



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

**Estrutura primária e atividade sobre canais Kv e Cav do peptídeo Tftx, isolado da  
peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus***

**Autor: Israel Flor Silva de Araújo**

**Brasília - DF**  
**Julho, 2023**

## **Agradecimento**

Esse projeto só pôde ser realizado graças à colaboração de diversas pessoas, tanto de forma direta quanto indireta, e a elas sou profundamente grato.

Primeiramente, agradeço à Profa. Dra. Elisabeth Ferroni por ter me acolhido em seu laboratório e acreditar no meu trabalho. Agradeço também por oferecer todo o suporte científico e, muitas vezes, o suporte emocional. Ela representa um dos meus maiores exemplos, não apenas como pesquisadora e professora, mas como ser humano.

Agradeço aos meus amigos e colegas de bancada, Diogo Tibery, Jonathan Nascimento, Luis Felipe e Adolfo Carlos, por todo o aprendizado e colaboração no desenvolvimento do projeto.

Expresso minha gratidão à minha família, que sempre foi meu maior incentivador e apoiador durante todo o projeto. Em especial, agradeço à minha namorada Fabiana Mariquito de Sousa por todo o apoio nos momentos cruciais da minha vida acadêmica e pessoal.

Agradeço aos meus amigos Estêvão César e Gabriel Vitor por me acompanharem nas coletas de campo, tornando não apenas a tarefa mais fácil, mas também um momento divertido.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Lourival Possani e ao Dr. Fernando Zamudio do Instituto de Biotecnologia (IBT) da Universidad Autónoma De México - Cuernavaca (UNAM) pelos esforços e dedicação que contribuíram para que o sequenciamento do peptídeo fosse possível.

Também expresso minha gratidão ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular pela oportunidade proporcionada. Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro concedido durante o período deste projeto

## Resumo

Os escorpiões são aracnídeos bem adaptados e existem há cerca de 400 milhões de anos. A família Buthidae é notável pela importância clínica de suas espécies, que possuem peçonhas neurotóxicas. No Brasil, existem mais de 82 espécies, com destaque para o gênero *Tityus*. A peçonha desses escorpiões contém vários compostos, como peptídeos, enzimas e sais inorgânicos, com atividades diversas em estudo.

Na região central de Brasília, próximo a universidade de Brasília, foram coletados aproximadamente 30 espécimes, entre machos e fêmeas de *Tityus fasciolatus*. Os animais foram acondicionados vivos no Biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e através do processo de eletroestimulação foram extraídos 46 miligramas de peçonha bruta. O material foi submetido a purificação por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) em duas etapas para a obtenção de 86,2 µg do peptídeo TfTx puro.

A neurotoxina TfTx possui massa molecular de 3.584,64 Da [M+H]<sup>+</sup> e sua sequência revelou 31 resíduos de aminoácidos estabilizados por quatro pontes dissulfeto. Nas comparações feitas em bancos de dados, observou-se que esse peptídeo possui alto grau de identidade com peptídeos atuantes em canais de potássio, Bmkk4 isolada da peçonha de *Mesobuthus martensii* e pMeKTx7 isolada da peçonha de *Mesobuthus eupeus*, além disso, foi observado um alto grau de identidade com dois outros peptídeos: ClINtx isolado da peçonha de *Centruroides limpidus* e 'Peptídeo A' isolado de *Centruroides hirsutipalpus*. Este segundo grupo de peptídeos não possui atividade fisiológica descrita e estudos realizados com essas moléculas sugerem que eles compõem uma família ainda não descrita de neurotoxinas com possível atividade em canais de potássio.

Este trabalho teve como objetivo principal a elucidação da estrutura primária e a avaliação da atividade da toxina em canais iônicos seletivos para potássio (K<sub>v</sub>1.4, K<sub>v</sub>3.1 e hERG1) a concentrações de 500nM e 1µM, e em canais seletivos para cálcio (Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3, Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2 e Ca<sub>v</sub>2.3) a uma concentração de 500nM. Porém, não foi observada modificação de corrente ou voltagem significativa para determinar a atividade do peptídeo nestes canais, permanece desconhecido o alvo molecular da toxina.

## Abstract

Scorpions are well-adapted arachnids and have been around for approximately 400 million years. The Buthidae family is notable for the clinical importance of its species, which possess neurotoxic venoms. In Brazil, there are over 82 species, with a focus on the genus *Tityus*. The venom of these scorpions contains various compounds, such as peptides, enzymes, and inorganic salts, with diverse activities under study.

In the central region of Brasília, near the University of Brasília, approximately 30 specimens of both male and female *Tityus fasciolatus* were collected. The animals were kept alive in the Animal Facility of the Institute of Biology at the University of Brasília, and through the process of electrostimulation, 46 milligrams of crude venom were extracted. The material underwent purification through two stages of *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) to obtain 86.2 µg of pure TtTx peptide.

The neurotoxin TtTx, a peptide isolated from the venom of *Tityus fasciolatus*, has a molecular mass of 3,583.64 Da [M+H]<sup>+</sup> and its sequence revealed 31 amino acid residues stabilized by four disulfide bridges. In comparisons made in databases, it was observed that this peptide has a high degree of identity with peptides acting on potassium channels, Bmkk4 isolated from *Mesobuthus martensii* venom and pMeKTx7 isolated from *Mesobuthus eupeus* venom, in addition, a high degree of identity was also observed with two other peptides: ClINtx isolated from the venom of *Centruroides limpidus* and 'Peptide A' isolated from *Centruroides hirsutipalpus*. This second group of peptides has no regulated activity, and studies carried out with these recommendations show that they comprise a not yet described family of neurotoxins with possible activity on potassium channels.

This work had as main objective the elucidation of the primary structure and the evaluation of the activity of the toxin in selective ion channels for potassium (K<sub>v</sub>1.4, K<sub>v</sub>3.1 and hERG1) at concentrations of 500nM and 1µM, and in selective channels for calcium (Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3, Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2 and Ca<sub>v</sub>2.3) at a concentration of 500nM. However, no significant current or voltage change was observed to determine the peptide activity in these channels, the molecular target of the toxin remains unknown.

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1 - Representação esquemática do corpo de escorpião .....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2 - Espécime fêmea de <i>Tityus fasciolatus</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 3 - Estruturas tridimensionais de KTxs .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4 - Representação esquemática de um domínio transmembrânico .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5 - Representação esquemática do canal de potássio dependente de voltagem com a união dos 4 domínios.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6 - Diversidade de canais humanos de potássio dependente de voltagem .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 7 - Representação esquemática do canal de Cálcio dependente de voltagem .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8 - Sequência precursora da toxina TfTx, obtida pela biblioteca transcritômica</b>	<b>28</b>
<b>Figura 9 - Sequência das frações correspondentes aos peptídeos Tf2.7, Tf3.5, Tf14 isolados da peçonha de <i>Tityus fasciolatus</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 10 - Ensaio eletrofisiológico preliminar realizado por patch clamp para avaliar a atividade do peptídeo TfTx .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 11 - Representação do protocolo de fracionamento da peçonha bruta .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12 - Representação do protocolo de purificação do peptídeo TfTx .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 13 - Representação dos protocolos de canais do tipo Kv 1.4 e 3.1.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14 - Representação dos protocolos de canais hERG1 .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 15 - Representação dos protocolos de canais do tipo CaV.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 16 - Fracionamento da peçonha bruta de <i>Tityus fasciolatus</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 17 - Purificação do peptídeo TfTx.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 18 - Espectro de massas TfTx.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 19 - Alinhamento múltiplo com peptídeos que apresentaram similaridade na avaliação com precursor.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 20 - Alinhamento múltiplo com peptídeos que apresentaram similaridade na avaliação sem precursor .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 21 - Alinhamento múltiplo com Toxinas moduladoras de canais de cálcio .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 22 - Alinhamento múltiplo com Toxinas moduladoras de canais de cálcio .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 23 - Avaliação da toxina TfTx em canais dependentes de voltagem Kv1.4.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 24 - Avaliação da toxina TfTx em canais dependentes de voltagem Kv3.1.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 25 - Avaliação da toxina TfTx em canais dependentes de voltagem hERG1.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 26 - Avaliação da toxina TfTx em canais dependentes de voltagem Cav1.2 .....</b>	<b>52</b>

<b>Figura 27 - Avaliação da toxina Tftx em canais dependentes de voltagem Cav1.3.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 28 - Avaliação da toxina Tftx em canais dependentes de voltagem Cav2.1.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 29 - Avaliação da toxina Tftx em canais dependentes de voltagem Cav2.2.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 30 - Avaliação da toxina Tftx em canais dependentes de voltagem Cav2.3.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 31 - Predição da estrutura tridimensional da toxina Tftx.....</b>	<b>57</b>

