, Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins., *Curr. Opin. Cell Biol.* 2 (1990) 839–844. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90081-o](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90081-o).
- [9] E.J. Menzel, C. Farr, Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses., *Cancer Lett.* 131 (1998) 3–11. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(98\)00195-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(98)00195-5).

- [10] R.D. Pirrello, C. Ting Chen, S.H. Thomas, Initial experiences with subcutaneous recombinant human hyaluronidase., *J. Palliat. Med.* 10 (2007) 861–864. <https://doi.org/10.1089/jpm.2007.0037>.
- [11] C. Johnsson, R. Hällgren, A. Elvin, B. Gerdin, G. Tufveson, Hyaluronidase ameliorates rejection-induced edema., *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 12 (1999) 235–243. <https://doi.org/10.1007/s001470050216>.
- [12] The extra pharmacopoeia. Vol. 2, 23rd ed. Published by the direction of the Council of the Pharmaceutical Society of Great Britain. The Pharmaceutical Press, London, 1955. xxxi + 1501 pp. 13 × 19.2 cm. Price L2. 17s. 6d. (postage 1s. 6d.), *J. Am. Pharm. Assoc.* 44 (1955) 776–777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.3030441220>.
- [13] K.S. Girish, H.P. Mohanakumari, S. Nagaraju, B.S. Vishwanath, K. Kemparaju, Hyaluronidase and protease activities from Indian snake venoms: neutralization by *Mimosa pudica* root extract, *Fitoterapia.* 75 (2004) 378–380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.01.006>.
- [14] S. Pukrittayakamee, D.A. Warrell, V. Desakorn, A.J. McMichael, N.J. White, D. Bunnag, The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms., *Toxicon.* 26 (1988) 629–637. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90245-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90245-0).
- [15] S. Yingprasertchai, S. Bunyasrisawat, K. Ratanabanangkoon, Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium auro-thiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected with *Naja kaouthia* and *Calloselasma rhodostoma* venoms., *Toxicon.* 42 (2003) 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.09.001>.
- [16] R.A. Harrison, F. Ibison, D. Wilbraham, S.C. Wagstaff, Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts., *Gene.* 392 (2007) 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.10.026>.
- [17] N.H. Tan, L-amino acid oxidases and lactate dehydrogenases, *Enzym. from Snake Venom.* Fort Collins Alaken Inc. (1998) 579–598.
- [18] X.-Y. Du, K.J. Clemetson, Snake venom L-amino acid oxidases., *Toxicon.* 40 (2002) 659–665. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00102-2).

- [19] H. Zhang, M. Teng, L. Niu, Y. Wang, Y. Wang, Q. Liu, Q. Huang, Q. Hao, Y. Dong, P. Liu, Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 974–977. <https://doi.org/10.1107/S0907444904000046>.
- [20] F.S. Markland, Snake venoms and the hemostatic system., *Toxicon.* 36 (1998) 1749–1800. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00126-3).
- [21] R.G. Stábéli, S. Marcussi, G.B. Carlos, R.C.L.R. Pietro, H.S. Selistre-de-Araújo, J.R. Giglio, E.B. Oliveira, A.M. Soares, Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom., *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 2881–2886. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049>.
- [22] M.H. Toyama, D. de O. Toyama, L.F.D. Passero, M.D. Laurenti, C.E. Corbett, T.Y. Tomokane, F. V Fonseca, E. Antunes, P.P. Joazeiro, L.O.S. Beriam, M.A.C. Martins, H.S.A. Monteiro, M.C. Fonteles, Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom., *Toxicon.* 47 (2006) 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.008>.
- [23] S.C. França, S. Kashima, P.G. Roberto, M. Marins, F.K. Ticli, J.O. Pereira, S. Astolfi-Filho, R.G. Stábéli, A.J. Magro, M.R.M. Fontes, S. V Sampaio, A.M. Soares, Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355 (2007) 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.217>.
- [24] Y. Sakurai, H. Takatsuka, A. Yoshioka, T. Matsui, M. Suzuki, K. Titani, Y. Fujimura, Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom., *Toxicon.* 39 (2001) 1827–1833. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00133-7).
- [25] R.G. Stábéli, C.D. Sant’Ana, P.H. Ribeiro, T.R. Costa, F.K. Ticli, M.G. Pires, A. Nomizo, S. Albuquerque, N.R. Malta-Neto, M. Marins, S. V Sampaio, A.M. Soares, Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization., *Int. J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>.

- [26] H. Takatsuka, Y. Sakurai, A. Yoshioka, T. Kokubo, Y. Usami, M. Suzuki, T. Matsui, K. Titani, H. Yagi, M. Matsumoto, Y. Fujimura, Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation., *Biochim. Biophys. Acta.* 1544 (2001) 267–277. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00229-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00229-6).
- [27] M. Samel, H. Vija, G. Rönholm, J. Siigur, N. Kalkkinen, E. Siigur, Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1764 (2006) 707–714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.01.021>.
- [28] K. Tõnismägi, M. Samel, K. Trummal, G. Rönholm, J. Siigur, N. Kalkkinen, E. Siigur, L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria., *Toxicon.* 48 (2006) 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.05.004>.
- [29] Q. Wei, Q.-M. Lu, Y. Jin, R. Li, J.-F. Wei, W.-Y. Wang, Y.-L. Xiong, Purification and cloning of a novel C-type lectin-like protein with platelet aggregation activity from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom., *Toxicon.* 40 (2002) 1331–1338. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00144-7).
- [30] N.D. Rawlings, D.P. Tolle, A.J. Barrett, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D160–D164.
- [31] M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V. V. Deshpande, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 597–635. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9729602>.
- [32] M.M. Castro, J.E. Tanus-Santos, R.F. Gerlach, Matrix metalloproteinases: Targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension, *Pharmacol. Res.* 64 (2011) 567–572. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.04.002>.
- [33] H.C. Castro, P.A. Abreu, R.B. Geraldo, R.C.A. Martins, R. dos Santos, N.I. V Loureiro, L.M. Cabral, C.R. Rodrigues, Looking at the proteases from a simple perspective., *J. Mol. Recognit.* 24 (2011) 165–181. <https://doi.org/10.1002/jmr.1091>.
- [34] K. Saeki, K. Ozaki, T. Kobayashi, S. Ito, Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures, *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2007) 501–508.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.103.501>.

- [35] A.K. Tashima, A. Zelanis, E.S. Kitano, D. Ianzer, R.L. Melo, V. Rioli, S.S. Sant'anna, A.C.G. Schenberg, A.C.M. Camargo, S.M.T. Serrano, Peptidomics of three Bothrops snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes, *Mol. Cell. Proteomics*. 11 (2012) 1245–1262. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.019331>.
- [36] C. de F.P. Teixeira, C.M. Fernandes, J.P. Zuliani, S.F. Zamuner, Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases, *Memórias Do Inst. Oswaldo Cruz*. 100 (2005) 181–184.
- [37] X. Liu, C. Kokare, Microbial enzymes of use in industry, in: *Biotechnol. Microb. Enzym.*, Elsevier, 2017: pp. 267–298.
- [38] E. KOCHVA, O.R.A. NAKAR, M. OVADIA, Venom Toxins: Plausible Evolution from Digestive Enzymes¹, *Am. Zool.* 23 (1983) 427–430. <https://doi.org/10.1093/icb/23.2.427>.
- [39] M. Waite, *Handbook of lipid research*, 1978.
- [40] P. Damotharan, A. Veeruraj, M. Arumugam, T. Balasubramanian, Biological and Biochemical Potential of Sea Snake Venom and Characterization of Phospholipase A2 and Anticoagulation Activity., *Indian J. Clin. Biochem.* 31 (2016) 57–67. <https://doi.org/10.1007/s12291-015-0500-6>.
- [41] G. Maróti, A. Kereszt, E. Kondorosi, P. Mergaert, Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals., *Res. Microbiol.* 162 (2011) 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.005>.
- [42] C.D. Fjell, R.E.W. Hancock, A. Cherkasov, AMPer: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides., *Bioinformatics*. 23 (2007) 1148–1155. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm068>.
- [43] S. Fan, Z. Sun, D. Jiang, C. Dai, Y. Ma, Z. Zhao, H. Liu, Y. Wu, Z. Cao, W. Li, BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis., *Cancer Lett.* 291 (2010) 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.10.011>.
- [44] A. Torres-Larios, G.B. Gurrola, F.Z. Zamudio, L.D. Possani, Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*., *Eur. J.*

Biochem. 267 (2000) 5023–5031. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>.

- [45] R. Conde, F.Z. Zamudio, M.H. Rodríguez, L.D. Possani, Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom., *FEBS Lett.* 471 (2000) 165–168. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01384-3).
- [46] L. Moerman, S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. Van Der Walt, F. Verdonck, Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa., *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 4799–4810. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03177.x>.
- [47] L. Dai, A. Yasuda, H. Naoki, G. Corzo, M. Andriantsiferana, T. Nakajima, IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (2001) 820–825. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5472>.
- [48] C. Dai, Y. Ma, Z. Zhao, R. Zhao, Q. Wang, Y. Wu, Z. Cao, W. Li, Mucroporin, the First Cationic Host Defense Peptide from the Venom of *Lychas mucronatus*., *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 3967 LP – 3972. <https://doi.org/10.1128/AAC.00542-08>.
- [49] W. Yuan, L. Cao, Y. Ma, P. Mao, W. Wang, R. Zhao, Y. Wu, Z. Cao, W. Li, Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*., *Peptides.* 31 (2010) 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.10.008>.
- [50] S.A. Fadeyi, O.O. Fadeyi, A.A. Adejumo, C. Okoro, E.L. Myles, In vitro anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants., *BMC Complement. Altern. Med.* 13 (2013) 79. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-79>.
- [51] E. Meiyanto, A. Hermawan, Anindyajati, Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents., *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13 (2012) 427–436. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.2.427>.
- [52] T.E. Heinen, A.B.G. da Veiga, Arthropod venoms and cancer., *Toxicon.* 57 (2011) 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.002>.
- [53] V.L. Petricevich, L.B. Navarro, L.D. Possani, Therapeutic use of scorpion venom,

Mol Asp Inflamm. 9 (2013) 209–231.

- [54] M.J. Ansari, T.B. Strom, Chapter 42 - Novel Diagnostics in Transplantation, in: J. Himmelfarb, M.H.B.T.-C.K.D. Sayegh Dialysis, and Transplantation (Third Edition) (Eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 2010: pp. 609–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0987-2.00042-X>.
- [55] S.R. Aili, A. Touchard, R. Hayward, S.D. Robinson, S.S. Pineda, H. Lalagüe, Mrinalini, I. Vetter, E.A.B. Undheim, R.M. Kini, P. Escoubas, M.P. Padula, G.S.A. Myers, G.M. Nicholson, An Integrated Proteomic and Transcriptomic Analysis Reveals the Venom Complexity of the Bullet Ant *Paraponera clavata*, *Toxins* (Basel). 12 (2020) 324. <https://doi.org/10.3390/toxins12050324>.
- [56] F. Bosmans, J. Tytgat, Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins., *Toxicon*. 49 (2007) 142–158. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.023>.
- [57] R.C.R. de la Vega, L.D. Possani, Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels., *Toxicon*. 49 (2007) 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.016>.
- [58] J. Tytgat, K.G. Chandy, M.L. Garcia, G.A. Gutman, M.F. Martin-Eauclaire, J.J. van der Walt, L.D. Possani, A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies., *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 444–447. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(99\)01398-x](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01398-x).
- [59] H.H. Valdivia, L.D. Possani, Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function., *Trends Cardiovasc. Med.* 8 (1998) 111–118. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(97\)00138-2](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(97)00138-2).
- [60] Z. Fajloun, G. Ferrat, E. Carlier, M. Fathallah, C. Lecomte, G. Sandoz, E. di Luccio, K. Mabrouk, C. Legros, H. Darbon, H. Rochat, J.M. Sabatier, M. De Waard, Synthesis, ¹H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13605–13612. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13605>.
- [61] J.A. DeBin, J.E. Maggio, G.R. Strichartz, Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion., *Am. J. Physiol.* 264 (1993) C361-9. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.2.C361>.

- [62] I. Rjeibi, K. Mabrouk, H. Mosrati, C. Berenguer, H. Mejdoub, C. Villard, D. Laffitte, D. Bertin, L. Ouafik, J. Luis, M. Elayeb, N. Srairi-Abid, Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom., *Peptides*. 32 (2011) 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.015>.
- [63] S.A. Ali, S. Stoeva, J. Schütz, R. Kayed, A. Abassi, Z.H. Zaidi, W. Voelter, Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom., *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 121 (1998) 323–332. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(98\)10140-x](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(98)10140-x).
- [64] C.V.F. Batista, J.G. Martins, R. Restano-Cassulini, F.I. V Coronas, F.Z. Zamudio, R. Procópio, L.D. Possani, Venom characterization of the Amazonian scorpion *Tityus metuendus*., *Toxicon*. 143 (2018) 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.006>.
- [65] R.A. Brandão, R.D. Françoso, Acidente por *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) (Scorpiones, Buthidae) , *Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop.* . 43 (2010) 342–344.
- [66] L.S. Carvalho, M.P.D. Santos, S.C. Dias, Escorpionismo na zona rural de Teresina, Estado do Piauí: relato de casos de envenenamento , *Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop.* . 40 (2007) 491.
- [67] L.A. Esposito, L. Prendini, H.Y. Yamaguti, C.A. Souza, R. Pinto-Da-Rocha, Systematic Revision of the Neotropical Club-Tailed Scorpions, *Physoctonus*, *Rhopalurus*, and *Troglorhopalurus*, Revalidation of *Heteroctenus*, and Descriptions of Two New Genera and Three New Species (Buthidae: *Rhopalurusinae*), *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 415 (2017) 1–134. <https://doi.org/10.1206/0003-0090-415.1.1>.
- [68] S.W.R. Largura., *Estudo das Propriedades Bioquímicas e Farmacológicas das Peçonhas de Escorpiões da Região Centro-oeste do Brasil.*, Universidade de Brasilia, 2003.
- [69] D. Morgenstern, B.H. Rohde, G.F. King, T. Tal, D. Sher, E. Zlotkin, The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*., *Toxicon*. 57 (2011) 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.001>.
- [70] F.M. Almeida, A.M.C. Pimenta, S.G. De Figueiredo, M.M. Santoro, M.F. Martin-

Eauclaire, C.R. Diniz, M.E. De Lima, Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms., *Toxicon*. 40 (2002) 1041–1045. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00084-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00084-3).

- [71] R. Seyedian, M.H. Pipelzadeh, A. Jalali, E. Kim, H. Lee, C. Kang, M. Cha, E.-T. Sohn, E.-S. Jung, A.H. Rahmani, A.Z. Mirakabady, Enzymatic analysis of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin., *Toxicon*. 56 (2010) 521–525. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.008>.
- [72] A. Díaz-García, J.L. Ruiz-Fuentes, A. Yglesias-Rivera, H. Rodríguez-Sánchez, Y. Riquenes Garlobo, O. Fleitas Martinez, J.A. Fraga Castro, Enzymatic analysis of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*., *J. Venom Res.* 6 (2015) 11–18.
- [73] E. Ortiz, G.B. Gurrola, E.F. Schwartz, L.D. Possani, Scorpion venom components as potential candidates for drug development., *Toxicon*. 93 (2015) 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>.
- [74] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (1961) 271–278. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X).
- [75] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*. 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [76] Z. Yu, N. Zhou, C. Zhao, J. Qiu, In-gel determination of L-amino acid oxidase activity based on the visualization of Prussian blue-forming reaction., *PLoS One*. 8 (2013) e55548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055548>.
- [77] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- [78] M.K. UPADHYAY, R. SHARMA, A.K. PANDEY, R.A.M.C. RAJAK, An improved zymographic method for detection of amylolytic enzymes of fungi on polyacrylamide gels, *Mycologist*. 19 (2005) 138–140. [https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(05\)00401-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0269-915X(05)00401-5).
- [79] M.S. Castro, T.C.G. Ferreira, E.M. Cilli, E.J. Crusca, M.J.S. Mendes-Giannini, A. Sebben, C.A.O. Ricart, M. V Sousa, W. Fontes, Hylin a1, the first cytolytic peptide

isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”), *Peptides*. 30 (2009) 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.11.003>.

- [80] H. Blum, H. Beier, H.J. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*. 8 (1987) 93–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>.
- [81] R. Zhao, H. Dai, S. Qiu, T. Li, Y. He, Y. Ma, Z. Chen, Y. Wu, W. Li, Z. Cao, SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom., *PLoS One*. 6 (2011) e27548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027548>.
- [82] E.J. Venancio, F.C. V Portaro, A.K. Kuniyoshi, D.C. Carvalho, G. Pidade-Queiroz, D. V Tambourgi, Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms., *Toxicon*. 69 (2013) 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>.
- [83] H. Ma, T. Xiao-Peng, S.-L. Yang, Q.-M. Lu, R. Lai, Protease inhibitor in scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom prolongs the biological activities of the crude venom., *Chin. J. Nat. Med.* 14 (2016) 607–614. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30071-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30071-1).
- [84] S. Kanoo, S.B. Deshpande, Involvement of phospholipase A2 pathway for the Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardiopulmonary reflexes elicited by phenyldiguanide., *Neurosci. Lett.* 440 (2008) 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.088>.
- [85] D.D. Almeida, K.C. Scortecci, L.S. Kobashi, L.F. Agnez-Lima, S.R.B. Medeiros, A.A. Silva-Junior, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, M. de F. Fernandes-Pedrosa, Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey., *BMC Genomics*. 13 (2012) 362. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-362>.
- [86] K.S. Girish, K. Kemparaju, The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview., *Life Sci.* 80 (2007) 1921–1943. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037>.
- [87] C.V.F. Batista, S.A. Román-González, S.P. Salas-Castillo, F.Z. Zamudio, F. Gómez-Lagunas, L.D. Possani, Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus*

stigmurus: biochemical and physiological comparison with other Tityus species., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146 (2007) 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.004>.

- [88] R. Rodríguez-Ravelo, F.I. V Coronas, F.Z. Zamudio, L. González-Morales, G.E. López, A.R. Urquiola, L.D. Possani, The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 19 (2013) 1–10.
- [89] M. Kishimoto, T. Takahashi, A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase., *Anal. Biochem.* 298 (2001) 136–139. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5381>.
- [90] F. Castellano, V. Molinier-Frenkel, An Overview of L-Amino Acid Oxidase Functions from Bacteria to Mammals: Focus on the Immunoregulatory Phenylalanine Oxidase IL411., *Molecules.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22122151>.
- [91] A. Almaaytah, S. Tarazi, F. Alsheyab, Q. Al-Balas, T. Mukattash, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauriporin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 20 (2014) 397–408. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9405-0>.
- [92] L. Soroceanu, Y. Gillespie, M.B. Khazaeli, H. Sontheimer, Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors., *Cancer Res.* 58 (1998) 4871–4879.
- [93] J. Mindell, M. Maduke, CIC chloride channels, *Genome Biol.* 2 (2001) reviews3003.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-2-reviews3003>.
- [94] J. Deshane, C.C. Garner, H. Sontheimer, Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4135–4144. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205662200>.
- [95] L. Soroceanu, T.J.J. Manning, H. Sontheimer, Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers., *J. Neurosci.* 19 (1999) 5942–5954. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05942.1999>.
- [96] J.K.J. Diss, D. Stewart, F. Pani, C.S. Foster, M.M. Walker, A. Patel, M.B.A. Djamgoz, A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo., *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 8 (2005) 266–273.

<https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500796>.

- [97] D. Shao, K. Okuse, M.B.A. Djamgoz, Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1471–1481. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.01.016>.
- [98] Y.-F. Liu, J. Hu, J.-H. Zhang, S.-L. Wang, C.-F. Wu, Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch., *Prep. Biochem. Biotechnol.* 32 (2002) 317–327. <https://doi.org/10.1081/PB-120015456>.
- [99] Y.-F. Liu, R.-L. Ma, S.-L. Wang, Z.-Y. Duan, J.-H. Zhang, L.-J. Wu, C.-F. Wu, Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* karsch in *Escherichia coli*., *Protein Expr. Purif.* 27 (2003) 253–258. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(02\)00609-5](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(02)00609-5).
- [100] Y. Gu, S.-L. Liu, W.-Z. Ju, C.-Y. Li, P. Cao, Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells., *Oncol. Lett.* 5 (2013) 483–488. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1049>.
- [101] Y. Zhao, X. Cai, T. Ye, J. Huo, C. Liu, S. Zhang, P. Cao, Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells., *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 2424–2434. <https://doi.org/10.1002/jcb.23166>.
- [102] W. Li, Y. Li, Y. Zhao, J. Yuan, W. Mao, Inhibition effects of scorpion venom extracts (*Buthus matensii* Karsch) on the growth of human breast cancer MCF-7 cells, *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM.* 11 (2014) 105–110. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i5.17>.
- [103] R.C. BRUSCA, G.J. BRUSCA, *Invertebrados*, 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.
- [104] J. Ding, P.-J. Chua, B.-H. Bay, P. Gopalakrishnakone, Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds., *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 239 (2014) 387–393. <https://doi.org/10.1177/1535370213513991>.
- [105] L. Zhang, W. Shi, X.-C. Zeng, F. Ge, M. Yang, Y. Nie, A. Bao, S. Wu, G. E, Unique diversity of the venom peptides from the scorpion *Androctonus bicolor* revealed by

transcriptomic and proteomic analysis., *J. Proteomics.* 128 (2015) 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.030>.

- [106] J.A. Guerrero-Vargas, C.B.F. Mourão, V. Quintero-Hernández, L.D. Possani, E.F. Schwartz, Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺-Channel Scorpion Toxins, *PLoS One.* 7 (2012) e30478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030478>.
- [107] P. Escoubas, L. Quinton, G.M. Nicholson, Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry., *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 279–295. <https://doi.org/10.1002/jms.1389>.
- [108] G. Estrada, B.I. Garcia, E. Schiavon, E. Ortiz, S. Cestele, E. Wanke, L.D. Possani, G. Corzo, Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: heterologous expression and proper folding in vitro., *Biochim. Biophys. Acta.* 1770 (2007) 1161–1168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.04.006>.
- [109] Z.-Y. Chen, D.-Y. Zeng, Y.-T. Hu, Y.-W. He, N. Pan, J.-P. Ding, Z.-J. Cao, M.-L. Liu, W.-X. Li, H. Yi, L. Jiang, Y.-L. Wu, Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins, *PLoS One.* 7 (2012) e35154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035154>.
- [110] A. Almaaytah, Q. Albalas, Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review., *Peptides.* 51 (2014) 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>.
- [111] N. Ohta, I. Kubota, T. Takao, Y. Shimonishi, Y. Yasuda-Kamatani, H. Minakata, K. Nomoto, Y. Muneoka, M. Kobayashi, Fulicin, a novel neuropeptide containing a D-amino acid residue isolated from the ganglia of *Achatina fulica*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 (1991) 486–493. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90133-r](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90133-r).
- [112] Y. Yasuda-Kamatani, A. Yasuda, Identification of orcokinin gene-related peptides in the brain of the crayfish *Procambarus clarkii* by the combination of MALDI-TOF and on-line capillary HPLC/Q-ToF mass spectrometries and molecular cloning., *Gen. Comp. Endocrinol.* 118 (2000) 161–172. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7453>.
- [113] J.R.A. dos Santos-Pinto, L.D. dos Santos, H. Andrade Arcuri, F.M. Castro, J.E. Kalil, M.S. Palma, Using Proteomic Strategies for Sequencing and Post-Translational Modifications Assignment of Antigen-5, a Major Allergen from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 855–865.

<https://doi.org/10.1021/pr4008927>.

- [114] F. Kazemi-Lomedasht, V. Khalaj, K.P. Bagheri, M. Behdani, D. Shahbazzadeh, The first report on transcriptome analysis of the venom gland of Iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*, *Toxicon*. 125 (2017) 123–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.261>.
- [115] B.M. Ueberheide, D. Fenyő, P.F. Alewood, B.T. Chait, Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 6910–6915. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900745106>.
- [116] S. Zhu, W. Li, Precursors of three unique cysteine-rich peptides from the scorpion *Buthus martensii* Karsch., *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 131 (2002) 749–756. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(02\)00020-9](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(02)00020-9).
- [117] S. Yang, Z. Liu, Y. Xiao, Y. Li, M. Rong, S. Liang, Z. Zhang, H. Yu, G.F. King, R. Lai, Chemical Punch Packed in Venoms Makes Centipedes Excellent Predators*, *Mol. Cell. Proteomics*. 11 (2012) 640–650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/mcp.M112.018853>.
- [118] E.A.B. Undheim, A. Jones, K.R. Clauser, J.W. Holland, S.S. Pineda, G.F. King, B.G. Fry, Clawing through Evolution: Toxin Diversification and Convergence in the Ancient Lineage Chilopoda (Centipedes), *Mol. Biol. Evol.* 31 (2014) 2124–2148. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu162>.
- [119] E.A.B. Undheim, B.G. Fry, G.F. King, Centipede Venom: Recent Discoveries and Current State of Knowledge, *Toxins* . 7 (2015). <https://doi.org/10.3390/toxins7030679>.
- [120] Z.-Y. Chen, Y.-T. Hu, W.-S. Yang, Y.-W. He, J. Feng, B. Wang, R.-M. Zhao, J.-P. Ding, Z.-J. Cao, W.-X. Li, Y.-L. Wu, Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 13813–13821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343996>.
- [121] J.A. Foster, G.L. Gerton, Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family., *Mol. Reprod. Dev.* 44 (1996) 221–229. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199606\)44:2<221::AID-MRD11>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199606)44:2<221::AID-MRD11>3.0.CO;2-5).

- [122] L.D. Possani, A.C. Alagón, P.L.J. Fletcher, B.W. Erickson, Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello., *Arch. Biochem. Biophys.* 180 (1977) 394–403. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90053-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90053-4).
- [123] V. Quintero-Hernández, J.M. Jiménez-Vargas, G.B. Gurrola, H.H. Valdivia, L.D. Possani, Scorpion venom components that affect ion-channels function, *Toxicon.* 76 (2013) 328–342. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.012>.
- [124] M. Heidarpour, E. Ennaifer, H. Ahari, N. Srairi-Abid, L. Borchani, G. Khalili, H. Amini, A.A. Anvar, S. Boubaker, M. El-Ayeb, D. Shahbazzadeh, Histopathological changes induced by *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in mice., *Toxicon.* 59 (2012) 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.011>.
- [125] L.F.M. Izidoro, J.C. Sobrinho, M.M. Mendes, T.R. Costa, A.N. Grabner, V.M. Rodrigues, S.L. da Silva, F.B. Zanchi, J.P. Zuliani, C.F.C. Fernandes, L.A. Calderon, R.G. Stábeli, A.M. Soares, Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 196754. <https://doi.org/10.1155/2014/196754>.
- [126] R. López, G. D'Suze, C.M. Ruiz, F. Michelangeli, C. Sevcik, THE PURIFICATION OF *Tityus ivic-nancor* VENOM AND THE CHARACTERIZATION OF THE EFFECT OF THE SCORPION VENOMS OF THE *Tityus* GENUS ON RAT PANCREATIC PREPARATIONS , *J. Venom. Anim. Toxins .* 5 (1999) 109.
- [127] M.D. Spangfort, Structure and biology of stinging insect venom allergens, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123 (2000) 99–106.
- [128] E. Calvo, A. Dao, V.M. Pham, J.M.C. Ribeiro, An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 (2007) 164–175.
- [129] D. More, J. Nugent, L. Hagan, J. Demain, H. Schwertner, B. Whisman, T. Freeman, Identification of allergens in the venom of the common striped scorpion., *Ann. Allergy, Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy, Asthma, Immunol.* 93 (2004) 493–498. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61418-4](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61418-4).
- [130] U.C. de Oliveira, D.M. Candido, V.A.C. Dorce, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion., *Toxicon.*

- [140] S. Mouhat, B. Jouirou, A. Mosbah, M. De Waard, J.-M. Sabatier, Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels., *Biochem. J.* 378 (2004) 717–726. <https://doi.org/10.1042/BJ20031860>.
- [141] M.T. Marty, A.J. Baldwin, E.G. Marklund, G.K.A. Hochberg, J.L.P. Benesch, C. V Robinson, Bayesian Deconvolution of Mass and Ion Mobility Spectra: From Binary Interactions to Polydisperse Ensembles, *Anal. Chem.* 87 (2015) 4370–4376. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00140>.
- [142] N.R. Pace, D.K. Smith, G.J. Olsen, B.D. James, Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA--a review., *Gene.* 82 (1989) 65–75. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90031-0).
- [143] N.J. Greenfield, G.D. Fasman, Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry.* 8 (1969) 4108–4116. <https://doi.org/10.1021/bi00838a031>.
- [144] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [145] G. Corzo, A. Prochnicka-Chalufour, B.I. García, L.D. Possani, M. Delepiepierre, Solution structure of Cn5, a crustacean toxin found in the venom of the scorpions *Centruroides noxius* and *Centruroides suffusus suffusus*., *Biochim. Biophys. Acta.* 1794 (2009) 1591–1598. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.07.006>.
- [146] S.P. Fraser, J.K.J. Diss, A.-M. Chioni, M.E. Mycielska, H. Pan, R.F. Yamaci, F. Pani, Z. Siwy, M. Krasowska, Z. Grzywna, W.J. Brackenbury, D. Theodorou, M. Koyutürk, H. Kaya, E. Battaloglu, M.T. De Bella, M.J. Slade, R. Tolhurst, C. Palmieri, J. Jiang, D.S. Latchman, R.C. Coombes, M.B.A. Djamgoz, Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis., *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11 (2005) 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>.
- [147] F. Gradek, O. Lopez-Charcas, S. Chadet, L. Poisson, L. Ouldamer, C. Goupille, M.-L. Jourdan, S. Chevalier, D. Moussata, P. Besson, S. Roger, Sodium Channel Nav1.5 Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness in Breast Cancer Cells Through its Regulation by the Salt-Inducible Kinase-1, *Sci. Rep.* 9

(2019) 18652. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55197-5>.

- [148] F. Lang, M. Föllner, K.S. Lang, P.A. Lang, M. Ritter, E. Gulbins, A. Vereninov, S.M. Huber, Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death., *J. Membr. Biol.* 205 (2005) 147–157. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0780-5>.
- [149] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion channels and the hallmarks of cancer., *Trends Mol. Med.* 16 (2010) 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>.
- [150] V. Lehen'kyi, G. Shapovalov, R. Skryma, N. Prevarskaya, Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C1281-9. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2011>.
- [151] B.F. Trump, S.H. Chang, P.C. Phelps, R.T. Jones, Apoptosis, oncosis, and necrosis, *Cardiovasc. Toxicol.* (2001) 101.
- [152] C. Mathes, QPatch: the past, present and future of automated patch clamp., *Expert Opin. Ther. Targets.* 10 (2006) 319–327. <https://doi.org/10.1517/14728222.10.2.319>.
- [153] C.M. Perou, T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.-L. Børresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature.* 406 (2000) 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- [154] G. Fountzilas, U. Dafni, M. Bobos, A. Batistatou, V. Kotoula, H. Trihia, V. Malamou-Mitsi, S. Miliaras, S. Chrisafi, S. Papadopoulos, M. Sotiropoulou, T. Filippidis, H. Gogas, T. Koletsa, D. Bafaloukos, D. Televantou, K.T. Kalogeras, D. Pectasides, D. V. Skarlos, A. Koutras, M.A. Dimopoulos, Differential Response of Immunohistochemically Defined Breast Cancer Subtypes to Anthracycline-Based Adjuvant Chemotherapy with or without Paclitaxel, *PLoS One.* 7 (2012) e37946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037946>.
- [155] S.R. Dennison, M. Mura, F. Harris, L.H.G. Morton, A. Zvelindovsky, D.A. Phoenix, The role of C-terminal amidation in the membrane interactions of the anionic antimicrobial peptide, maximin H5, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848 (2015) 1111–1118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.014>.

- [156] D. V Kuzmin, A.A. Emelianova, M.B. Kalashnikova, P. V Panteleev, T. V Ovchinnikova, Effect of N- and C-Terminal Modifications on Cytotoxic Properties of Antimicrobial Peptide Tachyplesin I, *Bull. Exp. Biol. Med.* 162 (2017) 754–757. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3705-2>.
- [157] J.S. Wingerd, I. Vetter, R.J. Lewis, Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets, *Ther. Targets Modul. Inhib. Act. Bot. LM*, Loza, M., Eds. (2012) 63–122.
- [158] J.K. Diss, S.N. Archer, J. Hirano, S.P. Fraser, M.B. Djamgoz, Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines., *Prostate.* 48 (2001) 165–178. <https://doi.org/10.1002/pros.1095>.
- [159] J.K. Blandino, M.P. Viglione, W.A. Bradley, H.K. Oie, Y.I. Kim, Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG., *J. Membr. Biol.* 143 (1995) 153–163. <https://doi.org/10.1007/BF00234661>.
- [160] P. Rhana, R.R. Trivelato Junior, P.S.L. Beirão, J.S. Cruz, A.L.P. Rodrigues, Is there a role for voltage-gated Na⁺ channels in the aggressiveness of breast cancer? , *Brazilian J. Med. Biol. Res.* . 50 (2017).
- [161] F. Roselli, P. Livrea, E. Jirillo, Voltage-gated sodium channel blockers as immunomodulators., *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 1 (2006) 83–91. <https://doi.org/10.2174/157488906775245255>.
- [162] S. Sakura, A.W. Bollen, R. Ciriales, K. Drasner, Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels., *Anesth. Analg.* 81 (1995) 338–346. <https://doi.org/10.1097/00000539-199508000-00023>.
- [163] M. Sakaguchi, Y. Kuroda, M. Hirose, The antiproliferative effect of lidocaine on human tongue cancer cells with inhibition of the activity of epidermal growth factor receptor., *Anesth. Analg.* 102 (2006) 1103–1107. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000198330.84341.35>.
- [164] R. Peruzzo, L. Biasutto, I. Szabò, L. Leanza, Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression, *Eur. Biophys. J.* 45 (2016) 685–707. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1143-0>.
- [165] F. Lang, C. Stournaras, Ion channels in cancer: future perspectives and clinical

potential, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369 (2014) 20130108. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0108>.

- [166] F. Hassan, M. Khajah, M. Yang, W. Brackenbury, Y. Luqmani, Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 48 (2015). <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3239>.
- [167] H. Liu, J.P. Dilger, J. Lin, Lidocaine Suppresses Viability and Migration of Human Breast Cancer Cells: TRPM7 as a Target for Some Breast Cancer Cell Lines, *Cancers (Basel)*. 13 (2021) 234. <https://doi.org/10.3390/cancers13020234>.

Anexos

I – Licenças SISBIO e SISGen



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 51771-2	Data da Emissão: 19/05/2017 15:30	Data para Revalidação*: 18/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Carolina Martins Magalhães	CPF: 039.372.331-30
Título do Projeto: Isolamento de peptídeos bioativos da peçonha do escorpião <i>Rhopalurus agamenmon</i>	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	
CNPJ: 00.038.174/0001-43	

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de <i>Rhopalurus agamenmon</i>	11/2015	11/2019



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A826A3A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A826A3A
Usuário: Universidade de Brasília
CPF/CNPJ: 00.038.174/0001-43
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Tityus fasciolatus
Rhopalurus agamemnon

II- Lista de proteínas identificadas pela proteômica shotgun

Protein ID	Accession	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Avg. Mass	Description
7669	XP_023222256.1	61	55	55	21971	orcokinin peptides type A-like [Centruroidessculpturatus]
7683	ACD11842.1	18	23	8	19463	hypothetical protein partial [Isometrus maculatus]
7676	XP_023210148.1	20	23	8	19439	orcokinin peptides type A-like [Centruroidessculpturatus]
7672	C9X4J0.1 NDB2_TITDI	40	30	26	8731	RecName: Full=Bradykinin-potentiating peptide;
7673	CAY61908.1	40	30	26	8731	BPP precursor [Tityusdiscrepans]
7671	XP_023229377.1	40	28	20	13985	uncharacterized protein LOC111629712 [Centruroidessculpturatus]
7692	ABR21059.1	21	17	2	17948	venom neuropeptide-2 [Mesobuthuseupeus]
7693	ADY62664.1	19	17	2	19512	putativeorcokinin [Hottentottajudaicus]
7694	AMX81486.1	19	17	2	19494	venomtoxin meuVNP2 [Mesobuthuseupeus]
7695	AMX81487.1	19	17	2	19494	venomtoxin meuVNP3 [Mesobuthuseupeus]
7919	XP_023240519.1	2	1	1	39503	alpha-tocopherol transfer protein-like [Centruroidessculpturatus]
7670	XP_023218207.1	5	8	8	254751	uncharacterized protein LOC111620512 [Centruroidessculpturatus]
7712	XP_023220230.1	33	16	16	9691	scorpine-like peptide Tco 41.46-2 [Centruroidessculpturatus]
7698	AAL23422.1	72	13	12	9602	sodium-channelmodifiertoxin precursor CsEv1e [Centruroidesexilicauda]
7690	XP_023220974.1	26	5	5	19797	uncharacterized protein LOC111622785 [Centruroidessculpturatus]
7691	XP_023214598.1	25	5	5	21039	uncharacterized protein LOC111617551 partial [Centruroidessculpturatus]
7747	XP_023212603.1	16	9	1	14554	uncharacterized protein LOC111615419 [Centruroidessculpturatus]
7812	JAW06999.1	19	7	7	8436	putativeantimicrobialpeptide [Tityusserrulatus]
7813	JAW07043.1	19	7	7	8421	putativeantimicrobialpeptide [Tityusserrulatus]
7677	XP_023218547.1	27	7	7	22515	fulicin peptides-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
7674	XP_023226974.1	18	9	9	46445	hyaluronidase 1-like [Centruroidessculpturatus]
7681	XP_023224710.1	4	4	2	146259	uncharacterized protein LOC111625725 [Centruroidessculpturatus]
7684	XP_023239572.1	14	3	3	30082	transmembrane protease serine 11D-like [Centruroidessculpturatus]
7726	JAT91071.1	7	3	1	71588	putative hemocyanin subunit [Tityus obscurus]
7678	XP_023238955.1	24	6	6	13955	uncharacterized protein LOC111637646 [Centruroidessculpturatus]
7682	XP_023234642.1	40	4	4	9942	putative defensin-like protein 66 [Centruroidessculpturatus]
7675	JAT91072.1	7	5	3	78794	putativetransferrin [Tityusobscurus]
7679	XP_023227775.1	5	4	3	146990	uncharacterized protein LOC111628254 [Centruroidessculpturatus]
7680	XP_023228836.1	10	4	3	72129	hemocyanin F chain-like [Centruroidessculpturatus]
7719	XP_023229829.1	4	6	6	70781	nucleobindin-2-like [Centruroidessculpturatus]

7720	XP_023229830.1	4	6	6	70781	nucleobindin-2-like [Centruroidessculpturatus]
7685	XP_023211330.1	32	4	3	10268	potassium channel toxin TdiKIK-like [Centruroidessculpturatus]
7686	XP_023220228.1	20	4	3	16000	potassium channel toxin TdiKIK isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
7746	XP_023234347.1	8	2	2	40469	peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase A-like [Centruroidessculpturatus]
7940	XP_023219101.1	1	1	1	63079	alpha-1 3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase [Centruroidessculpturatus]
7941	XP_023219812.1	1	1	1	63079	alpha-1 3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase [Centruroidessculpturatus]
7744	XP_023209358.1	5	2	2	71493	angiotensin-converting enzyme-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
7745	XP_023209357.1	5	2	2	73908	angiotensin-converting enzyme-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
7696	XP_023239442.1	10	3	3	39135	peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase-like [Centruroidessculpturatus]
7702	JAT91064.1	10	3	3	39271	putativepeptidylglycine alpha-amidatingmonooxygenase [Tityusobscurus]
7705	AMX81493.1	35	6	2	8277	venomtoxin meuTx20 [Mesobuthuseupeus]
7703	XP_023209874.1	9	3	3	31072	CRISP/Allergen/PR-1-like partial [Centruroidessculpturatus]
7704	XP_023242168.1	6	3	3	44280	CRISP/Allergen/PR-1-like partial [Centruroidessculpturatus]
7725	XP_023222105.1	5	3	2	72970	hemocyanin B chain-like [Centruroidessculpturatus]
7788	CCD31429.1	14	2	2	9417	scorpion toxin To12 precursor [Tityus obscurus]
7789	H1ZZI1.1 SCX12_TITOB	14	2	2	9417	RecName: Full=Toxin To12; AltName: Full=T-beta* NaTx5.5; Flags: Precursor
7721	XP_023224715.1	4	4	2	78796	transferrin-like [Centruroidessculpturatus]
7687	XP_023241578.1	9	5	3	47347	venom allergen 5-like [Centruroidessculpturatus]
7688	XP_023241580.1	9	5	3	47347	venom allergen 5-like [Centruroidessculpturatus]
7689	XP_023241579.1	9	5	3	47347	venom allergen 5-like [Centruroidessculpturatus]
7741	JAT91069.1	3	1	1	73246	putative hemocyanin subunit [Tityus obscurus]
7707	XP_023228501.1	33	4	4	9740	alpha-toxin CvIV4-like [Centruroidessculpturatus]
7790	XP_023224731.1	3	1	1	72472	hemocyanin A chain-like [Centruroidessculpturatus]
7791	XP_023227784.1	3	1	1	72472	hemocyanin A chain-like [Centruroidessculpturatus]
7805	P63019.1 SCX12_CENNO	16	1	1	7148	RecName: Full=Alpha-toxin Cn12
7806	pdb 1PE4 A	16	1	1	7148	Chain A SEQRES
7814	XP_023230636.1	11	1	1	10513	alpha-toxin Cn12 [Centruroidessculpturatus]
7776	JAT91065.1	3	1	1	59579	putative alpha amylasepartial [Tityusobscurus]
7710	JAW06991.1	11	3	1	47350	putative cysteine-rich protein [Tityus serrulatus]
7711	JAW07032.1	11	3	1	47350	putative cysteine-rich protein [Tityus serrulatus]