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1: Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\alpha$ -Ktx**

**Tabela 2: Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\beta$ -Ktx**

**Tabela 3: Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\gamma$ -Ktx**

**Tabela 4: Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\delta$ -Ktx**

**Tabela 5: Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\lambda$ -Ktx**

**Tabela 6: Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\varepsilon$ -Ktx**

**Tabela 7: Alinhamento de algumas toxinas descritas como k-Ktx**

**Tabela 8: Toxinas de cálcio descritas.**

**Tabela 9: Tipos de correntes de cálcio e bloqueadores.**

**Tabela 10: Sequência obtida por meio da degradação de Edman**

## **Lista de siglas e abreviações**

ACN: Acetonitrila

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CaV: Canal de cálcio dependente de voltagem

CHO: Células de Ovário de hamster chinês

HEK: Células embrionárias de rim humano

HVA: High-voltage-activated

ICK: Inhibitory Cystine Knot

TFA: Ácido trifluoroacético

ACN: Acetonitrila

HCCA:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxynamic acid

DAN: 1,5 Diaminonaftaleno

ISD: In-source Decay

NaV: Canal de sódio dependente de voltagem

KV: Canal de potássio dependente de voltagem

VMax: Voltagem que estimula a corrente de maior amplitude



## Sumário

<b>1 – Introdução</b> .....	11
<b>Escorpião – Generalidade</b> .....	11
<i>Tityus fasciolatus</i> .....	12
<b>Composição geral da peçonha</b> .....	12
<b>Toxinas que atuam em canais seletivos para potássio.</b> .....	14
<b>Toxinas que atuam em canais seletivos para Cálcio.</b> .....	19
<b>Canais Iônicos</b> .....	19
<b>Canais de Potássio dependentes de voltagem (K<sub>v</sub>)</b> .....	21
<b>Canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca<sub>v</sub>)</b> .....	24
<b>Estudos com Toxinas de <i>Tityus fasciolatus</i>.</b> .....	27
<b>2 – Justificativa</b> .....	31
<b>3 – Objetivos</b> .....	32
<b>Objetivo geral</b> .....	32
<b>Objetivos específicos</b> .....	32
<b>4 – Metodologia</b> .....	33
<b>Extração de peçonha bruta</b> .....	33
<b>Purificação</b> .....	33
<b>Fracionamento da Peçonha Bruta</b> .....	33
<b>Purificação do peptídeo TfTx</b> .....	34
<b>Análise de massas moleculares</b> .....	35
<b>Quantificação dos peptídeos</b> .....	35
<b>Sequenciamento</b> .....	35
<b>Cultura de células</b> .....	35
<b>Transfecção Transiente de canais de Cálcio</b> .....	36
<b>Ensaio Eletrofisiológico</b> .....	36
<b>Ensaio eletrofisiológico em canais de potássio dependentes de voltagem</b> .....	36
<b>Ensaio eletrofisiológico em canais de cálcio dependentes de voltagem</b> .....	38
<b>Eletrofisiologia – Análise de dados</b> .....	39
<b>Análise de dados – Ensaio em canais de potássio dependentes de voltagem</b> .....	39
<b>Análise de dados - Ensaio em canais de cálcio dependentes de voltagem</b> .....	41
<b>5 – Resultados</b> .....	43
<b>Purificação</b> .....	43
<b>Sequenciamento</b> .....	45

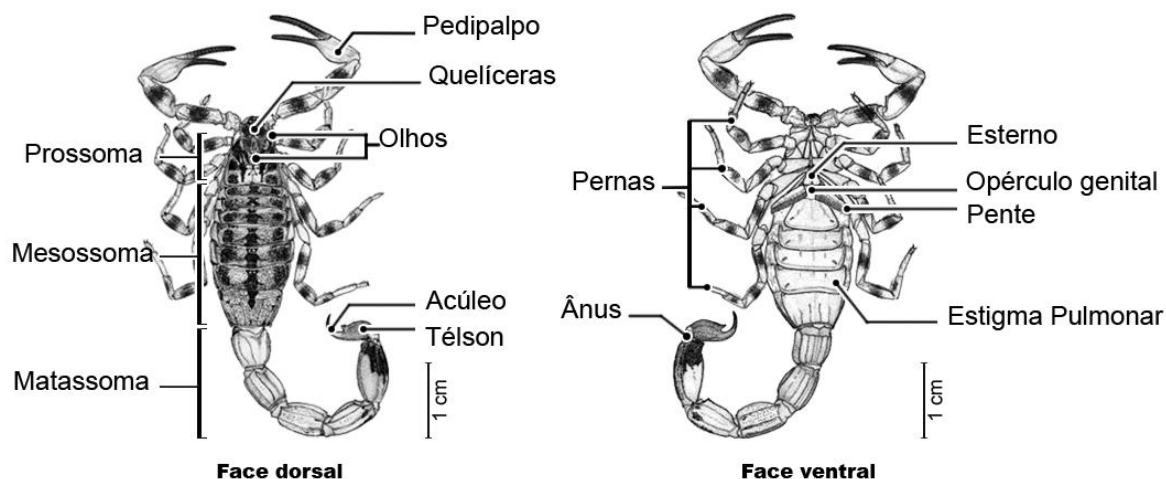
<b>Alinhamento de sequências .....</b>	<b>46</b>
<b>Eletrofisiologia em canais de potássio dependentes de voltagem.....</b>	<b>48</b>
<b>Eletrofisiologia em canais de cálcio dependentes de voltagem.....</b>	<b>51</b>
<b>6 – Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>7 – Conclusão.....</b>	<b>64</b>
<b>8 – Perspectivas .....</b>	<b>65</b>
<b>9 - Referência Bibliográfica.....</b>	<b>66</b>

# 1 – Introdução

## Escorpião – Generalidade

Com estimativas que ultrapassam 350 milhões de anos, os escorpiões pertencem a um dos grupos mais antigos de animais terrestres vivos. A ordem Scorpiones abriga mais de 2.000 espécies de escorpiões distribuídos ao redor do mundo, presentes em todos os continentes, com exceção da Antártida. Esses animais apresentam uma especificidade por habitat, sendo encontrados em sua maioria em: cavernas, rochas, cupinzeiros e ambientes isolados e sem luz. Apesar disso, algumas espécies são encontradas em ambientes urbanos, como espécies dos gêneros *Centruroides*, *Isometrus*, *Tityus*, *Euscorpis* e *Bothriurus*. Essas espécies urbanas tendem a ser mais conhecidas, principalmente por estarem mais comumente (mas não de forma exclusiva) associadas a casos de escorpionismo (acidentes provocados por picadas de escorpião) (Porto e Brazil, 2010).

Os escorpiões possuem uma anatomia distintiva, com seu corpo dividido em três segmentos principais: prossoma, mesossoma e o metassoma. No prossoma, encontram-se os olhos, as quelíceras (usadas para triturar alimentos) e os pedipalpos (pinças). No mesossoma, estão presentes apêndices sensoriais em forma de pentes, que permitem a detecção de estímulos mecânicos e químicos do ambiente, além de patas, estigmas pulmonares para a troca gasosa e o opérculo genital. Na porção terminal do corpo, no metassoma, encontramos o télson, que abriga uma glândula produtora de peçonha, e uma estrutura inoculadora chamada de acúleo. (Figura. 1) (Brusca, 2007; Candido, 2019).



**Figura 1 - Representação esquemática do corpo de escorpião: face dorsal (à esquerda) e ventral (à direita).** Imagem adaptada de Candido et al., 2005.

## *Tityus fasciolatus*

Dentre as diversas espécies de escorpiões que habitam o cerrado, *Tityus fasciolatus* é um representante da família *Buthidae* encontrado principalmente em regiões com menor grau de urbanização. A presença desses animais já foi registrada nos estados de Minas Gerais e São Paulo, além de em toda a região Centro-Oeste (Yoshizawa, 2002; Campagner et al., 2006).

Os *Tityus fasciolatus* possuem de 4,5 a 7 cm de comprimento e apresentam um padrão de coloração marrom e amarelo, com três listras pretas na região dorsal e listras nas pernas e pedipalpos (Figura 2) (Lourenço, 2003). Vivem associados a cupinzeiros do gênero *Armitermes* (Lourenço, 2003), onde encontram abrigo e alimento, predando invertebrados menores, como baratas, grilos e pequenas aranhas (Brazil & Porto).



**Figura 2 - Espécime fêmea de *Tityus fasciolatus*:** A direita visão lateral e esquerda visão dorsal do espécime. Fotos: Estêvão Cesar.