7765	XP_023225708.1	4	3	3	60068	pancreatic alpha-amylase-like [Centruroidessculpturatus]
7766	XP_023225713.1	4	3	3	60068	pancreatic alpha-amylase-like [Centruroidessculpturatus]
7767	XP_023225711.1	4	3	3	60068	pancreatic alpha-amylase-like [Centruroidessculpturatus]
7768	XP_023225709.1	4	3	3	60068	pancreatic alpha-amylase-like [Centruroidessculpturatus]
7769	XP_023225710.1	4	3	3	60068	pancreatic alpha-amylase-like [Centruroidessculpturatus]
7801	XP_023210067.1	4	1	1	37504	uncharacterized protein LOC111613006 [Centruroidessculpturatus]
7802	XP_023210069.1	4	1	1	37504	uncharacterized protein LOC111613006 [Centruroidessculpturatus]
7803	XP_023210068.1	4	1	1	37504	uncharacterized protein LOC111613006 [Centruroidessculpturatus]
7810	XP_023234499.1	3	2	2	44966	venom metalloproteinase antarease-like TtrivMP_A [Centruroidessculpturatus]
7825	XP_023234516.1	9	2	2	14110	venommetalloproteinaseantareaseTserMP_A-like [Centruroidessculpturatus]
7826	XP_023214049.1	3	2	2	42091	venommetalloproteinaseantarease-like TtrivMP_Apartial [Centruroidessculpturatus]
7827	XP_023234505.1	3	2	2	43264	venom metalloproteinase antarease-like TtrivMP_A [Centruroidessculpturatus]
7828	XP_023234507.1	3	2	2	43150	venom metalloproteinase antarease-like TtrivMP_A [Centruroidessculpturatus]
7829	JAT91175.1	3	2	2	43491	putativemetalloproteinase [Tityusobscurus]
7809	XP_023223330.1	3	1	1	46003	synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like isoform X3 [Centruroidessculpturatus]
7797	JAT91068.1	3	2	1	71949	putative hemocyanin subunit [Tityus obscurus]
8014	PODL41.1 NDB32_CENSU	44	5	5	2870	RecName: Full=Css54; AltName: Full=Non-disulfide-bridged peptide 3.2; Short=NDBP-3.2
7727	XP_023223904.1	2	1	1	89419	angiotensin-converting enzyme-like [Centruroidessculpturatus]
7755	XP_023241641.1	20	2	2	9450	beta-neurotoxin Css9 [Centruroidessculpturatus]
7740	XP_023230607.1	1	2	2	194959	low-density lipoprotein receptor-related protein 1-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
7807	XP_023218281.1	2	1	1	87848	venom phosphodiesterase 2-like [Centruroidessculpturatus]
7882	ACD11954.1	6	1	1	25082	hypothetical protein partial [Isometrus maculatus]
7860	JAG85192.1	3	1	1	43702	putativemetalloproteinasepartial [Tityusbahiensis]
7811	XP_023212239.1	2	1	1	54843	venom metalloproteinase antarease-like TtrivMP_A [Centruroidessculpturatus]
7862	XP_023221287.1	9	1	1	11941	crustacean hyperglycemic hormone-like [Centruroidessculpturatus]
7863	XP_023221290.1	9	1	1	11941	crustacean hyperglycemic hormone-like [Centruroidessculpturatus]
7864	XP_023221288.1	9	1	1	11941	crustacean hyperglycemic hormone-like [Centruroidessculpturatus]
7728	XP_023222944.1	1	2	2	143176	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X5 [Centruroidessculpturatus]
7729	XP_023222937.1	1	2	2	150453	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X4 [Centruroidessculpturatus]
7730	XP_023222931.1	1	2	2	154939	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X3 [Centruroidessculpturatus]
7731	XP_023222924.1	1	2	2	157518	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
7732	XP_023222912.1	1	2	2	163979	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]

7733	XP_023222918.1	1	2	2	163979	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
7734	XP_023222901.1	1	2	2	163979	ATP-binding cassette sub-family A member 3-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
7861	JAG85219.1	3	1	1	38933	putativemetalloproteinasepartial [Tityusbahiensis]
7751	XP_023243624.1	2	1	1	74064	hemocyanin B chain-like [Centruroidessculpturatus]
7865	P60163.1 SCX2_CENGR	12	1	1	7661	RecName: Full=Toxin Cg2
7923	XP_023231804.1	0	1	1	233135	uncharacterized protein MAL13P1.304-like [Centruroidessculpturatus]
7894	P58296.1 SCXB_CENNO	13	1	1	6982	RecName: Full=Toxin Cn11
7867	XP_023219913.1	2	2	2	207086	uncharacterized protein CG43867-like [Centruroidessculpturatus]
7933	XP_023212124.1	7	1	1	41274	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8 [Centruroidessculpturatus]
7870	AIX87767.1	8	1	1	11298	cellularprotein AbCp-44 partial [Androctonus bicolor]
7779	AIJ02117.2	5	2	2	44317	metalloserulase 9 [Tityusserrulatus]
7926	ACD11800.1	6	1	1	12329	hypothetical protein partial [Isometrus maculatus]
7937	JAW06985.1	3	1	1	37655	putativemetalloproteinasepartial [Tityusserrulatus]
7938	AMO02555.1	3	1	1	41130	metalloserulase13 partial [Tityusserrulatus]
7939	JAW07028.1	3	1	1	43807	putative metalloprotease partial [Tityus serrulatus]
7945	pdb 1SEG A	11	1	1	7413	Chain A 1 Aah2: Lqh-alpha-it (face) Chimeric Toxin
7947	POCI57.1 SNAB6_LYCMC	9	1	1	8785	RecName: Full=Neurotoxin LmNaTx11.6; Flags: Precursor
7948	POCI56.1 SNAB_LYCMC	9	1	1	8955	RecName: Full=Neurotoxin LmNaTx11.1; Flags: Precursor
7782	XP_023210014.1	2	2	1	79750	uncharacterized protein LOC111612953 [Centruroidessculpturatus]
8160	AAB34146.1	32	2	1	7338	toxin 1 [Centruroideslimpidus=Mexican scorpions ssp.limpidusKarsch venom Peptide C]
8161	P45667.1 SCXR_CENLI	32	2	1	7338	RecName: Full=Toxin CII1; AltName: Full=CII toxin 1; AltName: Full=Crustacean toxin 1
8170	Q7Z1K7.1 SCX5B_CENLI	24	2	1	9600	RecName: Full=Toxin CII5b; Flags: Precursor
8171	AAP49504.1	24	2	1	9600	sodium-channelmodifiertoxin CII5b precursor [Centruroideslimpiduslimpidus]
8077	XP_023237354.1	5	3	2	166976	microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3-like isoform X6 [Centruroideslimpidus]
8078	XP_023237349.1	5	3	2	181325	microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3-like isoform X4 [Centruroideslimpidus]
8079	XP_023237348.1	5	3	2	181412	microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3-like isoform X3 [Centruroideslimpidus]
8080	XP_023237346.1	5	3	2	182421	microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3-like isoform X1 [Centruroideslimpidus]
8194	POCH40.1 SCX8_CENEL	95	2	2	7459	RecName: Full=Beta-toxin Cell8
7979	XP_023215052.1	3	1	1	32469	uncharacterized protein LOC111617919 [Centruroidessculpturatus]
7982	XP_023222201.1	1	1	1	55300	uncharacterized protein LOC111623740 isoform X4 [Centruroidessculpturatus]
7983	XP_023222198.1	1	1	1	58364	uncharacterized protein LOC111623740 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
7924	XP_023214859.1	2	1	1	40126	uncharacterized protein LOC111617793 [Centruroidessculpturatus]

7928	XP_023230245.1	1	1	1	51987	uncharacterized protein LOC111630386 [Centruroidessculpturatus]
7935	XP_023221062.1	1	1	1	55834	uncharacterized protein LOC111622858 [Centruroidessculpturatus]
7936	XP_023226782.1	1	1	1	56052	uncharacterized protein LOC111627447 [Centruroidessculpturatus]
7942	XP_023241930.1	1	1	1	58935	uncharacterized protein LOC111640163 [Centruroidessculpturatus]
7943	XP_023243619.1	1	1	1	58935	uncharacterized protein LOC111641649 [Centruroidessculpturatus]
7949	XP_023223525.1	1	1	1	60986	uncharacterized protein LOC111624804 [Centruroidessculpturatus]
7950	XP_023237427.1	1	2	2	171324	NFX1-type zinc finger-containing protein 1-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8050	XP_023233467.1	4	1	1	22732	eukaryotic initiation factor 4A-I-like [Centruroidessculpturatus]
8061	XP_023233468.1	1	1	1	53902	eukaryotic initiation factor 4A-I-like [Centruroidessculpturatus]
8195	XP_023216775.1	2	3	2	297168	uncharacterized protein LOC111619306 isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8196	XP_023216774.1	2	3	2	297240	uncharacterized protein LOC111619306 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8207	XP_023216776.1	2	3	2	301545	uncharacterized protein LOC111619306 isoform X3 [Centruroidessculpturatus]
8211	XP_023216778.1	3	3	2	258175	uncharacterized protein LOC111619306 isoform X4 [Centruroidessculpturatus]
8244	XP_023239821.1	3	2	2	34870	uncharacterized protein LOC111638355 [Centruroidessculpturatus]
8245	XP_023239829.1	3	2	2	36716	uncharacterized protein LOC111638361 isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8246	XP_023239828.1	2	2	2	48996	uncharacterized protein LOC111638361 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9799	XP_023238015.1	0	1	1	155225	LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC111636857 [Centruroidessculpturatus]
10776	XP_023215976.1	0	1	1	344046	adenomatous polyposis coli protein-like [Centruroidessculpturatus]
8528	XP_023241780.1	3	2	1	83877	sodiumbicarbonatetransporter-like protein 11 isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8544	XP_023241773.1	2	2	1	96982	sodiumbicarbonatetransporter-like protein 11 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8000	XP_023234148.1	0	1	1	191148	cilia- and flagella-associated protein 44-like [Centruroidessculpturatus]
8045	AMX81442.1	13	1	1	6333	potassium channel toxin meuK7-3 [Mesobuthuseupeus]
8046	AIL48764.1	13	1	1	6266	potassium channel blocker pMeKTx7-3 [Mesobuthuseupeus]
8068	XP_023230045.1	1	1	1	75900	multidrug resistance-associated protein 4-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8069	XP_023230046.1	1	1	1	75900	multidrug resistance-associated protein 4-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8063	XP_023217731.1	1	1	1	134643	pecanex-like protein 4 isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8064	XP_023217728.1	1	1	1	136654	pecanex-like protein 4 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8065	XP_023217729.1	1	1	1	136654	pecanex-like protein 4 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8066	XP_023217730.1	1	1	1	136654	pecanex-like protein 4 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8027	E7CLP6.1 SCX2F_RHOJU	12	1	1	10009	RecName: Full=Putative beta-neurotoxin RjAa2f; Flags: Precursor
8028	ADV16833.1	12	1	1	10009	venomtoxin [Rhopalurusjunceus]
8029	ADV16834.1	12	1	1	10009	venomtoxin [Rhopalurusjunceus]

9168	XP_023234485.1	2	2	0	73893	calpain-C-like [Centruroidessculpturatus]
8085	XP_023222880.1	1	1	1	102125	xylosyltransferase 1-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8086	XP_023222872.1	1	1	1	113237	xylosyltransferase 2-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9905	XP_023229639.1	2	2	1	316332	teneurin-m-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
9906	XP_023229623.1	2	2	1	317413	teneurin-m-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9907	XP_023229613.1	2	2	1	317413	teneurin-m-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9908	XP_023229606.1	2	2	1	317413	teneurin-m-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9909	XP_023229596.1	2	2	1	317413	teneurin-m-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9910	XP_023229631.1	2	2	1	317413	teneurin-m-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8187	XP_023222960.1	1	1	1	69998	probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-4 [Centruroidessculpturatus]
8390	XP_023216550.1	0	1	1	297643	dynein heavy chain 5 axonemal-like [Centruroidessculpturatus]
8152	XP_023229581.1	1	1	1	140995	vacuolar protein sorting-associated protein 13D-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8210	XP_023236488.1	3	1	1	37795	homer protein homolog 2-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8233	XP_023233483.1	2	1	1	35616	THO complex subunit 3-like [Centruroidessculpturatus]
8445	XP_023221213.1	0	1	1	250274	hemicentin-1-like isoform X3 [Centruroidessculpturatus]
8462	XP_023221212.1	0	1	1	270727	hemicentin-1-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8463	XP_023221211.1	0	1	1	270727	hemicentin-1-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8468	XP_023221210.1	0	1	1	276532	hemicentin-1-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
9810	XP_023210446.1	0	1	1	149352	protein slit-like [Centruroidessculpturatus]
8243	XP_023239750.1	1	1	1	57435	zinc finger protein 234-like [Centruroidessculpturatus]
8289	XP_023233749.1	1	2	1	485013	dynein heavy chain 12 axonemal-like [Centruroidessculpturatus]
8368	XP_023220971.1	0	1	1	521820	ryanodine receptor-like [Centruroidessculpturatus]
8440	XP_023238336.1	1	1	1	46843	uncharacterized protein LOC111637146 [Centruroidessculpturatus]
8448	XP_023232605.1	1	1	1	52573	uncharacterized protein LOC111632423 [Centruroidessculpturatus]
8449	XP_023235632.1	1	1	1	52791	uncharacterized protein LOC111635018 isoform X3 [Centruroidessculpturatus]
8450	XP_023243970.1	1	1	1	52791	uncharacterized protein LOC111641948 [Centruroidessculpturatus]
8460	XP_023235631.1	1	1	1	54639	uncharacterized protein LOC111635018 isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8469	XP_023235630.1	1	1	1	57028	uncharacterized protein LOC111635018 isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8053	pdb 2KBJ A	11	1	1	7457	Chain A SEQRES
8054	pdb 2KBH A	11	1	1	7457	Chain A SEQRES
8055	ABJ09779.1	8	1	1	9604	sodium channel toxin [Mesobuthusmartensii]
8056	Q9NJC7.1 SC11_MESMA	8	1	1	9524	RecName: Full=BmK AGP-SYPU2; AltName: Full=Alpha-neurotoxin Tx11; AltName: Full=

					AltName: Full=BmKalpha2; AltName: Full=BmKalphaTx11; AltName: Full=BmKalphaTx11'	AltName: Full=Toxin Bmka2...
8057	AAV64255.1	8	1	1	9574	neurotoxin Tx11 [Mesobuthusmartensii]
8058	AAF31478.1	8	1	1	9524	toxin BmTX11' [Mesobuthusmartensii]
8059	AAF31295.1	8	1	1	9588	neurotoxin TX11P [Mesobuthusmartensii]
8060	AAG00581.1	8	1	1	9524	alpha toxin2 precursor [Mesobuthusmartensii]
8262	XP_023222435.1	2	1	1	42408	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] cytoplasmic-like isoenzyme 1 [Centruroidessculpturatus]
8259	ACD11820.1	6	1	1	9233	hypotheticalprotein [Isometrusmaculatus]
8263	ABX76752.1	6	1	1	9416	neurotoxin LmNaTx4 precursor [Lychasmucronatus]
8264	POCI52.1 SNAU_LYCMC	6	1	1	9415	RecName: Full=Neurotoxin LmNaTx30; Flags: Precursor
8265	XP_023238168.1	6	1	1	9414	alpha-toxin CvIV4-like [Centruroidessculpturatus]
8121	XP_023209541.1	0	1	1	347670	multiple epidermal growth factor-like domains protein 8 [Centruroidessculpturatus]
8964	XP_023229883.1	3	1	1	22010	vesicle-associated membrane protein-associated protein A-like isoenzyme 1 [Centruroidessculpturatus]
8127	XP_023219528.1	1	1	1	173143	uncharacterized protein LOC111621579 [Centruroidessculpturatus]
8256	XP_023230044.1	3	1	1	21730	uncharacterized protein LOC111630209 [Centruroidessculpturatus]
8236	AAR08032.1	14	1	1	7304	beta-toxinpartial [Centruroidesnoxius]
8237	AAA28287.1	11	1	1	9429	Na+-channel blocking toxin partial [Centruroidesnoxius]
8238	P45665.1 SCXY_CENNO	10	1	1	9560	RecName: Full=ToxinCngtIV; Flags: Precursor
8744	XP_023209390.1	0	1	1	427935	protocadherin Fat 4-like partial [Centruroidessculpturatus]
8188	XP_023228500.1	6	1	1	9673	alpha-toxin CsE5-like [Centruroidessculpturatus]
8477	XP_023236571.1	1	1	1	46511	lissencephaly-1 homolog [Centruroidessculpturatus]
8880	XP_023233434.1	1	1	1	80961	transcription factor Sox-13-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
9183	XP_023219119.1	1	1	1	96400	ATP-dependent RNA helicase DDX3X-like [Centruroidessculpturatus]
7929	XP_023228360.1	2	1	1	111979	uncharacterized protein LOC111628749 [Centruroidessculpturatus]
7930	XP_023210754.1	1	1	1	84962	poly(A) polymerase beta-like [Centruroidessculpturatus]
7931	XP_023212147.1	1	1	1	85185	poly(A) polymerase beta-like partial [Centruroidessculpturatus]
8855	XP_023239771.1	1	1	1	97004	clathrin heavy chain-like [Centruroidessculpturatus]
7775	XP_023230562.1	0	1	1	327039	cadherin-related tumor suppressor-like partial [Centruroidessculpturatus]
8261	XP_023230592.1	2	1	1	37917	uncharacterized protein LOC111630685 [Centruroidessculpturatus]
8545	XP_023224702.1	0	1	1	145325	macrophage mannose receptor 1-like [Centruroidessculpturatus]

8216	XP_023218783.1	1	1	1	95099	uncharacterized protein LOC111620987 [Centruroidessculpturatus]
8423	P56608.1 SCX3_TITBA	21	1	1	6978	RecName: Full=Toxin Tb3; AltName: Full=P-Mice-alpha* NaTx3.3; AltName: Full=TbTx IV
8424	AAB36320.1	21	1	1	6978	IV-5b=toxin IV-5 homolog [Tityus bahiensis venom Peptide 62 aa]
8425	JAG85206.1	15	1	1	9598	putative sodium channel toxin [Tityus bahiensis]
8639	XP_023220508.1	1	1	1	120656	protein kintoun-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8641	XP_023220506.1	1	1	1	124215	protein kintoun-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8457	XP_023233078.1	0	1	1	200754	uncharacterized protein LOC111632783 [Centruroidessculpturatus]
8616	XP_023244111.1	1	1	1	94121	histone acetyltransferase KAT6A-like isoform X2 [Centruroidessculpturatus]
8617	XP_023244110.1	1	1	1	94250	histone acetyltransferase KAT6A-like isoform X1 [Centruroidessculpturatus]
8896	XP_023225803.1	2	1	1	38858	beta-1 3-galactosyltransferase 1-like [Centruroidessculpturatus]
8546	XP_023215599.1	2	1	1	43081	TWiK family of potassium channels protein 7-like [Centruroidessculpturatus]
8391	XP_023226357.1	1	1	1	94636	tetratricopeptide repeat protein 7B-like [Centruroidessculpturatus]
8399	XP_023227571.1	1	1	1	99570	uncharacterized protein LOC111628045 [Centruroidessculpturatus]
8511	XP_023226888.1	0	1	1	351317	serine-protein kinase ATM-like [Centruroidessculpturatus]

III –Parte das toxinas putativas a partir da glândula de peçonha

>TRINITY_DN21116_c0_g2_i3 sp|D9U2A0|SNAALYCMC Neurotoxin LmNaTx10 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
MNYFILIFAATLLLDVEGKKDGYPADGNNCRYNWKNKYCDKLCMDKMGESGYCYGWNLSWCWCTGLPDKARLKSDAKCNG*

>TRINITY_DN21048_c0_g2_i1 sp|POC1X6|KA183_TITDI Potassiumchanneltoxin alpha-KTx 18.3 OS=Tityusdiscrepans OX=57059 PE=1 SV=2
MHFSGVLLILFSLTLINSIFFDVAEARAFGSCDPFKCVAEKRKKGKGGGCKDYNTCECSIFGK*

>TRINITY_DN20428_c0_g4_i1 sp|Q0GY43|KIK2_TITDI Potassium channel toxin TdiKIK OS=Tityus discrepans OX=57059 PE=1 SV=1
FFFCLRKSFNGDERGDLQRSRGRQAHTLEVLALADRFLGGAMVFTLLDDRTGVLRLGRQFVPRIPHLRCGFGQFILDAFHFFSSSGLCQGVDDQHGQKGDGATTSDDHLESD

>TRINITY_DN20879_c0_g1_i6 sp|P59847|KAX25_CENLM Potassiumchanneltoxin alpha-KTx 2.5 OS=Centruroideslimbatus OX=244936 PE=1 SV=1
LKRFSLLFKNMKAFYGILTILLFCSILNLSHQTVIDVKCTSPRQCERPKDRFGPRTGSKCMNGKCKCYPH*

>TRINITY_DN21216_c0_g2_i6 sp|P01492|SCX1_CENSC Toxin CsEv1 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=3
MLCNFISNYFSNYNHRNGRHKKNNGFIFCRMTCREEGTPVYSLAFPNNILLHNSSHSLPKICFCIPCHNCCHQLSPCNCIYSRLIS*

>TRINITY_DN21049_c0_g1_i10 sp|POC292|TX11_ANDCR Toxin Acra1 OS=Androctonuscrassicauda OX=122909 PE=1 SV=1
ERTVIFSMDLVYVLLTSLIVGSLIGSGSADYMIPIKSSACKKEGTTKEKNAACYEDCKKERFGTGMMVRYGFCHEKNCICNFYQYTP*

>TRINITY_DN20444_c1_g3_i3 sp|P45663|SCX5_CENNO Beta-toxin Cn5 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MKTSLLIAFCLVLIGVYAKDGYLVNKSTGCKYSCSILSSNCDKECKLFKGSSECKWDGCYCKGLPENTQVYPINKKCSSYK*

>TRINITY_DN21024_c0_g1_i6 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MNSILVFALAILFPGMGRGELRDGYPLASNGCKVGCPELGENNPTCNYVCLNKAGSDYGYCYAWNCYCLHVAEGTVLWGDGPGTGPKVY*

>TRINITY_DN21116_c0_g5_i1 sp|POCI52|SNAU_LYCMC Neurotoxin LmNaTx30 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
MNYFILIFAATLLSDVEGKKDGYPADGNNCKYDCWKNYSYCE

>TRINITY_DN19347_c0_g1_i3 sp|P56611|SCX1_TITBA Toxin Tb1 OS=Tityus bahiensis OX=50343 PE=1 SV=1
MKRFILFVTCLVLMGLVVEKDGYPMDHEGCKEWCVINSAYCDHICKVHKAKSGYCYFPLKACYCEGLPENAKIWERATNKCGKVGK*

>TRINITY_DN21005_c1_g1_i5 sp|P01492|SCX1_CENSC Toxin CsEv1 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=3
MNNLLMITACFVLIGAVCAKEGYLVKKSDBGCKYSCVMLFGDSNMGECTSANHKGQKGYCYAFACYCEGMPPESSSVYPLPNKSCGRK*

>TRINITY_DN21052_c1_g3_i3 sp|Q5G8B6|KAX45_TITCO Potassium channel toxin alpha-KTx 4.5 OS=Tityus costatus OX=309814 PE=1 SV=1
MKAFYGILTILLFCSMLNLSHQTVIDVKCTSPRQCDPPCKERFGPRTASKCMNGKCKCYPH*

>TRINITY_DN20527_c0_g5_i1 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
SPLIEVWRKLPKMKMLLIIITSLMIIGVWSKDGYPMDHKGCKIPCVINNQFCETECKIGLKGKKGKGYCYAWKLACYCEGLPEHAKVWWDKATNKCRA*

>TRINITY_DN20837_c1_g3_i7 sp|Q7Z1K5|SCX6_CENLI Toxin CII6 OS=Centruroideslimpidus OX=6876 PE=2 SV=1
MKTLFFFCLVFLIGMVYTKGFLAVESGCKISCSLLSGDGMCECEVAKQADHGFCFNMGCYCYGLPESVPTYPIPGKTC*

>TRINITY_DN12668_c0_g1_i2 sp|O46028|KA101_CENNO Potassium channel toxin alpha-KTx 10.1 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
IILIFQKLNLEQMKDIMKITLIVLILFVTMNTFANWNAAAAASCVYRTCDNSNCKSTGYRSGKCKINSKCKCYPFGK*

>TRINITY_DN20879_c0_g1_i3 sp|P45629|KAX23_CENLI Potassiumchanneltoxin alpha-KTx 2.3 OS=Centruroideslimpidus OX=6876 PE=1 SV=1
LKRFSLLFKNMKALYGILTFILFCSMYVKCTS YQCERPC KDRFGPRTGSKCMNGKCKCYPHRG*

>TRINITY_DN20746_c0_g1_i5 sp|P58296|SCXB_CENNO Toxin Cn11 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MKTFIVFISVLLLLGVESRDGYPVDEKGCKISCVINNKYCNSICHGRGAKYGYCYTGGLACWCEALPDNVKAWTYETNTCGKK*

>TRINITY_DN20527_c0_g7_i1 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
MKILILIIASLIIGVWSKDGYPMDRKGCKISCLVNDQYCESQCTEVLKKGSGYCYSWG LACWCKGLPDDVPVWYAKNTCRS*

>TRINITY_DN20984_c0_g3_i1 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
MKRFILFVCCMLMLMGLVVQSKEGYPM DHEGCKIWCVVNDPYCDITCKEMGGESGSCYSWGLACYCKGLPEDAKVWERETNTCGQKRK*

>TRINITY_DN20193_c0_g1_i6 sp|POCI56|SNAB_LYCMC Neurotoxin LmNaTx11.1 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
HHYPPYICVNM MYTATTGSLSTRSTERNMNASLLFLLTSLVLLHNAQSKKDVPSTYPINENGCTYECFHADTDHIRCKNFCKQLGGSWGYCYFFTCCKEYLPKSV PQEDRLKLFSCGATMLGVS

>TRINITY_DN20746_c0_g1_i9 sp|P58296|SCXB_CENNO Toxin Cn11 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MVIQWMKKVARYPVSTTSIVTLSAMVEAPSMDIATPEGWHV GAKHCLTM*

>TRINITY_DN20995_c1_g2_i4 sp|P60266|SCX4_CENSU Beta-mammal toxin Css4 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=2
MKIFLLISFYLV LIGIAYAKDGNQVHKVTRRSTRCMMVPGDKLCNKKCQLQTGKTSAGYCYMNGKCYCLSMLEDAVSQSRQVIQ*

>TRINITY_DN21167_c0_g1_i23 sp|P01493|SCX2_CENSC Toxin CsEv2 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=2
MKTSLIIAFCLVLIGVAYAKDGY PANKSTGCKYACTSDDSCNSICGAHKGSSGTCSMMSCYCKGMPESAAVYPLPGKYCSEVCILQSI EKLHSSSFSSIFLSHSSSKHH*

>TRINITY_DN20444_c1_g3_i8 sp|P01492|SCX1_CENSC Toxin CsEv1 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=3
MKTSLIIAICLV LIDVAYTKDGYLVKRYNGCKYDCKLILDDKYCNEECQDKNAGGTYGYCYKFGCWCRGMPENADVYPLSSKSCGGK*

>TRINITY_DN20654_c0_g2_i1 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MKILLLLTFCLLLIAIEGKENPREGYPINKSGCKYKCYPLGENNEKTRICKKAGSGYGYCKFFGCYCEDVSKDTV LWGDPNTPIMCMDI*

>TRINITY_DN21024_c0_g1_i10 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
DLPIAQYLRQRVNSSSRHNNIRSHFRLYLGKRNYKSDYFLLAARIQLCSHLKLDIHPSARLFPFRGRELPEQIRVSN SCLIIILLHHLELIVFILFSSRNCRRCR*

>TRINITY_DN20788_c0_g3_i3 sp|P69940|KBX1_TITSE Potassium channel toxin TsTXK-beta OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=1 SV=2
MFHAVTFVGR TSELRLGRFVHHHLQDLPQLTFGHRQQQFLHVLLSDSTGCQRHHSQEEQKDSQFPFHFD DDFKFRFQICFIAWNIFPQ*

>TRINITY_DN21167_c0_g1_i1 sp|P01493|SCX2_CENSC Toxin CsEv2 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=2
MKTSLIIAFCLVLIGVAYAKDGY PANKSTGCKYACTSDDSCNSICGAHKGSSGTCSMMSCYCKGMPESAAVYPLPGKYCSGK*

>TRINITY_DN21159_c3_g4_i3 sp|Q1I180|SCX1_TITDI Toxin Td1 OS=Tityusdiscrepans OX=57059 PE=1 SV=2
MKRFIVFVFLVLMG LLVESKDGYPMDKNSCVKCKTDDL NQYCYSICSELRTVYGNCLYRYLASCNSRD LSENA*

>TRINITY_DN21052_c1_g5_i1 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
MFKPMMIKRMQK K FANNKLLVLHKVVRVLTVDIPCSMNRIWNNIRPCPPYSAFRTLIDHASDQVNWNVGSQKHCFYRILHCR LCFSKL*

>TRINITY_DN20926_c2_g8_i3 sp|P58296|SCXB_CENNO Toxin Cn11 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MKMFIAFLSVLLLLGVESRDGYPVDEEGCKISCVINN KFCNSICHSRGAKYGYCYTGGLACYCEALPDNVKAWAYKTNTCGKK*

>TRINITY_DN20968_c2_g5_i2 sp|P56219|KAX42_TITSE Potassium channel toxin alpha-KTx 4.2 OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=1 SV=2
GLNRILFFKNMKGFGYILILLFCSMFSLSQQAVIIRVPMCKPAAPYPCGPLCKKKGFNNGKCVGGRSCECT*

>TRINITY_DN21137_c2_g7_i1 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MKFLLLLTFCLLLIVIKGGDTRDGYPIKSGCKYKCNLTGDNPRCTQVCKDAGSPYGYCYFYTCYCNVSKDAVLFGDSGTPWCTDLK*

>TRINITY_DN20806_c0_g1_i1 sp|Q11180|SCX1_TITDI Toxin Td1 OS=Tityusdiscrepans OX=57059 PE=1 SV=2
MKRFIVFVSCVLMLGLVVESKNGYPADKDGCPETCETNNLNLYCDNLCRRLKAKNGYCFLLLPACYCRDLPENVKLSVSGSRRRCPTIGK*

>TRINITY_DN20837_c1_g1_i4 sp|Q7Z1K5|SCX6_CENLI Toxin Cll6 OS=Centruroideslimpidus OX=6876 PE=2 SV=1
MTITIPVKTKAIFTLLCLAFSVTRSVIWEVITASNFTARFDCQKTIFSIHYSNQNKTQKSHQEGSLHCQRLSGSVENRNSLTSDSRNPVFTVVR

>TRINITY_DN20993_c2_g3_i2 sp|A0F0C2|SCXM1_MESMA Mesotoxin-1 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=3 SV=2
MKILTLFFVFISSLTVCTYSLDRFLEVNGTYVICLYVKNPFVDCKNLCTENMDAEDGFCRQPHCFCTDIASGRKVTSNREY*

>TRINITY_DN20527_c0_g5_i3 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
MKILILIMASLMIIIGVWSKDGYPMDHKGCKIPCVINNQCETECKIGLKGKKGICYAWKLACYCEGLPEHAKVWDKATNKCRA*

>TRINITY_DN21116_c0_g2_i2 sp|D9U2A0|SNAALYCMC Neurotoxin LmNaTx10 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
MNYFIMIFAATLLLEIEGKKDGYPADGSNCKYECWKNDYCDKLCCKDMKGESGYCYGWNLSWCWCTGLPDNARIKSDAKKCYPRG*

>TRINITY_DN18796_c0_g6_i3 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
KAILVISLILLVELKGGAEAKDGYAVDPHRCRYMCGSLGESEKCRNICKKRAGTSYGYCYAFFCYCESVSSKFAVWGDPTLGPCIADGKRSLE*

>TRINITY_DN21005_c1_g1_i10 sp|P01492|SCX1_CENSC Toxin CsEv1 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=3
NIVYIYSCVCIISTKEKNVLYVVRMFGFLFVICFFPRIMAMSASVLINNNNNNSGIQCKTL*

>TRINITY_DN20527_c0_g1_i1 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
GVWSKDGYPMDRSGCKIACVINNQYCETECKIVLKGKVGICYFWKLACYCEGLPEHVRVWDRATNKCRA*

>TRINITY_DN21052_c1_g6_i1 sp|D9U2A8|KA159_LYCMC Potassium channel toxin alpha-KTx 15.9 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=3 SV=1
MTNKIQQKFANNKLSVLHKVVRVLTVDMPCSMNRIWNNIESALSFVLCVSNIDRSASDPVNSNVGSQKHCFYRILQCATVLLQALKIHPISVVEFYLI*

>TRINITY_DN21052_c1_g2_i1 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
LLFKNMKAFYSILLILLFCSMFNLSQQTFIDVKCSSSTLCFSECQKRFGRAGQKCMNGGCKCYR*

>TRINITY_DN21052_c1_g1_i1 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
LKRFLFNMKAFYGILIIIFCSMFNLTSQQLIINYKCSSTSDCESPCKQAKGKVSVKCTNGRCFCYPVTS*

>TRINITY_DN21167_c0_g1_i7 sp|P01493|SCX2_CENSC Toxin CsEv2 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=2
MKTSLLIAFCLVLIGVAYAKDGYIANKATGCKYPCMNHGSCINECKSGPYKGSVGKCSVMYCYCMGMPESAPVHPIPGKPCFGK*

>TRINITY_DN21137_c2_g7_i2 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
RDGYPLASNGCKFGCSGLGENNPTCNHVCEKKAGSDYGYCYAWTCYCEHVAEGTVLWGDSTGTPCRS

>TRINITY_DN20492_c0_g1_i3 sp|C9X4K3|SCNA5_TITDI Toxin TdNa5 OS=Tityusdiscrepans OX=57059 PE=2 SV=1
MRYPALYLPPIFFVILPLALLSDLEETRNGFLDRKYCKIKCSLLGPNMCKKRCAASGANSYCKNYACFCKNVRKQVKIWDGDAVKCKL*

>TRINITY_DN20527_c0_g11_i1 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Csx9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
LVFNRFNFGELNNTKMKIFILIASLMIIGVWSKDGYPMDHKGCKIPCVINNKYCDTECRIVLKGKGTGYCYFLKLACYCEGLPGHVRVWERATNKCRA*

>TRINITY_DN20879_c0_g1_i7 sp|Q5G8B6|KAX45_TITCO Potassium channel toxin alpha-KTx 4.5 OS=Tityus costatus OX=309814 PE=1 SV=1
LKRFSLLFKNMKALYGILTILLFCSMLNLSHQTVIDVKCKSPRQCERPCDRFGPRTGSKS*

>TRINITY_DN17336_c0_g2_i1 sp|POC293|TX12_ANDCR Toxin Acra I-2 OS=Androctonuscrassicauda OX=122909 PE=1 SV=1
MVSIVSLFLIVAVSLFTFVNVEGAVVPGGYPVNFCTYPCYYGSDEIQCCQFCKMLKGGFGYCYLYTCYCERLPENVNQIKSQKTFGCTNGPWIDISTVSV*

>TRINITY_DN20735_c0_g6_i2 sp|P63019|SCX12_CENNO Alpha-toxin Cn12 OS=Centruroidesnoxius OX=6878 PE=1 SV=1
MKLFRSLTKGGDTRNGYPIRKSCKYECNQLGEEENPRCTQVCNDAGSTYGYCYFYTCYCKNVPKDTVLFGDSGTPWCMKMK*

>TRINITY_DN21150_c7_g1_i1 sp|Q5F1N4|KS4_MESMA Toxin BmTxKS4 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=3 SV=1
MKFSTLFLIFLMFSTILVIDANQRVKWHPMRIKGGGHASCSNTLKMVTQSDFCHKLCNGDGKTRLSKCVNNKCYCSSQLFPHVIEV*

>TRINITY_DN13898_c0_g2_i2 sp|L0GCW8|TXUE_UROYA Toxin-like protein 14 OS=Urodacusyaschenkoi OX=1273102 PE=2 SV=1
MAFVNKLYTCGICLCLLQVFLHAAILLTPQDVGPGPCIDKNGNKHQLKDVWTHDDTCERHKCVVIRGIRNIKTFKCGVIDVPEGCRMKGEGPYPQCCPDIEC*

>TRINITY_DN21052_c1_g2_i12 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
LLFKNMKAFYSILLILLFCSMFNLSQQTFINVKCSSSTLCFSECKKRFGRAGQKCMNNGGCKCYR*

>TRINITY_DN21159_c3_g4_i11 sp|Q1I180|SCX1_TITDI Toxin Td1 OS=Tityusdiscrepans OX=57059 PE=1 SV=2
MKRFIVFVFLVLIIGLLVESKDGYPMDKNNSCVKCKTDDLNQYCDTSLCRGLRTAYKNCFYRLKACNF*

>TRINITY_DN21052_c1_g3_i7 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
MKAFYGIILIFLCSMLNLSQQVLDLKKKSSSSQCYSPCKRAVGVAAGKCMNGRCTCYP*

>TRINITY_DN20512_c2_g1_i2 sp|R4GUQ3|KA281_ISOMC Neurotoxin alpha-KTx 28.1 OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=1 SV=1
MKLLLLLLILSIFIQTMIIQIMAFSCENHEDCTLLCYETIGTCDNGRCICVR*

>TRINITY_DN18159_c0_g1_i2 sp|POCI52|SNAU_LYCMC Neurotoxin LmNaTx30 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
MNYIILIFVITFLFLGVEGKKDGYPQDAERCFYKWRNAYCDKVCKDKKGGESGYCYALTLWCWCIGLPDNAVPEYASDCYRK*

>TRINITY_DN16899_c0_g1_i1 sp|P46066|SCXV_CENSC Alpha-toxin CsE5 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=1
MNPLFLVVLTCLLALGVESKKDGYPVDAGNCKYECLRDSYCADLCAKRKADSGEYLRFTFSCYCKGLPDNEPIKSGKCNALGGRKTPSE*

>TRINITY_DN20968_c2_g1_i4 sp|Q5G8B6|KAX45_TITCO Potassium channel toxin alpha-KTx 4.5 OS=Tityus costatus OX=309814 PE=1 SV=1
MQRIFRQGLNRILFFKNMKGFGYGIILLFCSMFSLSQILIDVTFCRPLVCIPMCKHKGFVFKCVKGGGLCECT*

>TRINITY_DN20879_c0_g1_i2 sp|Q5G8B6|KAX45_TITCO Potassium channel toxin alpha-KTx 4.5 OS=Tityus costatus OX=309814 PE=1 SV=1
MFAFDCIVLTKYLLVYIENHISNRNTCFESILPYVCAVLH

>TRINITY_DN20788_c0_g3_i4 sp|P69940|KBX1_TITSE Potassium channel toxin TsTXK-beta OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=1 SV=2
MFHAVTFVGRTELRLGRFVHHHLQDLPQLTFGHRQGQQLFLHVLLSDSTGCQRHHSQEEQKDSQFPFHFDVD*

>TRINITY_DN31816_c0_g1_i1 sp|Q5Q995|KTAP2_IXOSC Protein KRTCAP2 homolog OS=Ixodes scapularis OX=6945 PE=2 SV=1
LSYDIQRGSLYFNLFKMMAMSSGTSCLLSLSLFLVLLFAAMQVYRAHLVSSQFMTIVGGYLGSLLFILLTAVGNLETSLFGKTFQTKLFPEVVISMVIAMAASAFVHRVCITTCFLFSILALYYLNKISIKEV

>TRINITY_DN21216_c0_g2_i3 sp|P01492|SCX1_CENSC Toxin CsEv1 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=3
MCIMQACYGQLLNLIKLSAFIISHVYYCRAEAMVVVVGQVFMVKLFNENNANAESRIAKLCRFKYNAVE*

>TRINITY_DN20527_c0_g3_i1 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
PSKLRRQSKSMKILILIVASLMIIGVWSKDGYPMDRKGCKIACLINHKSCDTECRQVLKKGSGYCYTLGLACWCEGLPNHVRVWERATNKCRA*

>TRINITY_DN13456_c0_g1_i3 sp|B5KF99|KA11M_MESMA Potassiumchanneltoxin alpha-KTx J123 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=2 SV=1
MNKVYLVAILVLSVLLVANVSPVEGVPTGGCPLSDSLCAKHCKKNKFGKTGKCVGPNKGTCKCSV*

>TRINITY_DN20806_c0_g4_i1 sp|Q5G8A8|SCX38_TITCO Toxin-like TcoNTxP1 OS=Tityus costatus OX=309814 PE=1 SV=1
MKRFILFVCCMLMLMGIVVECKDGYPLDHRNCKVFLINFTTCNSICVRRKAKSGYCYTLGLACYCQGLPENTAVWDSANGRCKKNK*

>TRINITY_DN21052_c1_g3_i5 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
MKVEDTLRITSASSIHTFSCSYCSFTR*

>TRINITY_DN20739_c0_g2_i5 sp|POCI52|SNAU_LYCMC Neurotoxin LmNaTx30 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
LNVNYVIEINLYPGIAGIPTITPGLNRECPVWASRPSEEFDKSTCGQNELLDIDCGPVFLGFRSGEREGRISGGFEKLQVRMLETGRLRETVQEAEGQKRTVLQVERVVLLQRATG*

>TRINITY_DN21180_c2_g1_i9 sp|D9U2A5|SNA28_LYCMC Neurotoxin LmNaTx28 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
MRGQTIKTMKIFVLLFSLALAVFADKKSSRDGFVLVNGRPIICLLADNQDFNEFCELQCAQRGAEDGICCVGACYGVPSGQRILRHWFLEFICRYRNIKWREINSNIFVFFE*

>TRINITY_DN19621_c0_g1_i1 sp|L0GCW8|TXUE_UROYA Toxin-like protein 14 OS=Urodacusyaschenkoi OX=1273102 PE=2 SV=1
MKYLILVCLMSVLVAVNSYTARMTVPNVNGNCDINGHLVKSGDTTYDEEKCEELTCSASSHPISYNVLIDGTMEPIYDKKAYVEVLGCGIAHTEKDGGKCRIVKTTGIYPECCNGPILCE*

>TRINITY_DN20527_c0_g7_i3 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
MKILFVVIASLLIIGVWSKDGYPMDRKGCKIACLINHKSCDTECRQVLKKGSGYCYSWGGLACWCKGLPDDVPVWVWYAKNTRCS*

>TRINITY_DN20193_c0_g1_i3 sp|POC1B8|IKIT_PARTR Ikitoxin OS=Parabuthustransvaalicus OX=170972 PE=1 SV=1
MVCCKISLDFLEVRTCKIILYFYPISIPLLVITSWKMKWKSMPCADSNSKPPHGINPVNTQKTDISIILEKAIHSNVTSLTLQSIKSHVNITANRYFNILY*

>TRINITY_DN20512_c2_g1_i1 sp|Q95NJ8|KA171_MESMA Potassiumchanneltoxin alpha-KTx 17.1 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=1 SV=1
MCITISICCRVAKNWLTSIKTWLIGMFNWLTFILISYLNIMYKHVIYTCIMWSYLLKLS*

>TRINITY_DN20527_c0_g3_i2 sp|F1CGT6|SCX9_CENSU Beta-neurotoxin Css9 OS=Centruroidessuffusus OX=6880 PE=1 SV=1
MVETSMIYPIVEIQRITYIHETDNWINALHRYLWFYFVGVNGVTS*

>TRINITY_DN19553_c0_g1_i3 sp|A0A059UI21|KA263_MESGB Potassium channel toxin alpha-KTx 26.3 OS=Mesobuthus gibbosus OX=123226 PE=3 SV=1
MTFLHEILLIFLILSISMEFFSDSKVEAFRCRVEACIKNCQKNGHSSGQCRYSRCKCIDK*

>TRINITY_DN21052_c1_g2_i11 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
MLTWIQFLLFSNRNRSRPLSHDQFNESQKRERKCRKSLVSIFVRSQIKFVRKFHPLTSAQSQPESYVCLVFFRTFMYTGGQIKLLGGKMWTNIGKTNGINFFDKTQLGCANFKNLETQCNHS*

>TRINITY_DN20993_c2_g3_i1 sp|A0FOC2|SCXM1_MESMA Mesotoxin-1 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=3 SV=2
MKILTLFFVFISSLTVCTYSLDRFLEVNGTYVICLYVNKPFVDCKNLCTENMDAEDGFCRQPHCFCTDIASGRKVTNSREY*

>TRINITY_DN2627_c0_g1_i1 sp|B8XH30|KA23K_BUTOS Potassium channel toxin alpha-KTx Tx308 OS=Buthusoccitanusisraelis OX=539894 PE=2 SV=1
MKRIVLVVLLLSLLHFDNQVEGRTAQRCIESDCKEKCKAKGRDGRCKVDFEMGLVYHYCECS*

>TRINITY_DN20806_c0_g6_i1 sp|Q5G8A8|SCX38_TITCO Toxin-like TcoNTxP1 OS=Tityus costatus OX=309814 PE=1 SV=1
MKRFIVFVSLVLMGLAVESKNGYPVKNKGCTLS CATSHPCFNHFCRGIKAKSGHCDIIRSTCYCRGLPENVKVSDPITGNRRGKNGK*