### **Composição geral da peçonha**

Os escorpiões possuem uma glândula secretora posicionada no télson que produz uma mistura complexa de toxinas, composta por substâncias proteicas e não proteicas, como: aminoácidos livres, lipídios, sais, enzimas, nucleotídeos, peptídeos e polipeptídeos (Pringos et al., 2011). Dentro da gama de moléculas presentes na peçonha, destacam-se os peptídeos, os principais responsáveis pela sintomatologia do envenenamento. Por sua vez, podem ser divididos em dois grupos: os peptídeos com ponte dissulfeto (*Disulfide Bridge Peptides*) e os sem pontes dissulfeto (*Non-Disulfide Bridge Peptides*). Os peptídeos NDBPs apresentam, no geral, atividades antimicrobiana, hemolítica e imunomoduladora. Já os DBPs são capazes de

interagir com uma variedade de tipos e subtipos de canais iônicos seletivos para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup> com alto grau de especificidade e capacidade de alteração na permeabilidade da membrana celular (Zeng et al., 2005; Ortiz et al., 2015; Ghosh et al., 2019).

Os NDBPs são estruturas peptídicas curtas, normalmente catiônicas, que apresentam um certo grau de flexibilidade, conferido justamente pela ausência de interações químicas do tipo pontes dissulfeto (Machado et al., 2016; Ghosh et al., 2019). Estes peptídeos apresentam de 13 a 56 resíduos de aminoácidos com um grande grau de diversidade, assumindo em sua maioria conformação  $\alpha$ -hélice anfipática em ambiente de membrana. Sua carga positiva facilita a interação com lipídios carregados negativamente, possibilitando assim, a inserção dos resíduos hidrofóbicos na membrana biológica (Huang et al., 2010; Ortiz et al., 2015). Esse mecanismo possibilita uma grande gama de aplicações em alvos moleculares não específicos, onde diversas atividades já foram descritas a partir de estudos com peptídeos sem ponte dissulfeto, incluindo atividades, antimicrobiana, citolítica, anticâncer, antiviral, antifúngico e outras (Almaaytah and Albalas, 2014).

Os peptídeos com ponte dissulfeto (DBPs) abarcam uma grande diversidade de toxinas com importância médica, como, toxinas atuantes em canais de sódio (NaTx), de potássio (KTx), de cloreto (ClTx) e de cálcio (CaTx) e as toxinas do tipo-*Kunitz* (Grashof, 2019). Os DBPs apresentam um alto grau de especificidade, restringindo a diversidade de alvos com os quais interagem. As interações altamente específicas entre as toxinas e os canais iônicos estão frequentemente associadas aos efeitos letais provocados pelas toxinas de escorpião. DBPs representam o grupo de toxinas de escorpiões mais estudados quando comparados diretamente com as NDBPs, com um grande número de estruturas com funções descritas. Entretanto, na última década o interesse de pesquisadores tem cada vez mais se voltado para os peptídeos sem ponte dissulfeto, até o momento já são mais de 40 peptídeos com função descrita (Almaaytah and Albalas, 2014; Zhongjie et al., 2019).

Bancos de dados voltados à deposição de sequências de toxinas, como o Uniprot, comportam uma grande variedade de sequências de toxinas e de prováveis toxinas descritas a partir das peçonhas de escorpiões. Até o presente momento, já foram depositadas mais de 1100 sequências de diferentes peptídeos (<http://surl.li/iaiya> acessado em 16 de junho de 2023), com cerca de 300 (DBPs) sendo, atuantes e prováveis atuantes em canais de potássio (<http://surl.li/iaits> acessado em 16 de junho de 2023). Apesar disso, uma grande diversidade de toxinas ainda pode ser explorada, com cerca de 2.000 espécies de escorpiões descritas, os quais

produzem uma peçonha com em média 240 moléculas, sendo cerca de 30% não compartilhados com outras espécies (Hilal et al., 2023), podemos presumir uma diversidade de aproximadamente 140.000 moléculas novas, entre peptídeos e polipeptídeos, com diversas atividades biológicas (Possani et al., 2000; Zhijian et al., 2006).

### **Toxinas que atuam em canais seletivos para potássio**

As toxinas atuantes em canais de potássio, também chamadas de KTxS, são caracterizadas por apresentar de 20 a 95 resíduos de aminoácidos, estabilizadas por 2 a 4 pontes dissulfeto. Segundo a sua cadeia de aminoácidos e função exercida, as KTxS estão distribuídas em 7 diferentes famílias (Figura 3), classificadas como:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\lambda$ ,  $\epsilon$ , e  $\kappa$ -Ktx (Morales et al., 2013; Csoti, 2022). As interações entre as toxinas e os canais iônicos acontecem de forma reversível. Resíduos carregados positivamente presentes nos peptídeos promovem uma interação eletrostática com resíduos carregados negativamente do canal iônico bloqueando o poro de seletividade (Giangiacomo, 1992; Garcia, 2001). Essa interação depende de resíduos específicos de aminoácidos presentes nas toxinas, Lisina (Lys), Arginina (Arg) e Asparagina (Asn) que reconhecem locais na superfície do poro do canal contendo Ácido Aspártico (Asp) e Tirosina (Tyr). Isso permite a inserção das toxinas no poro, obstruindo-o e bloqueando o fluxo iônico. Além dos resíduos de aminoácidos, o rearranjo molecular entre as toxinas e os canais é importante para a atividade da toxina sobre o canal.

As  $\alpha$ -Ktx (Tabela 1) são peptídeos curtos com cerca de 23 a 42 aminoácidos, apresentam um motivo estrutural clássico, com duas a três fitas- $\beta$  antiparalelas formando uma face de folha  $\beta$  em um lado da molécula e uma  $\alpha$ -hélice do outro, estabilizadas por 3 a 4 pontes dissulfeto (Giangiacomo et al., 2004; Diego-Gacía et al., 2014). Esse grupo é o mais diverso entre as Ktx sendo composto por aproximadamente 180 toxinas distribuídas em 32 subfamílias (<https://kaliumdb.org/> acessado em 16 de junho de 2023).

**Tabela 1 – Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\alpha$ -Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\alpha$ -Ktx_1.1	-QFTNVSC TTSKEC WSV C QRLHNTSRG-KCMNKKCRCYS-	37
$\alpha$ -Ktx_1.2	-QFTQESCTASNQCWSIC KRLHNTNRG-KCMNKKCRCYS-	37
$\alpha$ -Ktx_3.1	GVEINVKCSGSPQCLKPKCKDA-GMRFG-KCMNRKCHCTPK	38
$\alpha$ -Ktx_3.2	GVPINVSC TGSPOCIKPKCKDA-GMRFG-KCMNRKCHCTPK	38
$\alpha$ -Ktx_4.2	-VWIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATG-KCTNGRDCDC---	35
$\alpha$ -Ktx_4.1	-VFINAKCRGSPELPCCKEAIIGKAAG-KCMNGKCKCYP-	37
$\alpha$ -Ktx_2.1	-TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	39
$\alpha$ -Ktx_2.2	-TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	39
	* :* *: . * ** * :* *	

As  $\beta$ -Ktx (Tabela 2) são mais longas que as  $\alpha$ -Ktx, com cerca de 47 a 96 resíduos de aminoácidos estabilizadas por 3 pontes dissulfeto (<https://kaliumdb.org/> acessado em 16 de junho de 2023). Essas toxinas apresentam um motivo estrutural CS- $\alpha\beta$  com 2 domínios funcionais diferentes: Uma  $\alpha$ -hélice na porção N-terminal e uma região compacta rica em cisteínas na porção C-terminal. O domínio N-terminal é responsável pela atividade citotóxica enquanto o domínio C-terminal é responsável pelo bloqueio do poro dos canais  $K^+$  (Bartok et al., 2014). Atualmente, já foram descritos cerca de 38 peptídeos classificados como  $\beta$ -Ktx distribuídos em 4 subfamílias (<https://venomzone.expasy.org/3438>; <https://kaliumdb.org/> acessados em 16 de junho de 2023).

**Tabela 2 - Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\beta$ -Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\beta$ -Ktx_2.1	-----KNIKEKLTE-VKDKMKHSWNKLTSMSEYAC PVI---EKW CEDHCAA-KKAI GK CEDTECKLKLKLRK--	61
$\beta$ -Ktx_2.2	-----KIKSGWERLTSESEYACPAI---DKF CEDHCAA-KKAVGK CDDFKCNCIKL----	47
$\beta$ -Ktx_1.1	-----KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAY---EGYCNDHCNDIERKDGECHGFKCKCAKD----	60
$\beta$ -Ktx_1.2	-----KLVKYAVPVGTLRILQTVVHKVGTQFGCPAY---QGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF-	64
$\beta$ -Ktx_3.1	GWINEEKIQKKIDERMGNVTLGGMAKAIIVHKMAKNEFQCMANMMDLGNCEKH CQT-SGEKGYCHGTKCKCGTPLSY-	75
$\beta$ -Ktx_3.2	GWMSEKKVQGILDKKLPEGIIRNAAKAIIVHKMAKNQFGCFANVDVKGDCRHKCA-EDKEGICHGTKCKCGVPISYL	76
	: . . : : * . * . ** . * * . : * *	

As  $\gamma$ -Ktx (Tabela 3) possuem 31 representantes que se distribuem em 5 subfamílias, os peptídeos possuem entre 42 e 57 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 pontes dissulfeto. O grupo das  $\gamma$ -Ktx surgiu a partir das ErgToxinas, com um dos primeiros representantes isolado a partir da peçonha de *Centruroides noxius*. As ErgToxinas atuam em um subtipo de canal iônico seletivo para potássio, os canais ERG (*ether-a-go-go*). Esses canais se diferenciam estruturalmente dos demais canais por apresentarem uma  $\alpha$ -hélice a mais na porção interna,

que por sua vez desempenha um importante papel na interação toxina-canal (Gurrola et al., 1999; Rodriguez de la vega & Possani, 2004; Cid-Uribe et al., 2020).

**Tabela 3 - Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\gamma$ -Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\gamma$ -KTx_4.1	DRDSCVDKSKCSKYGYGQCDECCCKKAGDRAGNCVYFKCKCNP	43
$\gamma$ -KTx_4.12	ERDSCVEKSKCGKYGYGQCDECCCKKAGDRAGTCVYYKCKCNP	43
$\gamma$ -KTx_3.1	GRDSCVNKSRCAKYGYYSQCEVCCCKKAGHKGGTCDFFKCKCKV	43
$\gamma$ -KTx_1.1	DRDSCVDKSRCAKYGYGQCQDCCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA-	42
$\gamma$ -KTx_1.5	DRDSCVDKSRCSKYGYGQCQDCCCKKAGHNGGTCMFFKCKCA-	42
$\gamma$ -KTx_1.10	DRDSCVDKSRCAKYGYFQECTDCCCKKYGHNGGTCMFFKCKCA- *****:**:*.******: :* ***: *...*. * ::****	42

A família das toxinas de potássio do tipo delta ( $\delta$ -Ktx) (Tabela 4) é composta por 6 toxinas distribuídas em 3 subfamílias. As  $\delta$ -Ktx possuem entre 59 e 70 resíduos de aminoácidos estabilizados por 2 a 3 pontes dissulfeto. As  $\delta$ -Ktx compartilham entre si um sítio inibidor de serinoprotease do tipo Kunitz, além de apresentarem um alto grau de afinidade com canais iônicos seletivos para potássio do tipo Kv1.3 (Chen et al., 2012; Cid-Uribe et al., 2020).

**Tabela 4 - Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\delta$ -Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\delta$ -KTx_2.4	QKDCSLPVDVTGRGKGFRLRYYNKNSKTCESFIYGGVGGNKNFLNIENCCIKKAKNC	59
$\delta$ -KTx_2.1	KKKQQLPSDVGKKGKASFTRYYYNEESGKCETFIYGGVGGNSNNFLTKEDCCRECAQGSC	59
$\delta$ -KTx_2.2	KNKQQLPSDVGKKGKASFTRYYYNEEGKCEFTIYGGVGGNSNNFLTKEDCCRECAQGSC	59
$\delta$ -KTx_2.3	KNKQQLPSDVGKKGKASFTRYFYNEESGKCETFIYGGMGGNSNNFLTKEACCRECAQGSC ::.*.** *.*:**. * **:**:.. **:*:*:*:*:*:*.* **:* *	59

Distribuídos em 2 subfamílias as  $\lambda$ -Ktx (Tabela 5) possuem entre 37-39 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 pontes dissulfeto. Nenhum inibidor de alta afinidade foi descrito nesta família, as  $\lambda$ -Ktx inibem com baixa afinidade ( $IC_{50} > 1\mu M$ ) canais iônicos do tipo Kv1 (Gao et al., 2013; Cid-Uribe et al., 2020)



**Tabela 5 - Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\lambda$ -Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\lambda$ -KTX_1.1	SQPTEC-KYGRPCNSDRDCC-WEYRCLSSGREYTCQDPGP	39
$\lambda$ -KTX_2.2	----GCNRLNKKCNSDADCCRYGERCIISTGVNYYCRPDFGP	37
	* : .: ***** ** : **:*:* :* * : * **	

As  $\varepsilon$ -Ktx (Tabela 6) compõem o menor grupo, com 1 subfamília e apenas 2 representantes (Ts11 e Ts12), possuem 29 resíduos de aminoácidos estabilizados por 4 pontes dissulfeto e apresentam um motivo estrutural CS- $\alpha\beta$  (Cremonez et al., 2016).

**Tabela 6 - Alinhamento de algumas toxinas descritas como  $\varepsilon$ -Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\varepsilon$ -KTX_1.1	KPKCGLCRYRCCSGGCSSGKCVNGACDCS	29
$\varepsilon$ -KTX_1.2	TVKCGGCNRKCCAGGCRSGKINGKCQCY	29
	. *** * . :*:*** *****:* *:*	

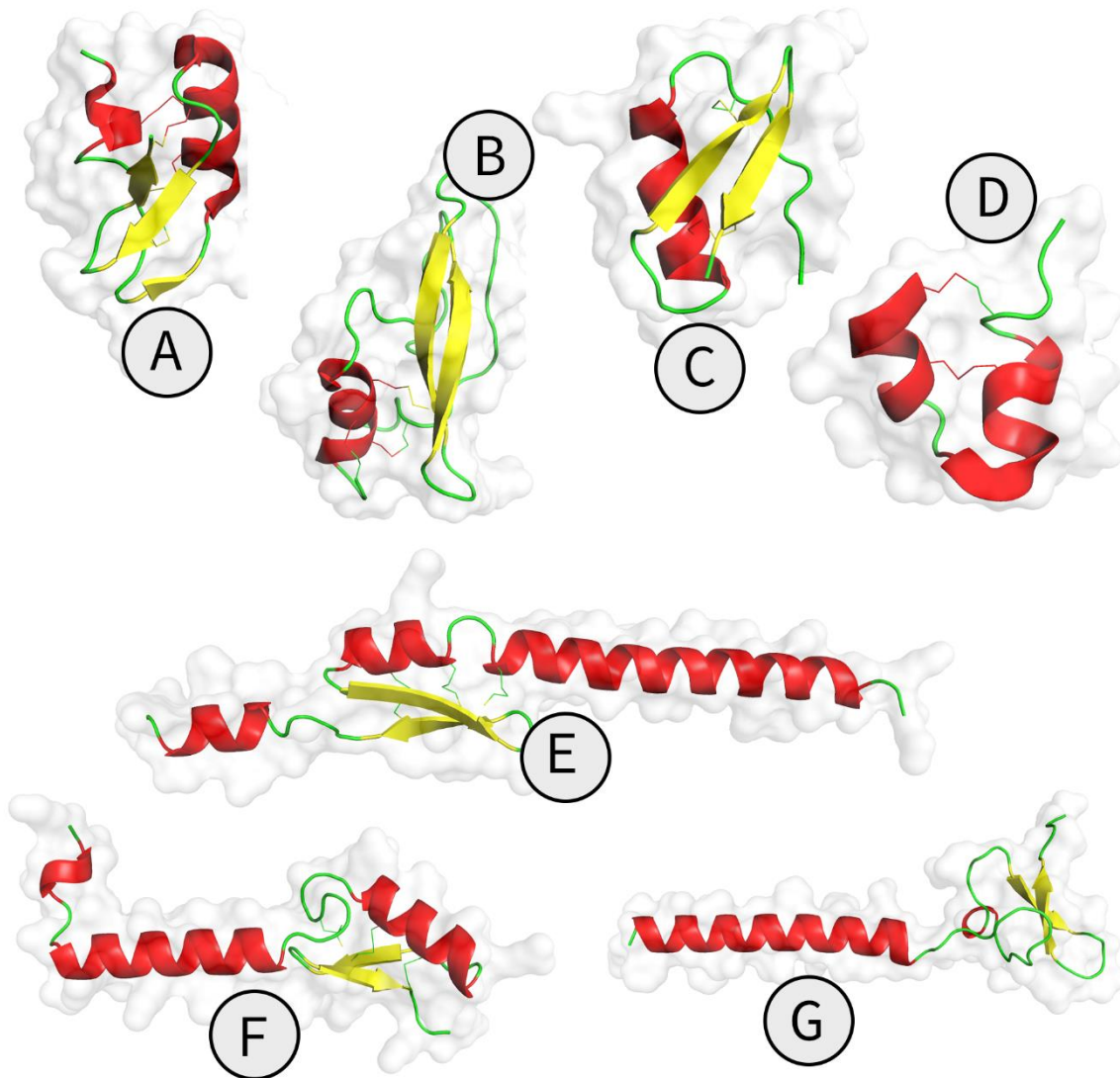
Por último, as k-Ktx (Tabela 7) possuem 18 representantes que se distribuem em 5 subfamílias. Os peptídeos variam entre 42 e 57 resíduos de aminoácidos e apresentam duas estruturas  $\alpha$ -hélice paralelas ligadas por 2 pontes dissulfeto (C $\alpha$ / $\alpha$ ) (Bhavaya et al., 2016).