>TRINITY_DN17336_c0_g2_i2 sp|POC293|TX12_ANDCR Toxin Acra I-2 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=1 SV=1
MLKGGFGYCYLYTCYERLPENVNQIKSQKTFGCTNGPWDISTVSV*

>TRINITY_DN19553_c0_g1_i2 sp|A0A059UI21|KA263_MESGB Potassium channel toxin alpha-KTx 26.3 OS=Mesobuthus gibbosus OX=123226 PE=3 SV=1
MYSSENRNKNKPLKYFRFNYGFRSCKSNNGFFGFRFGYGSNPWYLHTKTYV*

>TRINITY_DN13456_c0_g1_i1 sp|B5KF99|KA11M_MESMA Potassium channel toxin alpha-KTx J123 OS=Mesobuthus martensii OX=34649 PE=2 SV=1

>TRINITY_DN15625_c0_g1_i4 sp|POC293|TX12_ANDCR Toxin Acra I-2 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=1 SV=1
GDGSFLLFAVFSFHLFNCSIRKFKISKIFYMKMAIFKYFCFMLLFSLVWGGFYPAESGEFYICGQDGNKVDCQEICSSQGMIFGYCHWFKCFCE*
LTKTLFTETLEPMTVTKYHPLTTADFLTVHFITILSTYIKLSTFSFWIETTPN*
QEMALFFCLLFLAFIFLIAYPENSKYPKYFI*

>TRINITY_DN21052_c1_g2_i7 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
MVGIEKRLECM LAREHDLFLDQ TQRARFVSAVCFRIYVCSLNLKMI*
MSNKNGIPTIFLYSQLYFSCSLMSAFLDIAIHYYIIFRLIKEHT*
MLLMSLKKVKRNLIMLTTTLKIIPYGNRREKTRMHVSQGT*
MRTKFKAFFTNVPIFNFKEVLLPENLCHKVLNIVAIGL*
MFKTLWHKFSGSKTSLKLGTLVKNALNFVLISV*
MAKAKTETLFIIGYVGKLLIEILLKICTTFIYA*

>TRINITY_DN21052_c0_g1_i1 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
IKLQLYSFYIITNFLFLDLNRILLFKNMKAFYGILILLFCSMFSLSQQTFINEKCSSSSQCYPACKKALGTTRGKCMNGGCK
ICNRHSCTFLELFLMLFYMLGNIETMRSISHL*

>TRINITY_DN21180_c2_g1_i2 sp|D9U2A5|SNA28_LYCMC Neurotoxin LmNaTx28 OS=Lychasmucronatus OX=172552 PE=2 SV=1
MIGLPFTKTNP SLEDFLSAKTFLYYISTLFFTGKSLMPFIWFSKIENNINLMFYTLQFLFLKYV*

>TRINITY_DN25156_c0_g1_i1 sp|PODL62|KA311_BUTOC Potassium channel toxin alpha-KTx 31.1 OS=Buthus occitanus tunicatus OX=6871 PE=1 SV=1
QFCNMIVLRIVFPMSLLVSVFVENEVMATSSHKSCSNTGVCMHSCSHIVREEKNDHNCPNLEVCCTLI*
YIKIILSIEVRRIRLEYSTPLDWDNCDHSSLL*

>TRINITY_DN25275_c0_g1_i1 sp|POC175|KEX12_TITSE Potassium channel toxin epsilon-KTx 1.2 OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=1 SV=1
SVRDTSLSRIYILHFLDWCNVCHNICTYHYCIFLVLYIFFGNRYMQLPLENRRRMLSLHLKQIELRGFYRIASSFTH*
MKQFCRILLVLFVLSAMIASFSDSQVEAACSGCQKICKGPGKCNNGRCKCYGKRYTNQESEEYK*
LQFVIHRYVLFIFFTFLIGVTFAITFAPTIIAFSWSFTYFLATATCSFHLRIGEGCYHCT*

>TRINITY_DN24431_c0_g1_i1 sp|P59865|SCX7_CENLI Toxin CII7 OS=Centruroides limpidus OX=6876 PE=2 SV=1
SGSVIMFKSLLIFAALLLTVINVDALEDGYPVNEENGCTYPCYHTENNEKLCQKRCGDLGAVYGYCYGFICKCELLPEHVPHVTSISSSGCTTG

>TRINITY_DN10246_c0_g1_i1 sp|LOGCW8|TXUE_UROYA Toxin-like protein 14 OS=Urodacusyaschenkoi OX=1273102 PE=2 SV=1
MAFVTKLYTCIICILLVQFLYAAILQTPQEVGPGPCTDKNGIKRKLKEIWLDNERCEKHRCVMVRGIRNIKYKCTVIDNPEGCKIIRKREGPYPRCCPDIEC*
MHITYISTTYFIFICRLRNWKNFLKISTPDGDRALAFDIRTASRIRPLPFYNFASFGIIDNRTFISFYISNSSYHNTSVFLASFVIQPNLF*
MCIYTSDFIKIRCTYAYYIYKHDLHIHMQIEELEKFFKNFHTRWRQVSIRYPDSIEDKAPPFL*
MQNYKKGGALSSMLSGYRMLTCRHLVWKFLKNFSSSSICI*
EMMIKNKGTIYIHIHTNTTWNITEPFECISRGFY*
>TRINITY_DN13456_c0_g1_i2 sp|B5KF99|KA11M_MESMA Potassiumchanneltoxin alpha-KTx J123 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=2 SV=1
>TRINITY_DN20806_c0_g6_i2 sp|P58779|SCX5_CENSC Alpha-like toxin CsEv5 OS=Centruroidessculpturatus OX=218467 PE=1 SV=1
MDDWSRKTVCSESRGIHFYFLPLIMKFVPQKPLKFPFKSFRDIFISILKE*
KCLYGGKRTASSLILIRELRENDPEDEEIHCVCLLSRVNG*
MRFEILLHFHSFRIEMKMSRKDLKGNFNGFCGTNFMISGRK*
>TRINITY_DN21156_c1_g8_i1 sp|PODM29|CLCPP_TITSE Intracellularcalciumchannelmodulator CCP-Ts OS=Tityusserrulatus OX=6887 PE=1 SV=1
SVFLNFVMNLAYIFVLGVLLASGVCSFAKISDEGARCNRLLGQGCNSDGDCCYGERCLSSGSEYVCQTDPGP*
MRLMQINTLDYTNLRNLPHLYSISLLYDGVGMFLLDNQYITHRWIF*
MKLSTNGASYVNLNLMYLFASSTCKRRVSCIKFKQNKI*
MENDASAVEVNMSAKRIQARETHFSYTTNCTNGICVLN*
ERRITTYKVDLKYPTMRDILVIQQKHSNPVV
>TRINITY_DN14006_c0_g1_i1 sp|PODPT4|KAX47_TITST Potassium channel toxin alpha-KTx 4.7 OS=Tityus stigmurus OX=50344 PE=1 SV=1
TLFSLFRNMRIYFGLIVYVFCISLSEQVFINQNCKISSQCLSPCRREISPATGKCKINGRCNCYP*
>TRINITY_DN13098_c0_g1_i1 sp|Q9BKJ1|SCN2_MESMA Anti-neuroexcitationpeptide 2 OS=Mesobuthusmartensii OX=34649 PE=1 SV=1
TIRTMFKILILAALLTFSEIEVDALVNGYPVSKNKCIYPLRQDNNREKKCWNRCTYLGATTGYCNNFVFCYCEGLPVDARKINSITDSPCTTSGN*
MVIPSARINVYIRVFAKTITERRNVGTDAIH*
>TRINITY_DN15203_c0_g2_i1 sp|Q66S13|NATT4_THANI Natterin-4 OS=Thalassophryne nattereri OX=289382 PE=2 SV=1
MAYCGPTHYRRIA EWVWPASNGHIPPCAVQGGYDVSDTLYVARAHNGDNIPGKLVPSHGCCYVPWGGEEHRHHDYQVLCNPEGIQLEWRFTSGGDIPPGAVQGGMTADGEPLYIGRHEHD*
MVSSSNIKSVANIITTLNGTRRDVTVAGWHPFCDSSVVSSTICHGIESK*
MDAVTFLGAVKNIDITTRCYATPKEFNWNGDLLVVVTSLLALFKEA*
MEYTFRLLEESIPILTTKCLSVNLLYFEKLFKSYCY*
>TRINITY_DN16187_c0_g1_i2 sp|A0A0F7Z3J2|CTHA2_CONVC Thyrostimulin alpha-2 subunit OS=Conusvictoriae OX=319920 PE=1 SV=1
MWFSLTCCMVLFGHVMGGNVWDNPGCSRVGHTRNISIPDCVEFQVSTNACRGYCVSFSVPSPEGTIKANPNQMLTSYAKCCNIMETEDVRVQVLCGLDLVFKSATKCSFCQCLKY*
MSGIIQDALVSVTREISAFIVSSFKCQQMPVEDIVFRSRSHLQKELLKPIIKC*
>TRINITY_DN5996_c0_g1_i1 sp|PODMZ0|GIG5_ANEVI U-actitoxin-Avd12b (Fragment) OS=Anemoniaviridis OX=51769 PE=2 SV=1
PSPPPARRPPPCPTREKSARGPTTASTE EPASTSGPSANSPVTAPTDRARGAKAKTSRRWQPRPRCRWTWTRPPECCRPTGVNRSRVLSDGRRRTRPDFRPENSGEKSLLVVCRPRYFRGRSP

MFKKRRGGRRRRRVKDRKISSSLIRVFFFGRSATRRSSAEREEATSAVWPSSVGKKSIVKTRARACVYVYTRVCTRKVTRRKTNDPTKYCSRRETSVLRSSVDGAACEEELLSNK*
LASPGTPPTTLPEEGEECQRTNYCLNGGTCIYFRSIGELSCHCADGYKGRKCESKDVSVAAPKVSVDLDETRVLQTYWGK*
PRLPRHAAHHPALRGRRVPEDQLLPQRRNLHLLPVHRRRTLLSLRRRIQGQEVKQRRLAGGSRAQGVGGPGRDHQSAADLLG*
MIQKWGNAPETVLGSRKETIGRTTGRKRGRRRRLAAIFVTSGRPSHLVRVEIGPESNADDKRRPKTFLPSFPV*
SGGGRIKKGTSVCLQCLLFESENRLHKYVQNVQKKDENLLTTHRLVRCINQSIHREPFRLRQ*
IGGGKNKEGDELRSMPFIVRVGKPRFTQICTKCTKERREPFDDAPTGSMHQPVDTS*
MHRTSRCVVKRFSSFFCTFCTYLCKTRFSDSNKHWRTQLVPPFILPPPD
MILQNIIVVEKRASFDLPSTALRARKNFSPINRVKGTTLVLRIS*
MYRLVDASNQSVRRQKVLVFLLYILYIFV*
>TRINITY_DN18489_c0_g1_i3 sp|Q5Y4U4|TX20A_AGEOR U8-agatoxin-Ao1a OS=Agelenaorientalis OX=293813 PE=2 SV=1
MNLSSLLILGVCLLSSKLSLAYYESVNSVEGNNDLSEDVRIIKRSCIRRGGSCDRKPNECCYSSACRCNLWGTNCRCSRIG*
RLPVASSDCASVFIYQRRVQKNKYFIYHPTSPSSFSREGKFSKYALSENCHRRKHESLFIVNSGSLIVFIEIKFGIL*
MRPDDFFDRSKNEFLSSIIIFYYSDSLFPTSCNDKLMNNSIHLVFCRKNLHVGYFSFL*
FIKSDTISFRISVLIRNTNFITCISGLSYLLLTKKKSKFGSRNKFLSNEA*

IV- Outros trabalhos publicados durante o período do doutorado

Artigos:

DUENAS-CUELLAR, R. A. ; SANTANA, C. J. C. ; **MAGALHÃES, A. C. M.** ; PIRES, O.R. JR ; FONTES, W. ; CASTRO, M. S. . Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy..Toxins **JCR**, v. 12, p. 1-18, 2020.

CORREIA DE SANTANA, CARLOS ; **MAGALHÃES, A. C. M.** ; PRIAS-MARQUEZ, C. A. ; FALICO, D. A. ; SANTOS JUNIOR, A. C. M. ; LIMA, B. D. ; RICART, C. A. O. ; PILGER, D. R. B. ; BONOTTO, R. M. ; MORAES, C. B. ; FREITAS-JUNIOR, L. H. ; ALVARES, A. C. M. ; FREITAS, S. M. ; LUZ, I. S. ; Pires Jr O.R. ; FONTES, W. ; CASTRO, M. S. . Biological Properties of a Novel Multifunctional Host Defense Peptide from the Skin Secretion of the Chaco Tree Frog, Boanaraniceps. BIOMOLECULES **JCR**, v. 10, p. 790-808, 2020.

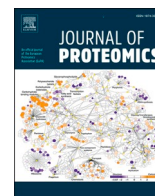
SANTANA, CARLOS JOSÉ CORREIA ; **MAGALHÃES, ANA CAROLINA MARTINS** ; DOS SANTOS JÚNIOR, AGENOR C. M. ; RICART, CARLOS ANDRÉ ORNELAS ; LIMA, BEATRIZ D. ; ÁLVARES, ALICE DA CUNHA MORALES ; FREITAS, SONIA MARIA DE ; PIRES, OSMINDO RODRIGUES ; FONTES, WAGNER ; CASTRO, MARIANA S. . Figainin 1, a Novel Amphibian Skin Peptide with Antimicrobial and Antiproliferative Properties. ANTIBIOTICS-BASEL, v. 9, p. 625, 2020.

RODRIGUES PIRES JÚNIOR, OSMINDO ; DE OLIVEIRA, NATIELA ; BOSQUE, RENAN ; NICE FERREIRA, MARIA ; MORAIS AURÉLIO DA SILVA, VERONICA ; **MARTINS MAGALHÃES, ANA** ; CORREIA DE SANTANA, CARLOS ; DE SOUZA CASTRO, MARIANA . Histopathological Evaluation of the Exposure by Cyanobacteria Cultive Containing [d-Leu1]Microcystin-LR on Lithobatescatesbeianus Tadpoles. Toxins **JCR**, v. 10, p. 318, 2018.

Capítulo de livro:

Pires Jr O.R. ; **MAGALHÃES, A. C. M.** ; SANTANA, C. J. C. ; CASTRO, M. S. . Peptídeos bioativos de organismos marinhos: um enfoque antimicrobiano, antitumoral e antiviral. In: Fabiano Thompson; Cristiane Thompson. (Org.). Biotecnologia Marinha. 1ed.: , 2020, v. , p. 67-86.

V- Artigo publicado relacionado à tese



Exploring the biological activities and proteome of Brazilian scorpion *Rhopalurus agamemnon* venom

Ana Carolina Martins Magalhães^{a,*}, Carlos José Correia de Santana^{a,b}, Rafael D. Melani^c, Gilberto B. Domont^c, Mariana S. Castro^{a,b}, Wagner Fontes^b, Peter Roepstorff^d, Osmino Rodrigues Pires Júnior^a

^a Toxinology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

^b Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology/IB, University of Brasilia, Brasilia-DF 70910-900, Brazil

^c Proteomic Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense M 5230, Denmark

ABSTRACT

Scorpion venoms are formed by toxins harmful to various organisms, including humans. Several techniques have been developed to understand the role of proteins in animal venoms, including proteomics approach. *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) is the largest scorpion in the Buthidae family in the Brazilian Cerrado, measuring up to 110 mm in total length. The accident with *R. agamemnon* is painful and causes some systemic reactions, but the specie's venom remains uninvestigated. We explore the venom protein composition using a proteomic and a biological-directed approach identifying 230 protein compounds including enzymes like Hyaluronidase, metalloproteinase, L-amino acid oxidase and amylase, the last two are first reported for scorpion venoms. Some of those new reports are important to demonstrate how distant we are from a total comprehension of the diversity about venoms in general, due to their diversity in composition and function. **Biological significance:** In this study, we explored the composition of venom proteins from the scorpion *Rhopalurus agamemnon*. We identified 230 proteins from the venom including new enzyme reports. These data highlight the unique diversity of the venom proteins from the scorpion *R. agamemnon*, provide insights into new mechanisms of envenomation and enlarge the protein database of scorpion venoms. The discovery of new proteins provides a new scenario for the development of new drugs and suggests molecular targets to venom components.

1. Introduction

Scorpionic accidents are directly related to the neurotoxins present in these venoms. These components are considered the most important due to their central role in the process of intoxication after envenomation, and are the best-characterized venom components, both biochemically and functionally (Cid Uribe et al., 2017 [1]). But there are still other protein components present that have a relevant role in envenoming and also a therapeutic potential such as enzymes, host-defense peptides and protease inhibitors.

Several techniques have been developed to understand the role of proteins in animal venoms (Bringans et al., 2008 [2]). The proteome, considered as the complement of a genome for a specific condition and time, including the post-translational modifications, is a relevant target for the aforementioned techniques (Wilkins et al., 1996 [3]).

One of the major benefits of proteomics is to provide a broad description of the proteins present in a small amount of venom sample, contributing to a deeper comprehension of the nature of venom's toxic

effects. Information about the toxins can be used in several ways: for example, as molecular tools for studying physiological processes (Chaim et al., n.d. [4]), or for the development of therapeutic protocols (Utkin, 2015 [5]). Venom proteomes also represent great potential for clinical diagnosis and development of new medicines for clinical use.

R. agamemnon (Koch, 1839) is the largest scorpion in the Buthidae family at Brazilian Cerrado, measuring up to 110 mm in total length. It is yellowish brown in color, with yellowish paws and almost black terminal segments of the metasoma. The species occurs in Brazil's Cerrado areas at states of Goiás, Bahia, Piauí, Pernambuco, and Tocantins (Brandão and Franço, 2010 [6]).

Some cases of accidents with *R. agamemnon* have been reported: two of them in Piauí and another one in Bahia (Brazil). The reported cases refer to a 54 year old woman, an 18 year old man (Carvalho et al., 2007 [7]), and a 37 year old man (Brandão and Franço, 2010 [6]). The patients had severe local pain, agitation, hyper salivation, tachycardia, blurred vision, tearing, muscle spasms, and hypotension. The second case had severe local pain, drooling, drowsiness, and irradiated pain in

* Corresponding author.

E-mail address: aninha@aluno.unb.br (A.C.M. Magalhães).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104119>

Received 20 October 2020; Received in revised form 19 December 2020; Accepted 19 January 2021

Available online 1 February 2021

1874-3919/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

the right shoulder. The third case had no pain, only local itching and paraesthesia throughout the body, tremors and tongue desensitization. This condition persisted for 24 h and reversed spontaneously. Although there are no reports of death caused by the accident with *R. agamemnon*, the accident is considered moderate (Brandão and Françoso, 2010 [6]).

This paper aims to fully characterize *R. agamemnon* venom using two different approaches as total venom proteomics, and enzymatically/biologically targeted compounds to identify which are the most abundant compounds and suggest which ones are related to the envenoming symptoms.

2. Materials and methods

2.1. Venom source

Rhopalurus agamemnon (Fig. S1) scorpions were collected in the municipality of Monte Alegre de Goiás, located in central Brazil, under the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) permit 51,771 and the Genetic Heritage Management Council protocol A826A3A. Scorpions were kept alive in individual containers with food and water *ad libitum* at Laboratory of Toxicology bioterium. The specimens were milked by electrical stimulation (300 Hz, 50-100 V). Just after extraction, venom was diluted using deionized water and centrifuged at 10,000 ×g for 10 min. at 4 °C. The supernatant was freeze-dried and stored at -20 °C. *Bothrops moojeni*(Bm) and *Crotalus durissus terrificus*(Cd) venoms were generously donated by the Pontifical Catholic University of Goiás Serpentarium.

2.2. Enzymatic activity

2.2.1. Zymogram (casein, gelatin and hyaluronic acid)

In gel proteolytic activities were tested on 12% SDS-PAGE according with Laemmli, 1970 [8] containing 1% Gelatin, Casein or Hyaluronic acid as substrates. The venom was diluted in loading buffer, under non-reducing conditions (Precision Plus Protein™ Dual color Standards ladder - BioRad) and electrophoresis using 15 mA of constant current at 4 °C for ~120 min. After the electrophoretic migration, the gels were incubated 2 times in 2.5% Triton X-100 for 20 min., then incubated at 37 °C with 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 5 mM MgCl₂ pH 7.4 for Gelatin; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.5 mM CaCl₂ pH 7.4 for Casein; and 20 mM Tris-HCl, and 0.5 mM CaCl₂ pH 7.4 for Hyaluronidase zymography activity. The gels were stained by Coomassie Brilliant Blue G250 for 20 h [9], using as staining solution: Coomassie brilliant blue 0.1% (w/v), Methanol 40% (v/v) and Glacial acetic acid 10% (v/v); Destain solution: Methanol 40% (v/v) and Glacial acetic acid 10% (v/v). For Gelatin zymography positive control was bovine Trypsin (Gibco - Thermo Scientific).

2.2.2. L- amino acid oxidase (LAAO - EC 1.4.3.2)

LAAO activity was measured according to Yu et al. [10] with adjustments. The assay was carried out by adding 40 µg of *R. agamemnon* venom in 90 µL of 30 µM of each different L-amino acid (L-leucine, L-histidine, L-phenylalanine, L-cysteine or L-tryptophan - Sigma Aldrich). The reactions were incubated at 37 °C for 30 min and 400 µL of Prussian blue solution (1 g/L of FeCl₃.6H₂O (solution A), 1 g/L of K₃[Fe^{III}(CN)₆] (solution B); solutions A and B are mixed at the time of use) was added to evaluate the presence of H₂O₂. After 5 min, the absorbance at 620 nm was measured in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). Bm venom (40 µg), Cd venom (40 µg) and a commercial L-amino acid oxidase, purified from *Bothrops atrox* venom, (40 µg - Sigma Aldrich) were used, the last one as positive control. The results are expressed as $\text{Abs}_{\text{Ra}} 620 \text{ nm} * 100 / \text{Abs}_{\text{LAAO}620 \text{ nm}}$, mean ± SD.