**Tabela: 7 - Alinhamento de algumas toxinas descritas como k-Ktx**

Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
$\kappa$ -KTX_1.1	GHACYRNCWREGNDEETCKERC-----	22
$\kappa$ -KTX_1.2	GHACYRNCWREGNDEETCKERC-----	23
$\kappa$ -KTX_2.1	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVE-	26
$\kappa$ -KTX_2.2	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVEY	27
$\kappa$ -KTX_2.4	-DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHP---	24
$\kappa$ -KTX_2.9	GNACIEVCLQHTGNPAECDKPCDK----	24
	. * . * :. .: *.: *	

O mecanismo de ação oclusiva desses peptídeos foi descrito inicialmente, através da intrusão no filtro de seletividade de canal formado por uma díade funcional, composta por resíduos de aminoácidos de Lys e um resíduo aromático, normalmente sendo Tyr a 9 resíduos de distância em sentido C-terminal, isso separa a Lys do centro do anel de benzeno da Tyr a uma distância aproximada de 6,6 Å na estrutura tridimensional. Essa conformação permite com que as toxinas se liguem a cavidade extracelular do canal de potássio, de forma que a lisina

penetra profundamente no filtro de seletividade do canal. Essa interação obstrui o poro, bloqueando seletivamente a passagem de íons de potássio (Moore, 2015). Entretanto, já foram descritas diversas toxinas que não apresentam a díade funcional com capacidade de bloquear o poro de canais de potássio com alta afinidade, sugerindo que a díade não se trata de um elemento essencial, porém exerce grande papel na ação dos peptídeos (Bartok et al., 2014).



**Figura 3 - Estruturas tridimensionais de KTxs:** **A** Gamma-KTx 1.1 (Q86QT3) **B** Delta-KTx LmKTT 1a (P0DJ46) **C** Alfa-KTx 1.1 (P13487) **D** Kappa-KTx 1.2 (P82851) **E** Epsilon-KTx 1.2 (P0C175) **F** Beta-KTx Tst (P0C2F3) **G** Lambda-KTx 2.1 (P86399). Em vermelho estão destacadas as estruturas  $\alpha$ -hélice e em amarelo as fitas- $\beta$ . As estruturas foram obtidas no banco de dados Uniprot.

## Toxinas que atuam em canais seletivos para Cálcio

A primeira toxina de escorpião descrita com atividade em canais de cálcio foi a imperatoxina A (IpTx A), isolada a partir da peçonha de *Pandinus imperator* (Valdivia et al., 1992). A IpTx demonstrou capacidade de induzir estados de sub-condicionamento em canais de rianodina (RyRs), aumentando a interação de [<sup>3</sup>H]rianodina às vesículas sarcoplasmáticas (Gurrola et al., 2010; Srairi-Abid et al., 2019). Em estudos desenvolvidos a partir da peçonha de outros escorpiões, toxinas semelhantes ao peptídeo IpTx foram descritas, como a Maurocalcinas, Hemicalcinas e Hadrucalcinas (Shahbazzadeh et al., 2007; Schwartz et al., 2009; Fajloun et al., 2000; Srairi-Abid et al., 2019).

Esse conjunto de toxinas (Tabela 8) é caracterizado por apresentar de 33 a 37 resíduos de aminoácidos, dos quais 6 são cisteínas (Srairi-Abid et al., 2019). Além disso, esse grupo de toxinas exibe um padrão estrutural diferente dos grupos mais comumente encontrados nas demais toxinas escorpiônicas conhecido como "*Inhibitory Cystine Knot*" (ICK) (Norton & Pallaghy, 1998; Pallaghy et al., 1994) garantido pelo pareamento uniforme das pontes dissulfeto: C1-C4/C2-C5/C3-C6 (com as cisteínas numeradas de 1 a 6 em ordem crescente, do N-terminal ao C-terminal), sendo que a ponte C3-C6 é responsável pela formação do anel de cruzamento (Isaacs, 1995; Carstens et al., 2016).

**Tabela 8 - Toxinas de cálcio descritas**

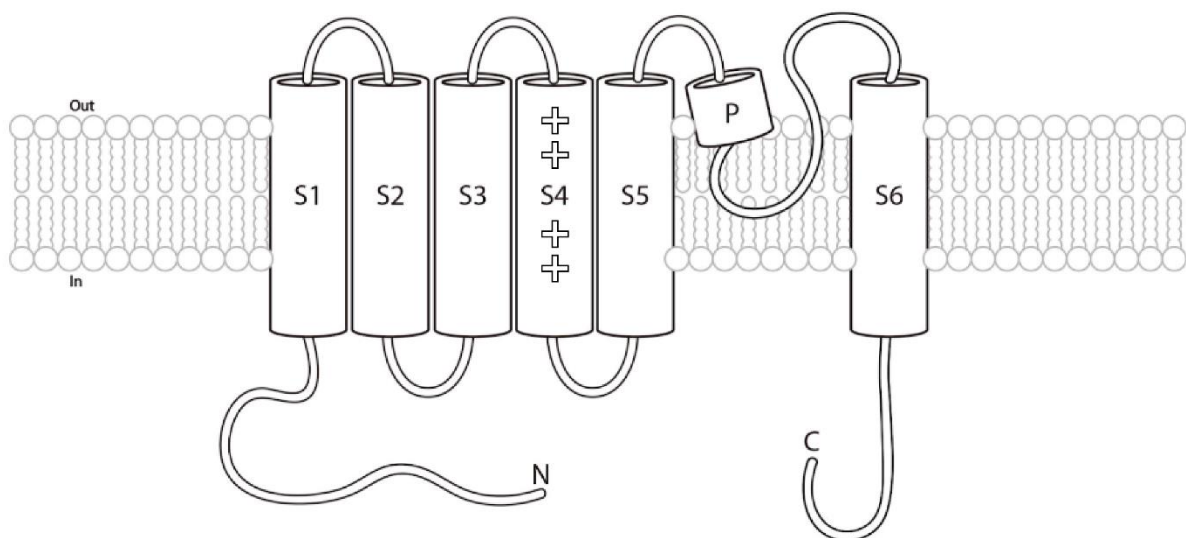
Toxina	Sequência	Nº Aminoácidos
Hadrucalcin	SEKDCIKHLQRCRENKDCSSKCKSRRGTNPEKRCR	35
Imperatoxin	--GDCLPHLKRCKADNDCCGKKCKRRGTNAEKRCR	33
Opicalcin_1	--GDCLPHLKRCKENNDCCSKKCKRRGTNPEKRCR	33
Opicalcin_2	--GDCLPHLKRCKENNDCCSKKCKRRGANPEKRCR	33
Maurocalcic	--GDCLPHLKLCKENKDCSSKCKRRGTNIEKRCR	33
Hemicalcin	--GDCLPHLKLCKADKDCSSKCKRRGTNPEKRCR ** : ** : * : : ** . ** . ** : * *****	33

## Canais Iônicos

Os canais iônicos dependentes de voltagem são proteínas transmembrânicas que possuem seletividade para um íon específico nos fluidos intracelulares e extracelulares. Essas proteínas são constituídas por um conjunto de quatro domínios transmembrânicos (Figura 4) que se unem

formando um poro de seletividade na região central e um sensor de voltagem na porção mais externa do canal. Os sensores de voltagem são responsáveis tanto pela detecção de variação de voltagem quanto pela mudança conformacional para promoção da abertura e fechamento do canal. Essa estrutura básica é preservada, mas cada tipo de canal dependente de voltagem apresenta modificações específicas (Scanziani & Häusser, 2009; Noebels, 2017).