The L-amino acid oxidase assay was also performed without amino acids to certify the presence of peroxidase in *R. agamemnon* venom and avoid a false positive result.

2.2.3. Amylolytic activity (EC 3.2.1.1)

The amylolytic activity was performed according to Miller, 1959 [11]. Soluble corn starch (Connaught laboratories ltd - 1% w/v) in 200 mM NaH₂PO₄ with 6.7 mM NaCl, pH 6.9 buffer was used as substrate. The reaction was performed by mixing the 1:1 of corn starch solution and *R. agamemnon* venom (1 mg/mL). The mixture was incubated at 25 °C for 3 min, the reaction was stopped with the addition of DNS (dinitrosalicylic acid 5 mg final concentration) and boiled for 5 min at 100 °C. After cooling, the absorbance was measured in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific) at 540 nm. As positive control of enzymatic activity, 50 µL of human saliva centrifuged at 10,000 ×g for 10 min. Was used; for negative control the reaction was performed replacing the enzyme for 50 µL of 200 mM NaH₂PO₄ with 6.7 mM NaCl, pH 6.9 buffer. Maltose was used to perform a standard curve (0–2 mg/mL) to quantify the reaction product releasing after 3 min. The results were expressed in units of enzymatic activity:

$$Ea = \frac{OD(test) \times [\text{maltose } (\mu\text{M}) \times ED]}{OD(\text{maltose}) \times t}$$

Where: Ea = enzymatic activity, OD = optical density, [] = concentration, ED = enzyme dilution factor, and t = time of reaction.

The amylase zymogram activity was performed according to Upadhyay, 2005 [12]. The separating gel was made at 8% acrylamide and the starch concentration was 0.2 mg/mL. The applied voltage was 150 V at 4 °C (Precision Plus Protein™ Dual color Standards ladder - BioRad). After the electrophoretic migration, the gel was washed twice with a 2% Triton X-100 solution for 30 min, washed with 50 mM Tris-HCl, pH 5.5 for 5 min, and incubated in 50 mM Tris-HCl, 6 mM CaCl₂, 0.4 mM NaCl, 3 mM NaN₃, pH 5.5 for 24 h. The gel was stained with Lugol's iodine solution for 24 h (8 mM Iodine and 602 mM potassium iodide in water) at room temperature.

2.2.4. Phospholipase activity (EC 3.1.1.4)

Phospholipase activity assay followed the protocol proposed by Mackay et al., 1997 [13]. Aliquots of 1 mL of 3 mM phosphatidylcholine (Sigma Aldrich) in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 were used as substrate. The substrate was solubilized in 1.0 mL of chloroform, dried by hot air jet, and dissolved/ultrasonicated in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer to form an emulsion. *R. agamemnon* venom (20 µg) was reconstituted in 100 mM Tris-HCl, 10 mM calcium chloride and subsequently incubated with phosphatidylcholine at 37 °C for 20 min. After 60 min, turbidity evaluation was performed at 405 nm in Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). *Bothrops moojeni* venom (20 µg) solubilized in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0 was used as phospholipase positive control [14]. The negative control was run with substrate and buffer only. The phospholipase activity was the absorbance measured after 20 min, assuming that the positive control had 100% of substrate consumption.

2.3. Protease inhibition assays

2.3.1. Trypsin (EC 3.4.21.4)

Trypsin inhibition assay was performed in triplicate according to Erlanger et al. [15], using the chromogenic substrate N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA -Sigma Aldrich). Briefly, *R. agamemnon* venom (40 µg) were dissolved in 40 µL of 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂ buffer (pH 8.2) and incubated with 2.5 µg of bovine Trypsin (Gibco - Thermo Scientific), at 25 °C for 15 min. Subsequently, 86 µg of BAPNA were added and incubated for 30 min. The digestion was stopped by adding 30 µL of 30% acetic acid. Controls were run without enzyme (negative control) and without *R. agamemnon* venom (positive control). The relative enzymatic activity was evaluated spectrophotometrically at 405 nm measuring the release of p-nitroaniline after Trypsin activity, using a Multiskan FC (Thermo Scientific) microplate reader. The values were calculated assuming that the absorbance is 100% of Trypsin activity in inhibitor absent.

2.3.2. Chymotrypsin (EC 2.4.21.1)

Chymotrypsin inhibition valuation was performed in triplicate according to Erlanger et al. [15], using the chromogenic substrate N-glutaryl-L-phenylalanine p-nitroanilide (GPNA - Sigma Aldrich). Shortly, *R. agamemnon* venom (40 µg) were dissolved in 40 µL of 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂ buffer (pH 7.6) and incubated with 32 µg of α-Chymotrypsin from bovine pancreas (Sigma Aldrich) at 25 °C for 15 min. After that, 80 µg of GPNA was added and after 30 min, 30 µL of 30% acetic acid was added in order to stop the reaction. Controls were run without enzyme (negative control) and without venom (positive control). The relative enzymatic activities were evaluated by the liberation of p-nitroanilide which was measured at 405 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). The inhibition percentage values were calculated assuming the absorbance of Trypsin activity in inhibitorabsent.

2.3.3. Elastase (EC 3.4.21.36)

Elastase inhibition assay was determined in triplicate according to Bieth et al., 1974 [16]. Briefly, *R. agamemnon* venom (40 µg) were dissolved in buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.5 were incubated with 16 µg Elastase from porcine pancreas (Sigma Aldrich), at 25 °C for 15 min. After that, 144 µg of N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide SAAVNA (Sigma Aldrich) in 50 mM Tris-HCl, (pH 8.5) was added. After 30 min 30 µL of 30% acetic acid was added to stop the reaction. The relative enzymatic activities were evaluated by the liberation of p-nitroanilide which was measured at 405 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). Controls were run as 100% inhibition (without enzyme) and 100% enzyme activity (without inhibitor).

2.4. Sntimicrobial and cell viability assays

2.4.1. Antibacterial and antifungal assay

Antibacterial and antifungal activities were performed according to Castro, et al. 2009 [17]. Stock cultures of bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) were grown in Mueller Hinton (MH) broth and *Candida albicans* (ATCC 14053) was grown in Brain-Heart infusion (BHI) liquid medium for 24 h at 37 °C under agitation. When the OD 590 nm = 1.0 was reached, the suspensions were diluted in fresh broth - 1:50 for Gram-negative and 1:100 for Gram-positive bacteria and yeast. The microorganisms were tested in the presence of *R. agamemnon* venom ranging from 200 to 0.3 µg/mL final concentration. Ofloxacin 400 mg/mL was used as positive control for bacteria and 0.4% formaldehyde for yeast; for negative control 50 µL fresh broth was used. The results were obtained by optical density at 595 nm after 24 h of incubation at 37 °C using a in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). The results are presented as mean ± SD and the significance was calculated using GraphPad Prism version 5.04 software. Results were considered significantly when $p < 0.01$ in t -test compared with the negative control.

2.4.2. Cell viability assay

Mammary adenocarcinoma (MCF7 - ATCC HTB-22), mammary glandular epithelium (MCF10A - CRL 10317) and murine melanoma (B16F10 - ATCC CRL 6475) cells were grown in 75 cm² culture flasks containing Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) with 1% antibiotic (streptomycin and penicillin) enriched with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ until confluent. Cell viability was evaluated by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) method [18], after 24 h of incubation with *R. agamemnon* venom with concentrations ranging from 300 to 2.34 µg/mL. The spectrophotometric analysis was performed in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific) at 590 nm and Doxorubicin (1 µg/mL) was used as positive control, and fresh culture medium was used as negative control. The cell viability and IC50 were calculated using a non-linear regression analysis on GraphPad Prism version 5.04.

2.4.3. Haemolysis assay

The present method was based on Onuma et al. 2009 [19]. Murine erythrocytes were collected in heparin tubes after puncture, separated from plasma by centrifugation (426 xg for 3 min. at 25 °C) and washed three times with saline buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 10 mM CaCl₂, pH 7.4). After washing, a solution of 1% erythrocytes in saline buffer was prepared and 150 µL were incubated with 150 µL of *R. agamemnon* venom with concentrations ranging from 2000 to 0.9 µg/mL for 1 h at room temperature. After treatment the cells were centrifuged (500 xg for 3 min.) and supernatant optical density was measured at 405 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA); Triton X-100 1% was used as haemolysis control and 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 10 mM CaCl₂, pH 7.4 buffer was used as negative control. The absolute haemolysis values were calculated using the formula:

$$\text{Haemolysis} = \frac{\text{Abs}_{405} \text{ Ra venom} - \text{Abs}_{405} \text{ negative control}}{\text{Abs}_{405} \text{ positive control} - \text{Abs}_{405} \text{ negative control}} \times 100$$

2.4.4. Statistics

Statistical analyses were performed using the Student's t -test. Results are presented as the mean ± standard deviation. The data were analyzed in triplicate, using Graph Pad Prism software, version 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

2.5. Proteomics

2.5.1. Protein digestion

R. agamemnon venom (100 µg) were dissolved in 20 µL of 50 mM Tris-HCl, 8 M urea and 2 M thiourea pH 7.6 and proteins were reduced using 100 mM 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) incubated at 30 °C for 60 min. After cooling to room temperature, cysteine residues were carbamidomethylated with 40 mM iodoacetamide (IAA) for 30 min. in the dark at room temperature. Sample was diluted to 1 M urea with 50 mM Tris-HCl pH 8.5 and MS grade Trypsin (Promega) was added 1:50 trypsin/proteins for overnight digestion at 37 °C. Proteolysis was stopped by adding formic acid (FA) to a 1% final concentration (v/v). Peptides were desalted in C18 Micro Spin Columns (Harvard Apparatus) following manufacturer's instructions and dried out in a vacuum concentrator.

2.5.2. LC-MS/MS

Peptides were dissolved in 0.5% FA and fractionated using a nano HPLC Easy-nLC II (Proxeon) equipped with an in-house packed 2 cm × 150 µm pre-column (Reposil-Pur C18-AQ, 5 µm, 120 Å, Dr. Maisch) and a 20 cm × 75 µm analytical column (Reposil-Pur C18-AQ, 3 µm, 120 Å, Dr. Maisch). Separation was performed at 200 nL/min. With 5% ACN and 0.1% FA as buffer A and 95% ACN, and 0.1% FA as buffer B. The column was equilibrated with buffer A and performed a gradient of 180 min (5–35% B over 160 min, 35–95% B in 8 min and 95% B for 12 min). LC was online with an LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) controlled through the Xcalibur data system and operated in data-dependent acquisition (DDA) mode. The method consisted of one full MS spectrum (range 350–1800 m/z , resolution of 60,000 at 400 m/z , 10 ms accumulation time, 1×10^6 ions AGC) followed by Top 10HCD (NCE 30) fragmentation spectra from the most intense peaks (isolation window 2.5 m/z , range 350–1800 m/z , resolution of 60,000, 10 ms accumulation time, 5×10^5 ions AGC). Dynamic exclusion was enabled with duration of 30 s, an exclusion list size of 500 precursors and unassigned and charge 1 peaks were rejected.

2.5.3. Data analysis

A FASTA database of the Buthidae protein databank in NCBI (41146 entries on 02/2019), was used to perform the proteins identification (Peaks Studio 7.0 - Bioinformatics Solutions Inc. software). Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification, and oxidation,

methylation, hexose and amidation were used as dynamic modifications. Peptides formed by trypsin digestion were searched. Minimum peptide length to be used was set to 6 residues. Precursor mass tolerance was set to 15 ppm, and fragment mass tolerance to 0.5 Da. A false discovery rate (FDR) of 1% was set as a threshold for peptide identifications. Data are available via ProteomeXchange with [PXD020465](https://www.ebi.ac.uk/psd/entry/PXD020465).

3. Results

3.1. Enzymatic activity

R. agamemnon venom revealed the absence of proteolytic activity in gelatin substrate (Fig. 1A), however showed a proteolytic activity on casein substrate revealing a small digested band around 23 kDa for non-reduced venom (Fig. 1B).

Hyaluronidase zymography of *R. agamemnon* venom also revealed activity in a digested band around 45 kDa as expected for this enzyme (Fig. 1C).

3.1.1. L-Amino acid oxidase activity (LAAO)

Fig. 2A confirms the *R. agamemnon* venom LAAO activity by released oxygen peroxide according to the Prussian blue method. The L-amino acid oxidase assay was also performed in the substrate absence to certify the presence of peroxidase in *R. agamemnon* venom (data not shown). *R. agamemnon* venom's LAAO degraded preferentially aromatic amino acids, as L-phenylalanine and L-tryptophan (Fig. 2B).

3.1.2. Amylolytic activity

The amylolytic activity was evaluated using two methods, in solution (Fig. 3A) and in zymography approach (Fig. 3B). Fig. 3A shows the amount of maltose formed after three min of enzymatic activity. *R. agamemnon* venom showed amylase activity almost 50% higher than saliva tested. Fig. 3B showed an amylolytic activity in a band around 50 kDa.

3.1.3. Phospholipase and protease inhibition assay

No phospholipase activity was found in the tested conditions as

shown in Fig. S2. *R. agamemnon* venom also showed no Trypsin, Chymotrypsin and Elastase inhibitor activities Fig. S3.

3.2. Antimicrobial and cell viability assays

3.2.1. Antimicrobial peptides

R. agamemnon venom showed no inhibitory activity against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* under the conditions and concentrations tested as shown in Fig. S4.

3.2.2. Cell viability assay

The results showed that *R. agamemnon* venom was cytotoxic in a dose-dependent manner for MCF7 cells, ranging from 11.5 to 1500 µg/mL and IC50 was determined as 101.2 µg/mL. For B16F10 and NIH3T3 cells lines, there were no visible effects. Suggesting that *R. agamemnon* venom has some specificity to MCF7 cells (Fig. S5).

3.2.3. Haemolysis assay

After 1 h incubated with 1% murine erythrocytes, the crude venom did not present haemolysis at tested concentrations. The highest dose (2000 µg/mL) only showed $4 \pm 0.5\%$ haemolysis when compared to Triton-X 100 as presented in Fig. S6.

3.3. Proteomics

3.3.1. Proteins and peptides identification in *Rhopalurus agamemnon* crude venom

In this study, a total of 7435 proteins were identified, 1562 peptide-spectrum match in 190 protein groups and 950 peptide sequences. The venom tryptic peptides were sequenced using the software Peaks 7.0 and used to identify 230 protein components when searching against the NCBI database filtered for 'Buthidae'.

Fig. 4 presents proteins categories identified in *R. agamemnon* venom according to the Peaks identifications, selected and divided manually.

Approximately 19% and 11% venom proteome fits on the ion channel modulators toxins (NaTx and KTx) and enzyme category respectively (Fig. 4A). Fig. 4B shows the enzyme types present in the

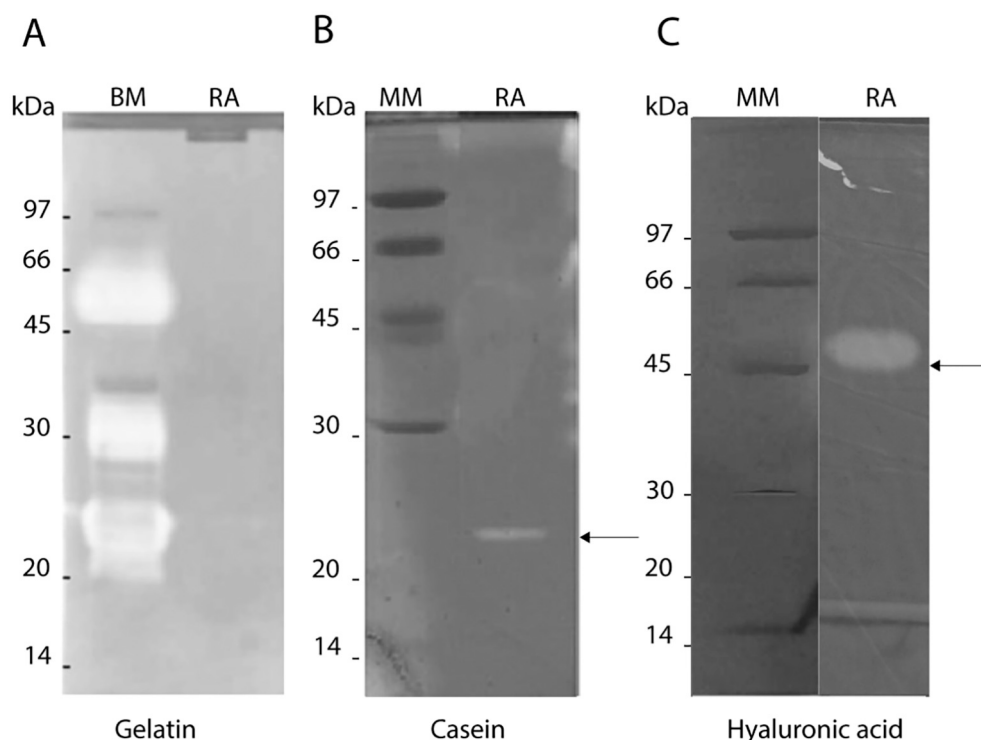


Fig. 1. In gel proteolytic activities. A - Zymogram of gelatinolytic activity of *R. agamemnon* (Ra) venom in SDS-PAGE 12%. Trypsin from porcine pancreas as positive control - Sigma Aldrich (1 mg/mL) was used. B - Zymogram caseinolytic activity of *R. agamemnon* (Ra) venom. C - Hyaluronidase activity of *R. agamemnon* (Ra) venom. The gels were stained with Coomassie blue G250. MM - molecular marker, Trip: bovine Trypsin; RA: 10 µg of *R. agamemnon* crude venom not reduced. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

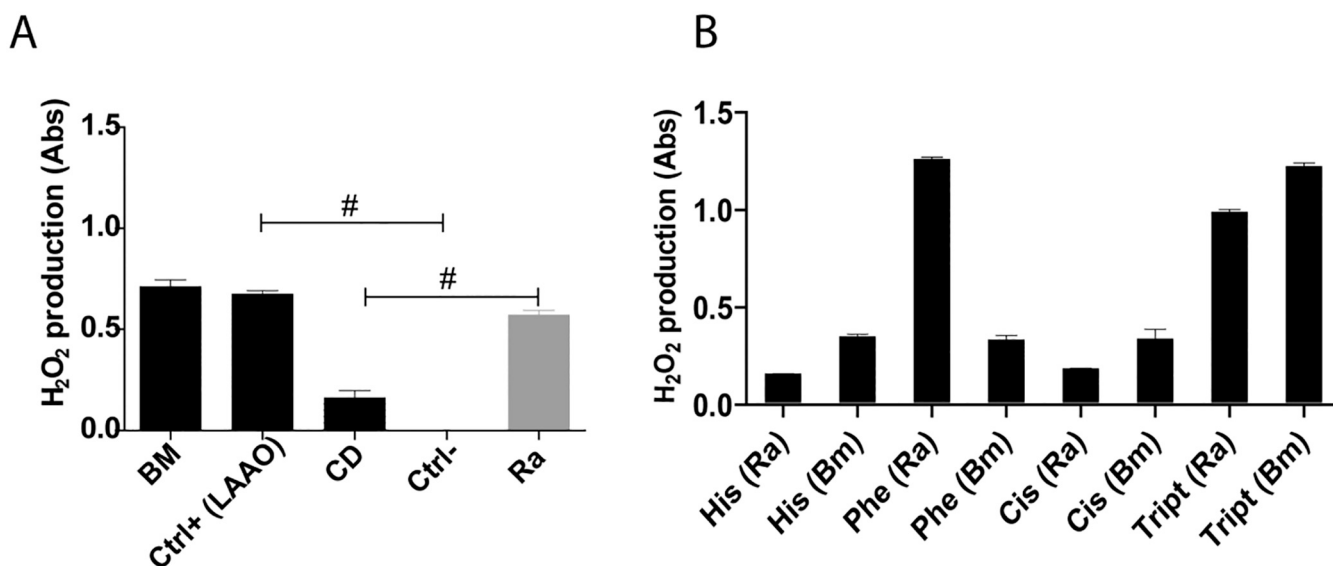


Fig. 2. L-amino acid oxidase evaluation. A - L-amino acid activity of the *R. agamemnon* venom on L-Leucine (30 μ M) evaluated by H₂O₂ production. The positive controls were evaluated using Bm venom 4 mg/mL, Commercial L-amino acid oxidase purified from *Bothrops atrox* 4 mg/mL (LAAO) and Cd venom 4 mg/mL. The negative control is Tris-HCl buffer with substrate. The reaction was read in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific) at 620 nm. The results are expressed as mean + SD and unpaired *t*-test, $p < 0.0001$. B - L-amino acid activity of *R. agamemnon* and Bm venom in different substrates (H: L-histidine; F: L-phenylalanine; C: L-cysteine; W: L-tryptophan).