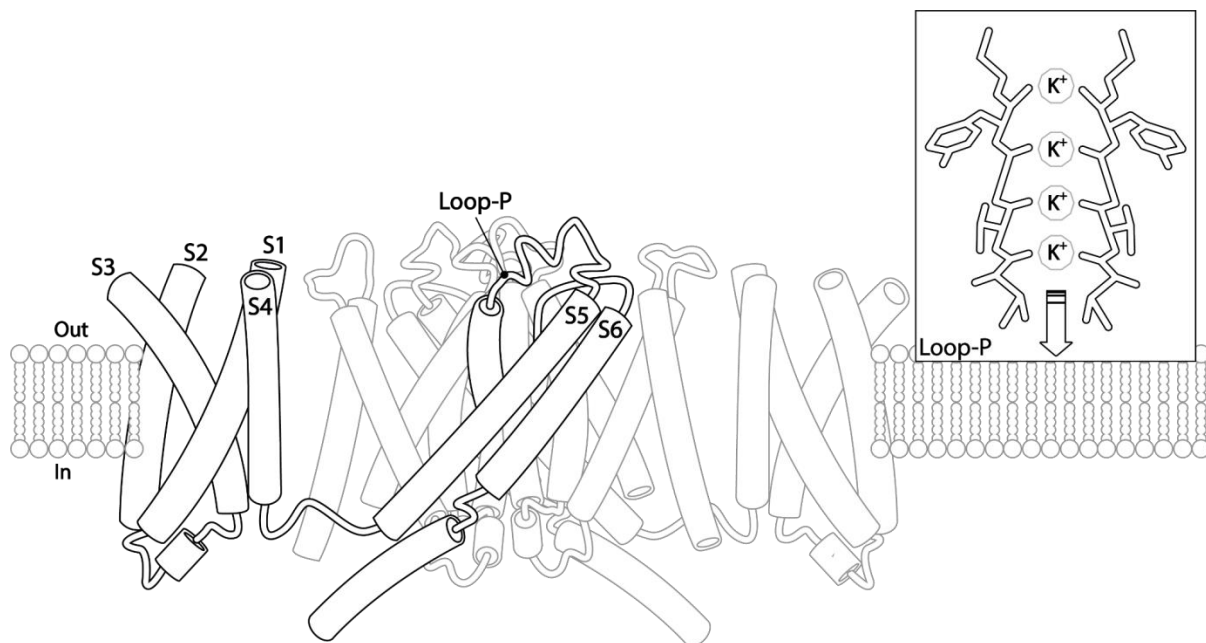
Os canais iônicos desempenham um papel essencial na geração e transmissão de sinais elétricos nas células. Os canais de sódio dependentes de voltagem são ativados por mudanças na voltagem da membrana, permitindo a entrada de íons de sódio e causando despolarização das membranas plasmáticas. Os canais de potássio, por sua vez, são ativados durante a despolarização, permitindo a saída de íons de potássio e repolarizando a membrana. Entre o processo de despolarização total da membrana e a repolarização, ocorre a ativação dos canais de cálcio, que apresentam limiar de ativação entre os canais de sódio e potássio, gerando o influxo do íon  $\text{Ca}^{2+}$  que, além de transmitir cargas positivas para dentro da célula, funciona como segundo mensageiro em respostas celulares (Catterall et al., 2017). Tal processo descrito é conhecido como potencial de ação, um mecanismo rápido de transmissão de sinais elétricos nas células. O potencial de ação é fundamental para a transmissão de informações no sistema nervoso e outros tecidos, ocorrendo com velocidade e amplitude constantes em condições ideais (Yu and Catterall, 2003; Catterall et al., 2017; Raghavan et al., 2019).



**Figura 4 - Representação esquemática de um domínio transmembrânico:** O domínio é formado por um conjunto de 6 segmentos. Os segmentos S1-S4 compõem a região sensor de voltagem, sendo o seguimento S4 carregado positivamente. Os segmentos S5-S6 são formadores de poro. O segmento P formador do filtro de seletividade.

## Canais de Potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ )

Os canais de  $K_v$  pertencem à família dos canais tetraméricos, formados por 4 subunidades idênticas. Cada subunidade possui 6 domínios transmembrânicos em  $\alpha$ -hélices (S1-S6), com os domínios S1-S4 formando um domínio de detecção de voltagem (VSD) e S5-S6 formando o domínio de poro condutor de íons (Yellen, 2002). A região S5-S6 abriga o *loop-P*, que por sua vez contém o filtro de seletividade que apresenta uma sequência de resíduos específica (Thr-Val-Gly-Tyr-Gly) que é altamente conservado nos canais de potássio e é conhecido como sequência de assinatura deste grupo de canais, responsável por coordenar os íons potássio. O filtro de seletividade formado no interior do poro é composto por 5 seções, onde, grupos carbonila presentes na estrutura proteica fornecem átomos de oxigênio que interagem com os  $K^+$ , fazendo com que se desloquem através do canal por um processo quase unicamente termodinâmico (Choe, 2002; MacKinnon, 2003). A estrutura formada pelas carbonilas permite que a passagem dos íons  $K^+$  seja coordenada com precisão, tornando possível a seleção de íons potássio sobre os íons sódio, que são relativamente menores quando comparados. Esta relação é possível porque em solução os íons interagem com o solvente, permanecendo envoltos por uma camada de moléculas de água (camada de solvatação) na faixa de  $80 \text{ kcal mol}^{-1}$  coletivamente. Ao interagirem com o canal iônico, as moléculas de água são substituídas pela interação com os átomos de oxigênio presentes no filtro de seletividade do *loop-P* (Figura 5). Os átomos de oxigênio do filtro estão posicionados de forma a favorecer uma interação em um raio de  $1,3 \text{ \AA}$ . Desta forma, as interações com átomos de  $Na^+$  se tornam inviabilizadas dado o raio de  $0,9 \text{ \AA}$  do  $Na^+$  desidratado (Choe., 2002; MacKinnon, 2003; Selvakumar et al., 2022).



**Figura 5 - Representação esquemática do canal de potássio dependente de voltagem com a união dos 4 domínios:** Em destaque, mais à esquerda está um domínio com seus seis segmentos, na região mais externa do canal se organizam os segmentos S1-S4 formando a região de sensor de voltagem. Na região mais interna do canal estão os segmentos S5-S6 formando o poro. A direita da imagem está uma representação do filtro de seletividade interagindo com íons potássio. Adaptado de Selvakumar et al., 2022

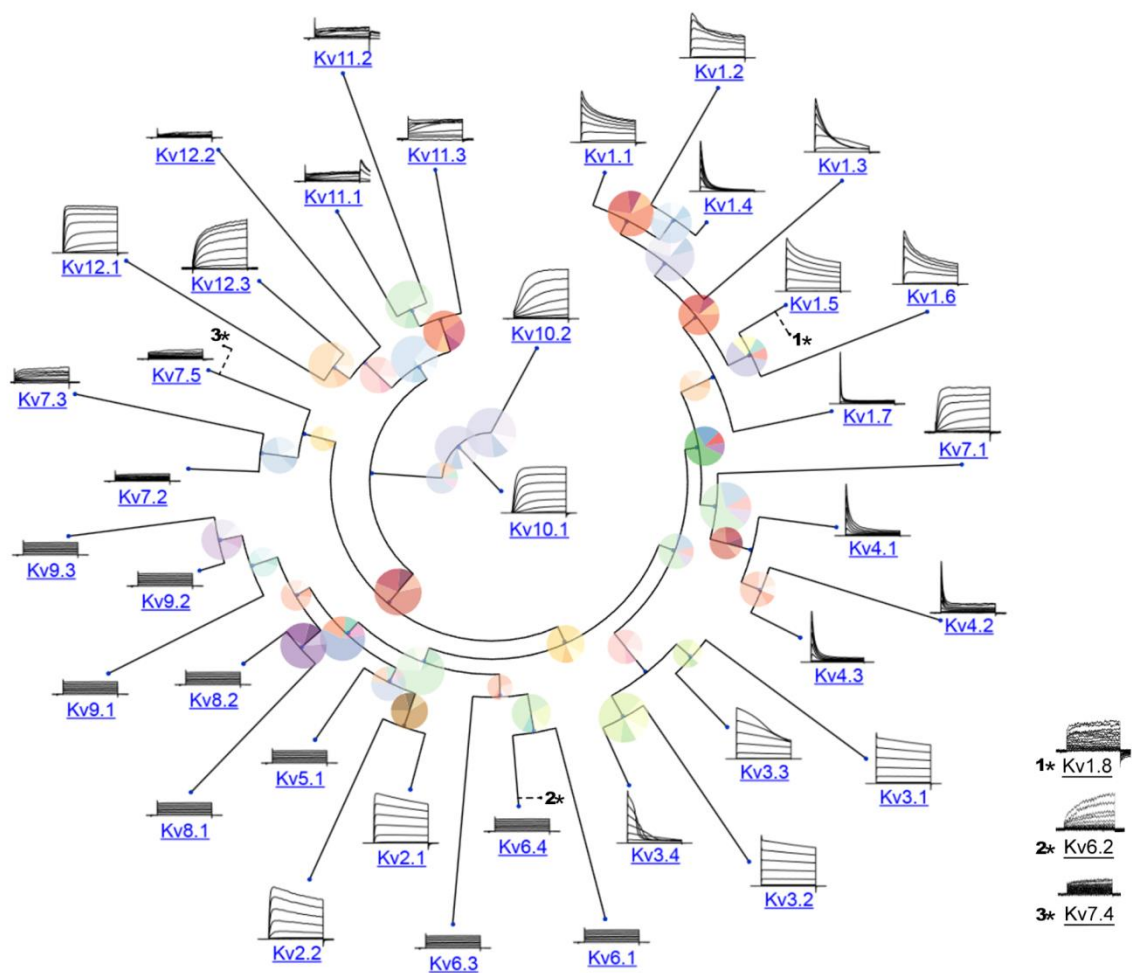
A ativação dos canais potássio dependentes de voltagem (Kv) se dá por meio de uma resposta envolvendo interações específicas entre diferentes segmentos transmembranares da proteína do canal. Um dos principais responsáveis pelo processo de abertura e fechamento do canal é o seu segmento S4. Para desempenhar esse importante papel, o segmento S4 é formado por uma estrutura em  $\alpha$ -hélice rica em aminoácidos básicos (Arg), os quais interagem com os aminoácidos ácidos dos segmentos S1 e S3, mas também, promovem interações por meio de pontes salinas com a região hidrofílica dos fosfolipídios de membrana (Choe., 2002; Jiang et al., 2003; Selvakumar et al., 2022).

O segmento S4 age como sensor de voltagem, sendo capaz de detectar variações no potencial elétrico transmembranar por meio do contato com as cabeças dos fosfolipídios. Essa detecção promove uma mudança conformacional do canal de potássio por meio do deslocamento do segmento S4 sobre os resíduos fixos dos segmentos S1 e S3, levando a mudança de estado do canal. Estudos sugerem a existência de cinco estados intermediários ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) associados ao S4, cada um correspondendo a diferentes deslocamentos e durações específicas ao longo do eixo do canal (Treptow et al., 2009; Delemotte et al., 2011). Esses deslocamentos estão intimamente relacionados à abertura ou fechamento do poro do canal. No

estado  $\alpha$ , o poro do canal está aberto, permitindo a passagem seletiva de íons potássio. Por outro lado, no estado  $\epsilon$ , ocorre o fechamento do poro por meio de interações que envolvem outros componentes do canal, como o resíduo de aminoácido F<sup>233</sup> presente no segmento S5. O movimento do S4, geralmente na faixa de 8 a 15 Å, está associado ao deslocamento do segmento S5, essa interação entre o S4 e o S5 contribui para o fechamento intracelular do canal. Esses processos de interação e conformação são de extrema importância para o funcionamento adequado dos canais de potássio regulados por voltagem, permitindo o fluxo seletivo de íons potássio e desempenhando papéis essenciais em várias funções celulares (Long et al., 2007; Delemotte et al., 2011; Kim & Nimigean, 2016)

A interação toxina-canal se dá por meio da superfície de contato da toxina com o canal iônico, e isso está intimamente relacionado com a distribuição dos aminoácidos específicos de interação na estrutura primária do peptídeo. Em um modelo de interação proposto em 2012 por Stehling e colaboradores, a interação toxina-canal das KTxS está associada à presença de resíduos de lisina na estrutura primária da toxina, não havendo diferenciação baseado na sua posição, mas sim, na interferência físico-química provocada pelos resíduos adjacentes (Stehling et al., 2012).

Os canais de potássio dependentes de voltagem apresentam uma grande diversidade de subtipos em células humanas, sendo a maior família de canais iônicos, com grande diversidade em humanos e apresentando padrões de correntes variadas em diferentes subfamílias (Figura 6). Isso se dá ao fato de cada subtipo de canal iônico ser caracterizado por um ganho de campo médio específico, atuando em uma tensão característica e faixa de frequência, associadas a variações presentes nas diferentes subunidades que constituem o canal (Martens et al., 1999; Jan & Jan, 2012).



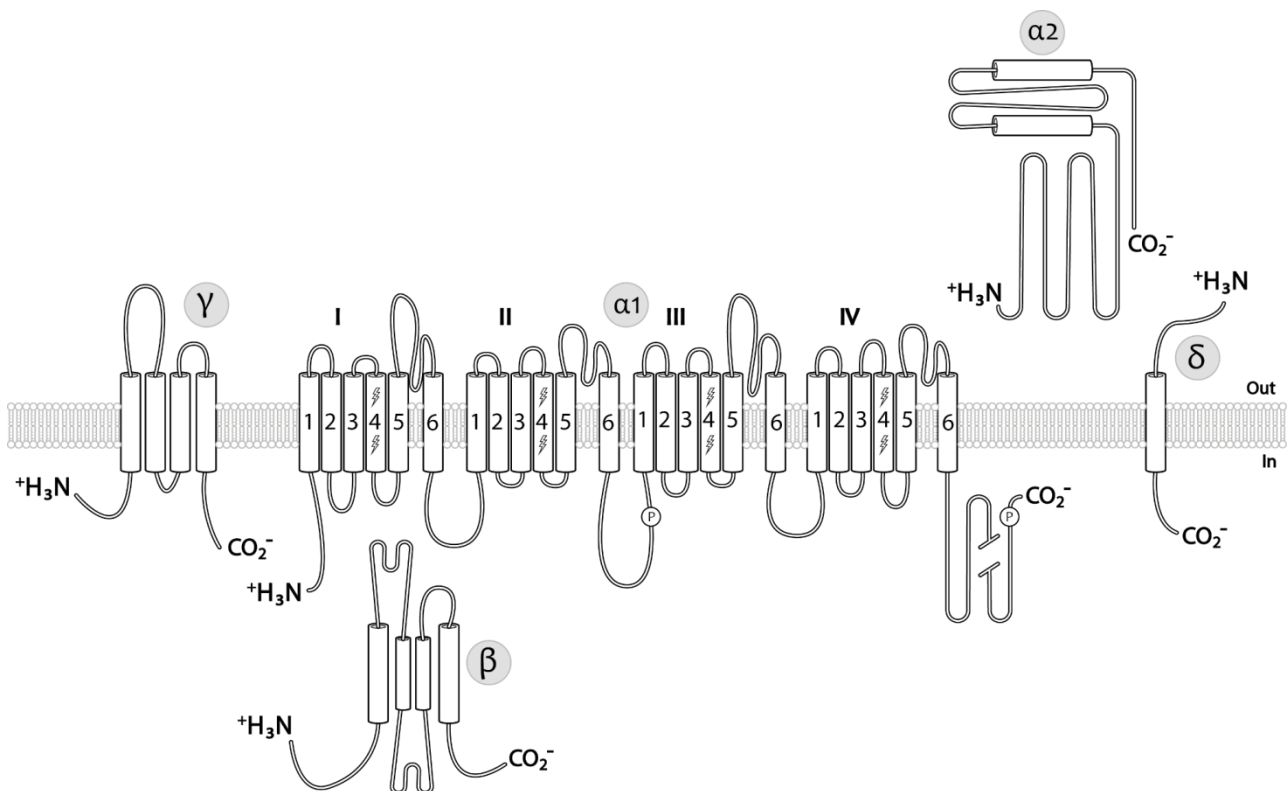
**Figura 6 - Diversidade de canais humanos de potássio dependente de voltagem:** Imagem adaptada de [channelpedia.epfl.ch](http://channelpedia.epfl.ch) acessado em 16 de junho de 2023.

### Canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav)

Assim como os Kv, os canais de cálcio dependentes de voltagem estão distribuídos em uma grande diversidade de tipos celulares. Esse grupo de canais é responsável pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta à despolarização de membrana mediada pelo potencial de ação. Nas células musculares cardíacas e lisas, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  desempenham um papel fundamental, aumentando diretamente a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  para promoção da contração muscular ou indiretamente por meio dos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à rianodina no retículo sarcoplasmático (Catterall and Few 2008).



Os canais de cálcio são formados por um conjunto de cinco subunidades:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , sendo de forma geral estruturados por um segmento  $\alpha 1$  associado a um dímero  $\alpha 2\delta$  por meio de pontes dissulfeto, uma subunidade  $\beta$  intracelular e uma subunidade  $\gamma$  transmembrânica (Figura 7). Os canais de cálcio seguem o mesmo padrão encontrado nos canais de Kv, no qual a subunidade  $\alpha 1$  é formada por quatro domínios repetidos (I-IV) e cada domínio possui seis segmentos transmembrânicos (S1-S6), sendo que entre os segmentos S5-S6 de cada domínio existe um *loop* que é responsável pela formação do poro iônico e os segmentos S1-S4 responsáveis pelos sensores de voltagem. As subunidades  $\alpha 1$  podem apresentar diferentes isoformas, produzindo assim, uma variedade de tipos de corrente: L, P, Q, N, R e T responsáveis por variações nas características farmacológicas (Tabela 9) (Catterall, 2011; Dolphin, 2016).