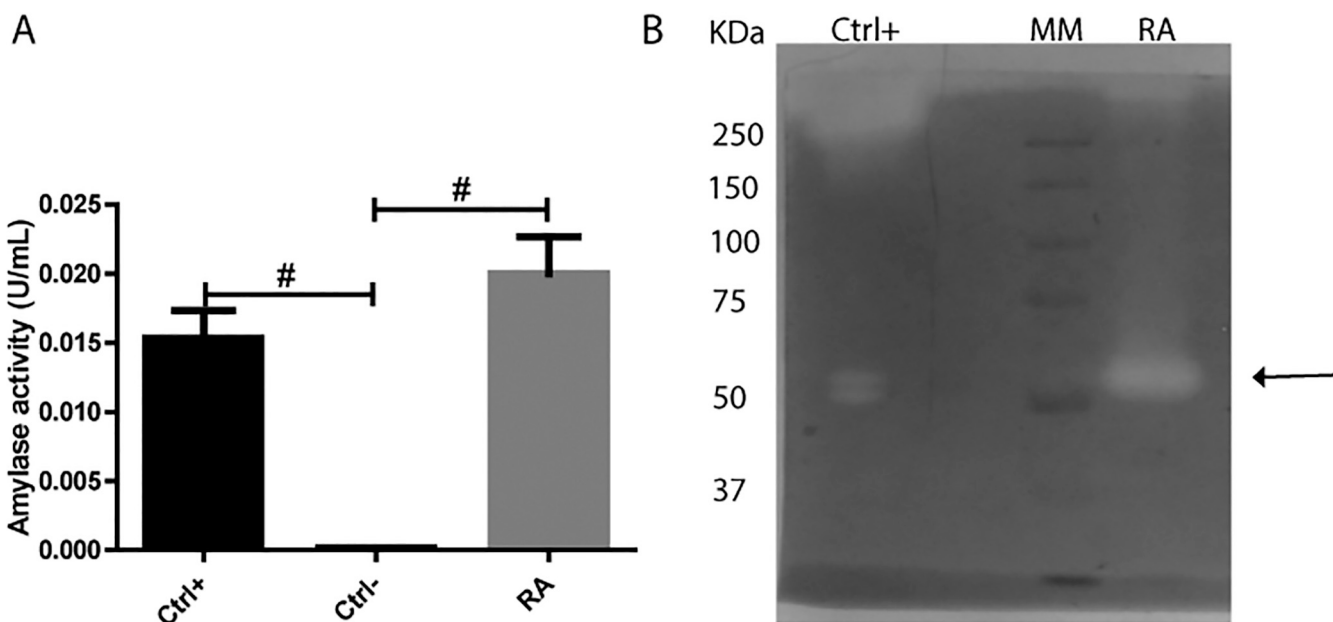


Fig. 3. Amylase activity evaluation. A - Venom amylolytic activity. Positive control was human saliva (1 mL centrifuged) and negative control was performed with corn starch and buffer. *R. agamemnon* (Ra) 4 mg/mL. B - Zymogram of Amylase activity of *R. agamemnon* (RA) venom in SDS-PAGE 8%. MM: molecular marker. The gel was stained with Lugol's solution. Human saliva was used as positive control. Mean + SD and unpaired *t*-test.

whole venom sample, Metalloproteases (54.17%), Amylase (25%), Angiotensin-converting enzyme (12.5%), Hyaluronidase (4.17%) and Phosphodiesterase (4.16%).

Almost all enzymes sequences identified in the *R. agamemnon* venom show similarity with *Centruroides* genera venom and/or putative proteins. The Hyaluronidase fragments are similar to *C. sculpturatus* and *C. hentzi*; Metalloproteinases similar to *C. sculpturatus*, *T. obscurus*, *T. bahiensis*, and *T. serrulatus*. Phosphodiesterase and Angiotensin-converting enzyme are similar to *C. sculpturatus* (Table 1). Amylase was similar to putative amylase from *C. sculpturatus* and *Tityus obscurus*, with a 30% coverage (Fig. 5B).

Since there are no LAAOs described for scorpion venom, an Uniprot LAAOs database was confronted with sequenced proteins. Two peptides were compatible with a LAAO of the *Daboia russeii* venom (Table 1), with 10% coverage (Fig. 5B).

4. Discussion

In this study, a total of 7435 peptides were sequenced and of these, 230 protein sequences were identified in *R. agamemnon* venom. Recently proteomic approaches have been widely used to characterize various scorpions' venoms. To date, proteomic profiles of 20 species have been

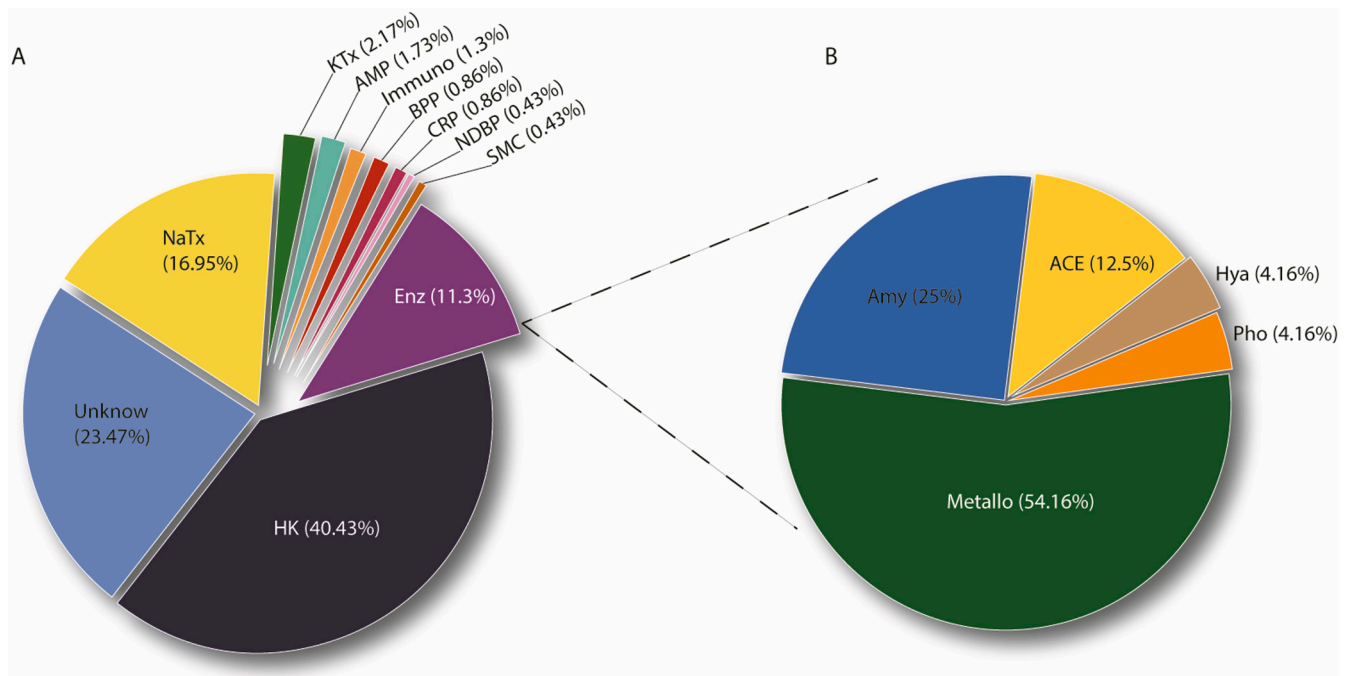


Fig. 4. Overall composition of *R. agamemnon* venom according to protein families (in percentages). A - Total proteomics of *R. agamemnon* venom confronted with the 'Buthidae' bank of the NCBI. HK: Housekeeping proteins; Unknown: proteins with unknown function; NaTX: toxins acting on sodium channels; Enz: Enzymes; AMP: Antimicrobial peptides; BPP: bradykinin-potentiating peptides; SMC: smooth muscle contraction; KTx: toxins acting on potassium channels; Immuno: Immunomodulatory proteins; CRP: Cysteine-rich proteins; and NDBP: disulfide bridged peptides. B - Enzymes identified in *R. agamemnon* venom. We listed from the most to the less abundant Metalloproteinases (Metallo), Amylases (Amy), Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), Hyaluronidase (Hya) and Phosphodiesterase (Pho).

Table 1

Proteins identified in *R. agamemnon* venom. The proteins were identified using the Buthidae NCBI database. A (*) -labeled L-amino acid oxidase (LAAO) was identified when the raw data were faced against a LAAOs Uniprot database.

Protein	Coverage	Access number	Molecular mass (Da)	Partial sequence	#peptides	Species
Orcokinin-A like	61%	XP_023222256.1	21,971	...	55	<i>Centruroides sculpturatus</i>
Hyaluronidase	47%	XP_023226974	17,433	...KEEWEKSAKEWMLKTLKLTQD...	5	<i>Isometroides vesicus</i>
β -NaTx	100%	tr Q6V4Y4 Q6V4Y4	7137	...KEGYLVKSDGCKYDCFWLGEN...	6	<i>Centruroides sculpturatus</i>
α -KTx	50%	sp Q9TXD1 KAX24	4189	...TIINEKCFATSCQWTPCKK...	1	<i>Centruroides noxius</i>
BPP	40%	sp C9X4J0 NDB2	8731	...FKFGGFLKMWKSCLKLAKLRAK...	31	<i>Tityus discrepans</i>
Putative antimicrobial peptide	34%	tr A0A218QXF7 A0A218QXF7	8421	...LIPSLVGLISAFK...	7	<i>Tityus serrulatus</i>
Metalloprotease	32%	tr A0A1E1WVY7 A0A1E1WVY7	45,165	...DGKCIVIEFLSVLESNFTKRFLN...	2	<i>Tityus obscurus</i>
NDBP 3.2	44%	sp P0DL41.1 NDB32	2870	...KLLPSVFKLFQ...	5	<i>Centruroides sculpturatus</i>
Fulicilin-like	27%	XP_023218547.1	22,515	...VSEPEQAMSNRGWSV...	7	<i>Centruroides sculpturatus</i>
α -amylase	30%	tr A0A1E1WVL9 A0A1E1WVL9	59,579	...MAVAFMLAWPYGLPR...	4	<i>Tityus obscurus</i>
Putative phospholipase	6%	tr A0A218QXE2 A0A218QXE2	32,741	...GIFDIADEILPITTNFFR...	1	<i>Tityus serrulatus</i>
LAAO*	10%	G8XQX1 OXLA_DABRR	56,888	...EGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGY...	2	<i>Daboia russelii</i>

described: 6 species of the genus *Tityus* [20–26]; 2 subspecies of the genus *Leiurus* [27]; 2 in the genus *Centruroides* [1,28]; 1 species in each of the following genera: *Opisthacanthus* [29], *Urodacus* [30], *Scorpio* [31], *Mesobuthus* [32], *Androctonus* [33], *Rhopalurus* [34], *Megacormus* [35], *Hadrurus* [36], *Paravaejovis* [37], and *Serradigitus* [38].

In scorpion venoms the best studied components are ion channel modulators, especially Na^+ , K^+ , Ca^{+2} and Cl^- [39,40]. There are currently over a thousand ion channel modulators identified in registered scorpion venoms from Uniprot (www.Uniprot.com/ 03/04/2020).

Although, recent studies have shown, in addition to these peptides, other molecules that play a role in envenoming or that have biotechnological potential such as enzymes, protease inhibitors and cytolytic peptides [34].

Protease activity (serine and metalloproteases) has already been described in several scorpions specimens using 'omic' techniques as well as zymographic assays [28,38,41,42]. *R. agamemnon* venom proteomics analyses found metalloproteinases as the major enzyme in venom, although *R. agamemnon* venom presented a small caseinolytic band

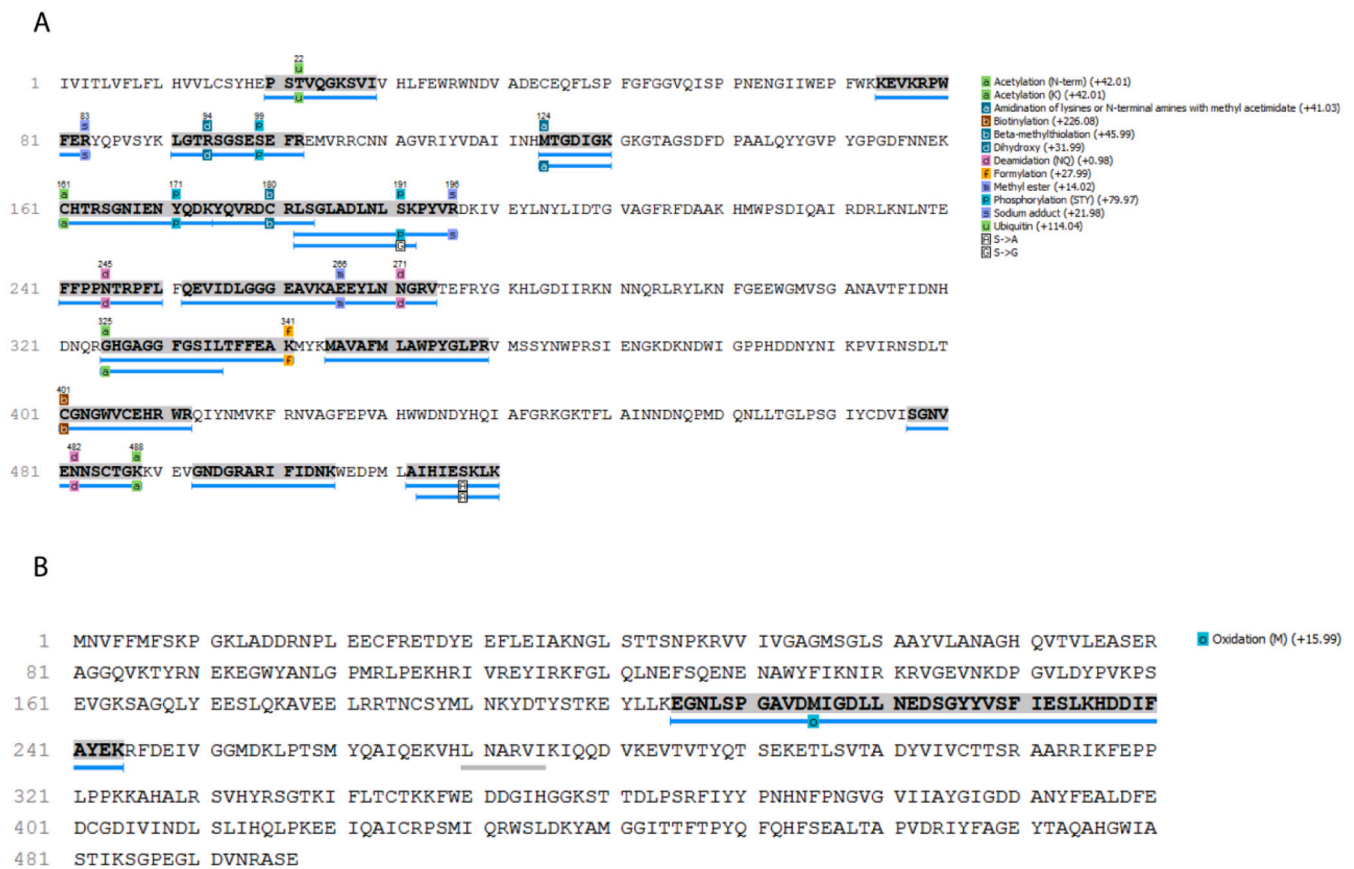


Fig. 5. Peptides obtained by *de novo* sequencing matching A – Amylase sequence of *Tityus obscurus* venom (UniProtKB – A0A1E1WVL9), identified with 30% protein coverage (in grey). LAAO sequence of *Daboia russelii* venom (UniProtKB– G8XQX1), identified with 10% protein coverage (in grey).

around 23 kDa similar to results described in *R. juncus* [43]. Although gelatin zymography is recommended to assess the presence of metalloproteases in a sample [44], no gelatinolytic activity was evidenced.

Hyaluronidase enhances venom toxicity promoting loss of extracellular matrix integrity in soft connective tissues surrounding blood vessels, thereby increasing systemic diffusion of toxins [45]. Hyaluronidase activity in *Rhopalurus juncus* [46] and *R. crassicauda* [47] were identified 45 kDa RP-FPLC fraction. Our results also reported a 45 kDa band in Hyaluronidase Zymogram assay. Proteomics reports Hyaluronidase as 4% of total described enzymes; we highlight an alignment with 47% cover on *Isometroides vescus* Hyaluronidase (Table 1).

L-amino acid oxidases are widely found in snake venoms, having biological effects as cytotoxicity, apoptosis induction, activation and inhibition of platelet aggregation, hemorrhage, haemolysis, edema, antiparasitic, bactericidal, antiviral, among others [48–50]. Because there is no entry for this protein in the Buthidae database, the proteomic analysis do not found any sequence related to L-amino acid oxidases. Since, *R. agamemnon* venom tested positive for this enzyme, we confronted the sequences with an L-amino acid oxidases database (www.uniprot.com), showing sequences similar to LAAO from *Daboia russelii* snake. This is the first description of an L-amino acid oxidase in scorpion venom and its function is completely unknown.

Amylases degrade specific carbohydrates complex producing glucose, maltose and oligosaccharides. This enzyme was described as putative in transcriptomic analyses of only two scorpion venom glands [24,36], however no activity assay were performance. Although several scorpion stings are known to increase serum amylase levels due to damage to the pancreas, the presence of this enzyme in venom related to this symptom remains uncertain. Our results describe the first amylase activity for scorpion venoms, and it's corroborated with proteome analysis which aligned with *Tityus obscurus* putative amylase.

Phospholipases hydrolyze phospholipids lysing lipid membranes during venom diffusion in poisoning syndrome, and also involved in arachidonic acid and prostaglandins formation during pulmonary edema [51]. Phospholipase A₂ (PLA₂) was identified in *Centruroides hentzi* and *Hadrurus spadix* venom by proteome and transcriptome analysis [28,36]. Although Almeida et al. (2012) did not find PLAs in the *Tityus* spp. venom gland using transcriptomic analysis, and no PLA₂ activity was detected in *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* venoms [22,52]. Also PLA activity was not detected in *Rhopalurus juncus* venom [43]. In this present paper, PLAs was not identified neither proteomic nor enzymatic assays.

Protease inhibitors are hypothesized to play an essential role in the survival of venomous animals by protecting peptide toxins against protease degradation in their prey or predators [53]. However, the biological function of protease inhibitors in scorpion venoms remains unknown. Different of *Mesobuthus europaeus* [53], and *Lychas mucronatus* [54], and *Buthus tamulus* [55] which showed protease inhibitors; *R. agamemnon* venom showed no Trypsin, Chymotrypsin nor Elastase inhibitor activity, also no peptide was identified on the proteomic analysis.

The proteomic analysis identified sequences of four antimicrobial peptides similar to *Pandinus imperator* venom, and others four antimicrobial peptides similar to putative antimicrobial peptides founded in *Tityus serrulatus* venom gland. However, *R. agamemnon* venom showed no inhibitory activity against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* under the conditions and concentrations tested.

In general scorpion venoms have antimicrobial activity that causes direct rupture of the membrane of bacteria and/or fungus, such as Mauriporin, isolated from *Androctonus mauritanicus* venom, has potent antimicrobial activity against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria [56], as well Opisthoporins 1 and 2 from

Opisththalmus carinatus scorpion venom [57]; Hadrurin from *Hadrurus aztecus* [58]; Parabutorin from *Parabuthus schlechteri* [57]; BmKbpb peptide from *Buthus martensii* [59]; IsCT 1 and 2 peptides from *Opisthacanthus madagascariensis* [60].

Most of the scorpion venom antimicrobial peptides (AMPs) are also haemolytic, such as Hadrurin from *Hadrurus aztecus*, and, UyCT3 from *Urodacus yaschenkoii* [30,58,61]. The absence of haemolytic activity in *R. agamemnon* venom also reinforces the lack of phospholipases and compounds which act on biological membranes such as AMPs.

Scorpion channel blockers could be promising alternatives for anti-cancer drug, do the fact that ions channels are over expressed in some tumor cells, and directly related to metastatic progression [62,63]. Chlorotoxin, is an example of peptide isolated from the scorpion venom *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, which specifically binds to chloride channels [64] that are firmly involved in the mechanism of cancer cell mobility [65]. The same is true for voltage-dependent sodium channels that are functionally overexpressed in various types of human cancers, and directly related to metastatic progression [63], which means that ion channel modulators could be interesting alternatives to treat, in a specific way, different cell cancer lineages [66]. Analgesic-Antitumor Peptide (AGAP) from *Buthus martensii* venom [67], it is a peptide that recognizes sodium channels [68], and also has antiproliferative activity by stopping cell cycle in G1 phase of human colon adenocarcinoma SW480 cells [69], and inhibits SHG-44 glioma cell proliferation [70].

Our results showed that *R. agamemnon* venom has a selective inhibitory activity on MCF7. MCF7 it is an human mammary adenocarcinoma, which express predominantly voltage-gated sodium channel (Nav 1.5) [71], it has been successfully treat with classical sodium channel blockers as Tetrodotoxin. We suggest that the ion channel modulators could be the main responsible for the antitumor activity of the crude venom, similar for *Buthus martensii*, whose crude venom selectively inhibited MCF7 cell growth and proliferation, inducing apoptosis [72].

The same has been observed in *Rhopalurus princeps* venom (Rp) which showed antiproliferative activity in human cancer cell lines as human prostate cancer cell line BxPC3, human ovarian cancers (OVCAR3 and IGR-OV1), and bladder cancer cell lines (SCaBER) in a concentration-dependent manner, inducing apoptosis. Although Rp venom did not show cytotoxicity on dermal fibroblasts or non-tumoral immortalized cell line of human retinal pigment epithelium (ARPE-19) [73].

Angiotensin-converting enzymes (ACE) have a relevant role in the renin-angiotensin system that controls blood pressure and regulating body fluids volume. Scorpion envenomation syndrome is an increase of plasma angiotensin-II and hypertension followed by hypotension, which can partly be explained by the presence of ACE-like enzymes in the venom [74]. ACE was found in scorpion proteomic of *T. serrulatus*, *T. obscurus* [24], *T. bahiensis* [75], and *Hottentotta judaicus* [76] venom gland. A considerable amount of ACE were found in proteomics analysis, over 12,5%, those were similar to ACE-like identified in *C. sculpturatus*. This venom enzyme also could act as peptidase making post translational modifications in venom peptides [77].

Bradykinin potentiating peptides (BPP) can act as hypotensive agents and possible alternatives for the treatment of high blood pressure. BPPs have already been mentioned in *Tityus stigmurus*' [78], *Tityus serrulatus*' [79], and *Buthus martensii*'s [80] venom. The BPPs observed in *R. agamemnon* venom are similar to those described for *T. discrepans*. The role in envenoming is not well understood; BPPs cause vasodilatation and possibly contribute to the spread of the other venom components [79].

The Proteomic identification of the myotropic peptides Fulicin-like and Orcokinin-A-like, both similar to *Centruroides sculpturatus*, as well CRISP toxins and Immunomodulatory peptides, considered unusual finding in scorpion venom, and the role of these peptides in envenomation is unclear.

5. Conclusions

Proteomic analysis makes possible protein families identification, as ion channel modulators and enzymes. The development of proteomic techniques such as liquid chromatography associated with high resolution mass spectrometry increases the number of venom components that can be effectively separated and identified. So far, there are approximately 790 scorpion venom proteins registered in the UniProt Animal Annotation Program (www.uniprot.org/program/Toxins), but this is still 1% less than the expected total number of components in the Scorpiones order [81].

In this paper we describe enzymes activity and proteomic analyses of *R. agamemnon* venom highlighting the first LAAO and amylase activity for scorpion venoms. Other interesting findings point that ion channel modulators toxins (NaTx and KTx) and enzymes are much more similar to *Centruroides* than *Tityus*, a sympatric genus. It is also important to mention that an interesting antitumor activity was identified in *R. agamemnon* venom, probably a sort of selectivity for breast cancer cells, which rise the interest in characterize the antitumor compounds present in this venom.

The proteomics also identified unusual venom peptides as Fulicin-like, Orcokinin-A-like, CRISP toxins and Immunomodulatory peptide. Identification of these components in *R. agamemnon* enriched the diversity venom composition and function, making the *R. agamemnon* venom a very interesting source of biologically active compounds that deserve to be further explored.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was funded by National Council for Scientific and technological Development (CNPq) and The Brazilian Federal Agency for Support and Assessment of Post-Graduate Education (CAPES) for granting the PhD scholarship. and the University of Brasilia for financial support Grant ID 1/2019 ans 1/2020.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104119>.

References

- [1] J.I. Cid Uribe, J.M. Jiménez Vargas, C.V. Ferreira Batista, F. Zamudio Zuñiga, L. D. Possani, Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: novel components found, *Toxicon*. 125 (2017) 91–98, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.256>.
- [2] S. Bringans, S. Eriksen, T. Kendrick, P. Gopalakrishnakone, A. Livk, R. Lock, R. Lipscombe, Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion), *Proteomics*. 8 (2008) 1081–1096, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700948>.
- [3] M.R. Wilkins, J.C. Sanchez, A.A. Gooley, R.D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser, K.L. Williams, Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13 (1996) 19–50, <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>.
- [4] O.M. Chaim, D. Trevisan-Silva, D. Chaves-Moreira, A.C.M. Wille, V.P. Ferrer, F. H. Matsubara, O.C. Mangili, R.B. da Silveira, L.H. Gremski, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes, *Toxins* (Basel) 3 (2011) 309–344, <https://doi.org/10.3390/toxins3030309>.
- [5] Y.N. Utkin, Animal venom studies: current benefits and future developments, *World J. Biol. Chem.* 6 (2015) 28–33, <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>.
- [6] R.A. Brandão, R.D. Françoço, Acidente por *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) (Scorpiones, Buthidae), *Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop.* 43 (2010) 342–344.
- [7] L.S. Carvalho, M.P.D. Santos, S.C. Dias, Escorpionismo na zona rural de Teresina, Estado do Piauí: relato de casos de envenenamento, *Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop.* 40 (2007) 491.

- [8] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [9] J.L. Brunelle, R. Green, Chapter Thirteen - Coomassie Blue Staining, in: J.B.T.-M. in E. Lorsch (Ed.) (Ed.), *Lab. Methods Enzymol. Protein Part C*, Academic Press, 2014, pp. 161–167, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6>.
- [10] Z. Yu, N. Zhou, C. Zhao, J. Qiu, In-gel determination of L-amino acid oxidase activity based on the visualization of Prussian blue-forming reaction, *PLoS One* 8 (2013), e55548, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055548>.
- [11] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428, <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- [12] M.K. Upadhyay, R. Sharma, A.K. Pandey, R.A.M.C. Rajak, An improved zymographic method for detection of amyolytic enzymes of fungi on polyacrylamide gels, *Mycologist* 19 (2005) 138–140, [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(05\)00401-5](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(05)00401-5).
- [13] K. Mackay, J.R. Starr, R.M. Lawn, J.L. Ellsworth, Phosphatidylcholine hydrolysis is required for pancreatic cholesterol esterase- and phospholipase A2-facilitated cholesterol uptake into intestinal Caco-2 cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13380–13389, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13380>.
- [14] R.G. Stábili, S.F. Amui, C.D. Sant'Ana, M.G. Pires, A. Nomizo, M.C. Monteiro, P.R. T. Romão, R. Guerra-Sá, C.A. Vieira, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 142 (2006) 371–381, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.020>.
- [15] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (1961) 271–278, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X).
- [16] J. Bieth, B. Spiess, C.G. Wermuth, The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase, *Biochem. Med.* 11 (1974) 350–357, [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(74\)90134-3](https://doi.org/10.1016/0006-2944(74)90134-3).
- [17] M.S. Castro, T.C.G. Ferreira, E.M. Cilli, E.J. Crusca, M.J.S. Mendes-Giannini, A. Sebben, C.A.O. Ricart, M.V. Sousa, W. Fontes, Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"), *Peptides* 30 (2009) 291–296, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.11.003>.
- [18] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [19] Y. Onuma, M. Satake, T. Ukena, J. Roux, S. Chantreau, N. Rasolofonirina, M. Ratsimaloto, H. Naoki, T. Yasumoto, Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxicism, *Toxicon*. 37 (1999) 55–65, [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00133-0](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00133-0).
- [20] C.V.F. Batista, L. del Pozo, F.Z. Zamudio, S. Contreras, B. Becerril, E. Wanke, L. D. Possani, Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins, *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 803 (2004) 55–66, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.002>.
- [21] J. Barona, C.V.F. Batista, F.Z. Zamudio, F. Gomez-Lagunas, E. Wanke, R. Otero, L. D. Possani, Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1764 (2006) 76–84, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.010>.
- [22] C.V.F. Batista, S.A. Román-González, S.P. Salas-Castillo, F.Z. Zamudio, F. Gómez-Lagunas, L.D. Possani, Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146 (2007) 147–157, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.004>.
- [23] C.V.F. Batista, J.G. Martins, R. Restano-Cassulini, F.I.V. Coronas, F.Z. Zamudio, R. Procópio, L.D. Possani, Venom characterization of the Amazonian scorpion *Tityus metuendus*, *Toxicon* 143 (2018) 51–58, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.006>.
- [24] U.C. de Oliveira, M.Y.J. Nishiyama, M.B.V. Dos Santos, A.P. Santos-da-Silva, H. M. Chalkidis, A. Souza-Imberg, D.M. Candido, N. Yamanouye, V.A.C. Dorce, I.L. M. Junqueira-de-Azevedo, Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions, *PLoS One* 13 (2018), e0193739, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193739>.
- [25] N.B. Dias, B.M. de Souza, F.K. Cocchi, H.M. Chalkidis, V.A.C. Dorce, M.S. Palma, Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion *Tityus obscurus*, *J. Proteomics* 170 (2018) 70–79, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2017.09.006>.
- [26] F.G. Amorim, H.T. Longhim, C.T. Cologna, M. Deguedre, E. De Pauw, L. Quinton, E.C. Arantes, Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 25 (2019).
- [27] M.A.A. Omran, A. McVean, Intraspecific variation in scorpion *leirus* quinquestriatus venom collected from egypt (SINAI AND ASWAN DESERTS), *J. Toxicol. Toxin Rev.* 19 (2000) 247–264, <https://doi.org/10.1081/TXR-100102322>.
- [28] M.J. Ward, S.A. Ellsworth, D.R. Rokyta, Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the Hentz striped scorpion (*Centruroides hentzi*; Buthidae) reveal high toxin diversity in a harmless member of a lethal family, *Toxicon*. 142 (2018) 14–29, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.12.042>.
- [29] E.F. Schwartz, T.S. Camargos, F.Z. Zamudio, L.P. Silva, C.J. Bloch, F. Caixeta, C. A. Schwartz, L.D. Possani, Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*, *Toxicon*. 51 (2008) 1499–1508, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.029>.
- [30] K. Luna-Ramírez, V. Quintero-Hernández, L. Vargas-Jaimes, C.V.F. Batista, K. D. Winkel, L.D. Possani, Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenko*: molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity, *Toxicon*. 63 (2013) 44–54, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.017>.
- [31] M.A. Abdel-Rahman, V. Quintero-Hernandez, L.D. Possani, Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus* (Arachnida: Scorpionidae), *Toxicon* 74 (2013) 193–207, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.064>.
- [32] X. Xu, Z. Duan, Z. Di, Y. He, J. Li, Z. Li, C. Xie, X. Zeng, Z. Cao, Y. Wu, S. Liang, W. Li, Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Mesobuthus martensii*, *J. Proteome* 106 (2014) 162–180, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2014.04.032>.
- [33] L. Zhang, W. Shi, X.-C. Zeng, F. Ge, M. Yang, Y. Nie, A. Bao, S. Wu, Unique diversity of the venom peptides from the scorpion *Androctonus bicolor* revealed by transcriptomic and proteomic analysis, *J. Proteomics*. 128 (2015) 231–250, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2015.07.030>.
- [34] R. Rodríguez-Ravelo, C.V.F. Batista, F.I.V. Coronas, F.Z. Zamudio, L. Hernández-Orihuela, G. Espinosa-López, A. Ruiz-Urquiola, L.D. Possani, Comparative proteomic analysis of male and female venoms from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*, *Toxicon* 107 (2015) 327–334, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.026>.
- [35] C.E. Santibáñez-López, J.I. Cid-Uribe, F.Z. Zamudio, C.V.F. Batista, E. Ortiz, L. D. Possani, Venom gland transcriptomic and venom proteomic analyses of the scorpion *Megacormus gertschi* Díaz-Najera, 1966 (Scorpiones: Euscorpidae: Megacorminae), *Toxicon*. 133 (2017) 95–109, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.05.002>.
- [36] D.R. Rokyta, M.J. Ward, Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (*Hadrurus spadix*) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity, *Toxicon*. 128 (2017) 23–37, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.014>.
- [37] J.I. Cid-Uribe, C.E. Santibáñez-López, E.P. Meneses, C.V.F. Batista, J.M. Jiménez-Vargas, E. Ortiz, L.D. Possani, The diversity of venom components of the scorpion species *Paravaejovis schwenkmeyeri* (Scorpiones: Vaejovidae) revealed by transcriptome and proteome analyses, *Toxicon* 151 (2018) 47–62, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.085>.
- [38] M.T. Romero-Gutiérrez, C.E. Santibáñez-López, J.M. Jiménez-Vargas, C.V. F. Batista, E. Ortiz, L.D. Possani, Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal the Diversity of Venom Components from the Vaejovid Scorpion *Serradigitus gertschi*, *Toxins* (Basel) 10 (2018) 359, <https://doi.org/10.3390/toxins10090359>.
- [39] A.R. Al-Shanawani, A.J. Fatani, F.H. El-Sayed, The effects of a sodium and a calcium channel blocker on lethality of mice injected with the yellow scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) venom, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 11 (2005) 175–197.
- [40] R. Rodríguez-Ravelo, R. Restano-Cassulini, F.Z. Zamudio, F.I.V. Coronas, G. Espinosa-López, L.D. Possani, A K⁺ channel blocking peptide from the Cuban scorpion *Rhopalurus garridoi*, *Peptides* 53 (2014) 42–47, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.010>.
- [41] R. Seyedian, M.H. Pipelzadeh, A. Jalali, E. Kim, H. Lee, C. Kang, M. Cha, E.-T. Sohn, E.-S. Jung, A.H. Rahmani, A.Z. Mirakabady, Enzymatic analysis of Hemiscorpius lepturus scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin, *Toxicon*. 56 (2010) 521–525, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.008>.
- [42] F.M. Almeida, A.M.C. Pimenta, S.G. De Figueiredo, M.M. Santoro, M.F. Martin-Eauclaire, C.R. Diniz, M.E. De Lima, Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms, *Toxicon*. 40 (2002) 1041–1045, [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00084-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00084-3).
- [43] A. Díaz-García, J.L. Ruiz-Fuentes, A. Yglesias-Rivera, H. Rodríguez-Sánchez, Y. Riquenes Garloto, O. Fleitas Martínez, J.A. Fraga Castro, Enzymatic analysis of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*, *J. Venom Res.* 6 (2015) 11–18.
- [44] N.S. Choi, K.S. Yoon, J. Lee, K.Y. Han, S. Kim, Comparison of three substrates (Casein, fibrin, and gelatin) in Zymographic gel, *J. Biochem. Mol. Biol.* 34 (2001) 531–536.
- [45] K.S. Girish, K. Kemparaju, The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview, *Life Sci.* 80 (2007) 1921–1943, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037>.
- [46] B.I. García-Gómez, F.I.V. Coronas, R. Restano-Cassulini, R.R. Rodríguez, L. D. Possani, Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*, *Toxicon* 58 (2011) 18–27, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.011>.
- [47] C.B. Abreu, K.C.F. Bordon, F.A. Cerni, I.S. Oliveira, C. Balenzuela, G.M. Alexandre-Silva, K.F. Zoccal, M.B. Reis, G.A. Wiesel, S. Peigneur, E.L. Pinheiro-Júnior, J. Tytgat, T.M. Cunha, L. Quinton, L.H. Faccioli, E.C. Arantes, U. Zottich, M. B. Pucca, Pioneering study on *Rhopalurus crassicauda* scorpion venom: isolation and characterization of the major toxin and Hyaluronidase, *Front. Immunol.* 11 (2020) 2011.
- [48] F. Castellano, V. Molinier-Frenkel, An Overview of L-Amino Acid Oxidase Functions from Bacteria to Mammals: Focus on the Immunoregulatory Phenylalanine Oxidase IL4I1, *Molecules* 22 (2017), <https://doi.org/10.3390/molecules22122151>.
- [49] T.R. Costa, S.M. Burin, D.L. Menaldo, F.A. de Castro, S.V. Sampaio, Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 20 (2014) 1–7.
- [50] L.F.M. Izidoro, J.C. Sobrinho, M.M. Mendes, T.R. Costa, A.N. Grabner, V. M. Rodrigues, S.L. da Silva, F.B. Zanchi, J.P. Zuliani, C.F.C. Fernandes, L. A. Calderon, R.G. Stábili, A.M. Soares, Snake venom L-amino acid oxidases: trends

- in pharmacology and biochemistry, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 196754, <https://doi.org/10.1155/2014/196754>.
- [51] S. Kanoo, S.B. Deshpande, Involvement of phospholipase A2 pathway for the Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardiopulmonary reflexes elicited by phenylidguanide, *Neurosci. Lett.* 440 (2008) 242–245, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.088>.
- [52] E.J. Venancio, F.C.V. Portaro, A.K. Kuniyoshi, D.C. Carvalho, G. Pidde-Queiroz, D. V. Tambourgi, Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms, *Toxicon* 69 (2013) 180–190, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>.
- [53] H. Ma, T. Xiao-Peng, S.-L. Yang, Q.-M. Lu, R. Lai, Protease inhibitor in scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom prolongs the biological activities of the crude venom, *Chin. J. Nat. Med.* 14 (2016) 607–614, [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30071-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30071-1).
- [54] H. Liu, J. Chen, X. Wang, S. Yan, Y. Xu, M. San, W. Tang, F. Yang, Z. Cao, W. Li, Y. Wu, Z. Chen, Functional characterization of a new non-Kunitz serine protease inhibitor from the scorpion *Lychas mucronatus*, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 158–162, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.010>.
- [55] G.S. Chhatwal, E. Habermann, Neurotoxins, protease inhibitors and histamine releasers in the venom of the Indian red scorpion (*Buthus tamulus*): isolation and partial characterization, *Toxicon*. 19 (1981) 807–823, [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90077-5).
- [56] A. Almaaytah, S. Tarazi, F. Alsheyab, Q. Al-Balas, T. Mukattash, Antimicrobial and Antibiofilm activity of Mauriporin, a multifunctional scorpion venom peptide, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 20 (2014) 397–408, <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9405-0>.
- [57] L. Moerman, S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. Van Der Walt, F. Verdonck, Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 4799–4810, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03177.x>.
- [58] A. Torres-Larios, G.B. Gurrola, F.Z. Zamudio, L.D. Possani, Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus ztecus*, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5023–5031, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>.
- [59] X.-C. Zeng, S. Wang, Y. Nie, L. Zhang, X. Luo, Characterization of BmKbpb, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides, *Peptides*. 33 (2012) 44–51, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.012>.
- [60] L. Dai, A. Yasuda, H. Naoki, G. Corzo, M. Andriantsiferana, T. Nakajima, IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (2001) 820–825, <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5472>.
- [61] L.L. Valdez-Velazquez, M.T. Romero-Gutierrez, I. Delgado-Enciso, O. Dobrovinskaya, V. Melnikov, V. Quintero-Hernández, S.G. Ceballos-Magaña, M. A. Gaitan-Hinojosa, F.I. Coronas, A.M. Puebla-Perez, F. Zamudio, I. De la Cruz-García, O.F. Vázquez-Vuelvas, A.D. Soriano-Hernandez, L.D. Possani, Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities, *Toxicon* 118 (2016) 95–103, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.04.046>.
- [62] D. Shao, K. Okuse, M.B.A. Djamgoz, Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1471–1481, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.01.016>.
- [63] J.K.J. Diss, D. Stewart, F. Pani, C.S. Foster, M.M. Walker, A. Patel, M.B.A. Djamgoz, A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 8 (2005) 266–273, <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500796>.
- [64] L. Soroceanu, Y. Gillespie, M.B. Khazaeli, H. Sontheimer, Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors, *Cancer Res.* 58 (1998) 4871–4879.
- [65] J.A. DeBin, J.E. Maggio, G.R. Strichartz, Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion, *Am. J. Phys.* 264 (1993) C361–C369, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.2.C361>.
- [66] F.H. Mohammed, M.A. Khajah, M. Yang, W.J. Brackenbury, Y.A. Luqmani, Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 48 (2016) 73–83, <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3239>.
- [67] Y.-F. Liu, J. Hu, J.-H. Zhang, S.-L. Wang, C.-F. Wu, Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 32 (2002) 317–327, <https://doi.org/10.1081/PB-120015456>.
- [68] Y.-F. Liu, R.-L. Ma, S.-L. Wang, Z.-Y. Duan, J.-H. Zhang, L.-J. Wu, C.-F. Wu, Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* karsch in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 27 (2003) 253–258, [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00609-5](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00609-5).
- [69] Y. Gu, S.-L. Liu, W.-Z. Ju, C.-Y. Li, P. Cao, Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells, *Oncol. Lett.* 5 (2013) 483–488, <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1049>.
- [70] Y. Zhao, X. Cai, T. Ye, J. Huo, C. Liu, S. Zhang, P. Cao, Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells, *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 2424–2434, <https://doi.org/10.1002/jcb.23166>.
- [71] F. Gradek, O. Lopez-Charcas, S. Chadet, L. Poisson, L. Ouldamer, C. Goupille, M.-L. Jourdan, S. Chevalier, D. Moussata, P. Besson, S. Roger, Sodium Channel Nav1.5 Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness in Breast Cancer Cells Through its Regulation by the Salt-Inducible Kinase-1, *Sci. Rep.* 9 (2019) 18652, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55197-5>.
- [72] W. Li, Y. Li, Y. Zhao, J. Yuan, W. Mao, Inhibition effects of scorpion venom extracts (*Buthus matensii* Karsch) on the growth of human breast cancer MCF-7 cells, *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM.* 11 (2014) 105–110, <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i15.17>.
- [73] A.G. Mikaelian, E. Traboulay, X.M. Zhang, E. Yeritsyan, P.L. Pedersen, Y.H. Ko, K. Z. Matalka, Pleiotropic Anticancer Properties of Scorpion Venom Peptides: Rhopalurus princeps Venom as an Anticancer Agent, *Drug Des. Devel. Ther* 14 (2020) 881–893, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S231008>.
- [74] D. Cajado-Carvalho, A.K. Kuniyoshi, B. Duzzi, L.K. Iwai, Ú.C. de Oliveira, L.M. de Junqueira Azevedo, R.T. Kodama, F.V. Portaro, Insights into the Hypertensive Effects of *Tityus serrulatus* Scorpion Venom: Purification of an Angiotensin-Converting Enzyme-Like Peptidase, *Toxins (Basel)* 8 (2016), <https://doi.org/10.3390/toxins8120348>.
- [75] U.C. de Oliveira, D.M. Candido, V.A.C. Dorce, I.L.M. de Junqueira-de-Azevedo, The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion, *Toxicon* 95 (2015) 52–56, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.12.013>.
- [76] D. Morgenstern, B.H. Rohde, G.F. King, T. Tal, D. Sher, E. Zlotnik, The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*, *Toxicon*. 57 (2011) 695–703, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.001>.
- [77] T. Verano-Braga, A.A.A. Dutra, I.R. León, M.N. Melo-Braga, P. Roepstorff, A.M. C. Pimenta, F. Kjeldsen, Moving pieces in a venomic puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 3460–3470, <https://doi.org/10.1021/pr4003068>.
- [78] R.J.A. Machado, L.G.M. Junior, N.K.V. Monteiro, A.A. Silva-Júnior, F.C.V. Portaro, E.G. Barbosa, V.A. Braga, M.F. Fernandes-Pedrosa, Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*, *Toxicon* 101 (2015) 11–18, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.04.003>.
- [79] T. Verano-Braga, C. Rocha-Resende, D.M. Silva, D. Ianzer, M.F. Martin-Eauclaire, P.E. Bougis, M.E. de Lima, R.A.S. Santos, A.M.C. Pimenta, *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371 (2008) 515–520, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.104>.
- [80] X.C. Zeng, W.X. Li, F. Peng, Z.H. Zhu, Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpb) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch, *IUBMB Life* 49 (2000) 207–210, <https://doi.org/10.1080/713803610>.
- [81] V. Quintero-Hernández, J.M. Jiménez-Vargas, G.B. Gurrola, H.H. Valdivia, L. D. Possani, Scorpion venom components that affect ion-channels function, *Toxicon*. 76 (2013) 328–342, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.012>.