**Figura 7 - Representação esquemática do canal de Cálcio dependente de voltagem:** Representação das 5 subunidades formadoras de canal de cálcio ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Adaptado de Catterall, 2000

Os subtipos de canais Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4 são responsáveis pelas correntes do tipo L, caracterizadas por não dependerem de uma variação de voltagem de membrana para serem ativadas, além disso, os canais de cálcio do tipo L são caracterizados pela presença de

uma corrente prolongada quando o íon bário é utilizado como principal íon condutivo (conhecida como corrente de longa duração) e por serem sensíveis às dihidropiridinas. Entretanto, os canais de cálcio do tipo L são uma família funcionalmente heterogênea (Lipscombe et al., 2004; Triggle, 2006).

Os canais de cálcio Cav2.1 são responsáveis pela produção de correntes dos tipos P/Q, essas correntes se diferem nas velocidades de respostas a inativação. Nos neurônios de Purkinje, as correntes P são predominantes, com inativação lenta. Já nas células granulares cerebelares, as correntes Q têm inativação rápida. Essas diferenças podem ser atribuídas a associações moleculares de subunidades  $\beta$  e  $\alpha_2\delta$  expressas de maneira diferencial ou *splicing* alternativo dos genes dos canais de cálcio (Richards et al., 2007, Zhou et al., 2023). Outros dois subtipos da família Cav2 são responsáveis por produzir outras duas variedades de corrente, as correntes do tipo N, produzidas pelos canais Cav2.2, relacionados com o processo de exocitose em terminais pré-sinápticos em neurônios do sistema nervoso central e periférico (Catterall, 2000; McGivern, 2006). E as correntes do tipo R, produzidas por canais Cav2.3, que atuam como canais de resistência (sistema de redundância) a compostos que inibem as correntes dos outros representantes Cav 2 (Dolphin, 2016).

Por último, as correntes do tipo T são produzidas pelos subtipos Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3, presentes em diversos neurônios. Estes canais desempenham um papel importante na regulação da atividade de marca-passo assim como na regulação de disparos repetitivos de potenciais de ação e são caracterizados por serem ativados por pequenas variações de voltagem (*Low Voltage Activated*) (Taylor et al., 2008; Dolphin, 2016).

**Tabela 9: Tipos de correntes de cálcio e bloqueadores.**

Tipo de corrente	Distribuição	Farmacologia (Bloqueadores)
<i>Low voltage-activated</i>		
T	Neural, Cel. Marca passo	Amiloride, Ni <sup>2+</sup>
<i>High voltage-activated</i>		
L	Neural, Retina, Músculo cardíaco	<i>Dihydropyridines</i>
N	Neural	$\omega$ -Conotoxin GVIA

P	Neural	$\omega$ -Agatoxin IVA
Q	Neural	$\omega$ -Agatoxin IVA
<i>Intermediary voltage-activated</i>		
R	Neural	Ni <sup>2+</sup>

---

### Estudos com Toxinas de *Tityus fasciolatus*.

A partir da peçonha de *Tityus fasciolatus* já foram descritos seis peptídeos com atuação em canais iônicos: Tf1(Mendes et al., 2015), Tf1a (Mata et al., 2018), Tf2(Camargos et al., 2015), Tf3(Mendes et al., 2015), Tf4(Wagner et al., 2003) e Tf4a (Mendes et al., 2015). Todas descritas como atuantes em canais de sódio.

Seguindo a ordem cronológica, a primeira a ser descrita por Wagner e colaboradores em 2003 foi a Tf4. Esta toxina foi considerada um modulador de canal de sódio (Na<sup>+</sup>) dada sua semelhança com as toxinas TsTx-VI (Marangoni et al., 1990) e TsNTxP (Guatimosim et al., 1999) encontradas na peçonha da espécie *Tityus serrulatus*. Tf4, apesar de ser uma neurotoxina moduladora de canal de sódio, não teve efeitos detectáveis nas correntes de sódio ou potássio em células GH3 e não apresentou toxicidade em larvas de *Tenebrio molitor*, pelo menos nas condições experimentais realizadas nesse estudo (Wagner et al., 2003).

Em 2015, Mendes e colaboradores descreveram três novas toxinas, a Tf1, Tf3 e a Tf4a, por meio do uso de técnicas de identificação molecular e realizaram um mapeamento de epítomos lineares de células B. Todas as toxinas apresentaram um alto grau de similaridade com outras toxinas já descritas com atuação em canais iônicos seletivos para sódio (Mendes et al., 2015).

Ainda em 2015, foi apresentado um estudo com uma nova toxina isolada a partir da peçonha de *Tityus fasciolatus*, desta vez realizado por Camargos e colaboradores, onde foi apresentada a toxina Tf2. Esta toxina apresentou um grau de similaridade superior a 70% com outras 4 toxinas: Tst1, Tb1(Becerril et al., 1996), Ts1(Bechis et al., 1984) e To12(Guerrero-Vargas et al 2012). Neste estudo, a toxina Tf2 apresentou capacidade de modular correntes de

canais iônicos seletivos para sódio dependentes de voltagem do subtipo Nav 1.3 a uma concentração de 1µM utilizando a técnica de *Voltage Clamp* (Camargos et al., 2015).

Já em 2018, foi apresentada a última toxina descrita até o presente momento. Mata e colaboradores descrevem e apresentam dados de atividade da neurotoxina Tf1a. Utilizando a técnica de *Patch Clamp* em configuração *Voltage Clamp*, foi observado a capacidade da toxina em alterar da cinética de canais de sódio de humanos Nav1.1 a Nav1.7 e em canais de inseto e aracnídeo BgNav1 e VdNav1, respectivamente. Desta forma a Tf1a foi classificada como uma toxina β escorpiônica do tipo *like* (Mata et al., 2018).

No mesmo trabalho em que foi descrita pela primeira vez a toxina Tf2 (Camargos et al., 2015), foram apresentadas diversas sequências de cDNA obtida a partir da biblioteca transcritômica (Figura 8). Uma das sequências descritas sugere o que seria o precursor de uma possível toxina de potássio. Inicialmente foi proposta massa monoisotópica teórica proposta foi de 4.453,03 Da, que posteriormente foi observado que a sequência codificaria um peptídeo de massa teórica de 3.589,56 Da.

3	GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAG AAA ATG AAA TTT ATT ATT	47
	<b>M K F I I</b>	15
48	GCT CTA CTT CTC CTT ACT GCA TTA ACT TTA GCG TCA ATT CCC GTC	92
16	<b>A L L L L T A L T L A S I P V</b>	30
93	AGT GAA GCG ACA CAG AAG AAC TGT CGT TCC AAA AGG GAT TGC CAA	137
31	<u>S E A T Q K N C R S K R D C Q</u>	45
138	ACC GTG TGT ATG GTT GTT GAT AGA TGT CAA TAT GGA ACT TGT TAC	182
46	<u>T V C M V V D R C Q Y G T C Y</u>	60
183	TGC AAA GGA AAT GGA AAA TAA TAT TAA TGA AAT TAA TTC ATT CCT	227
61	<u>C K G N</u> <b>G K</b> *	
228	ATA TCG ATT ACA TTA TTT TCG TGA ATA AAC TAA AGA AAT AAA AAT	272
273	AAT TCT TTG AAT TTT TGT TTG GCC C-- 299	

**Figura 8 - Sequência precursora da toxina TfTx, obtida pela biblioteca transcritômica.** Estão apresentadas as sequências nucleotídica (superior) e de aminoácidos (inferior). Não sublinhado está o peptídeo sinal; sublinhado marca o peptídeo maduro proposto; em cinza está destacado o sinal de amidiação. Adaptado de Camargos, 2015.

No final da sequência, foram destacados dois resíduos de aminoácidos que sugere um sinal de amidiação do peptídeo maduro. Sequências de resíduos aminoácidos de peptídeos que

apresentam uma glicina seguida por resíduos básicos em sua porção C-terminal sugerem a formação de um sítio de interação com a enzima carboxipeptidase, que remove esses resíduos. Essa clivagem da sequência básica é um sinal para a adição de um grupo amida (-NH<sub>2</sub>) à extremidade C-terminal do peptídeo. Sendo importante para a atividade biológica de algumas toxinas.

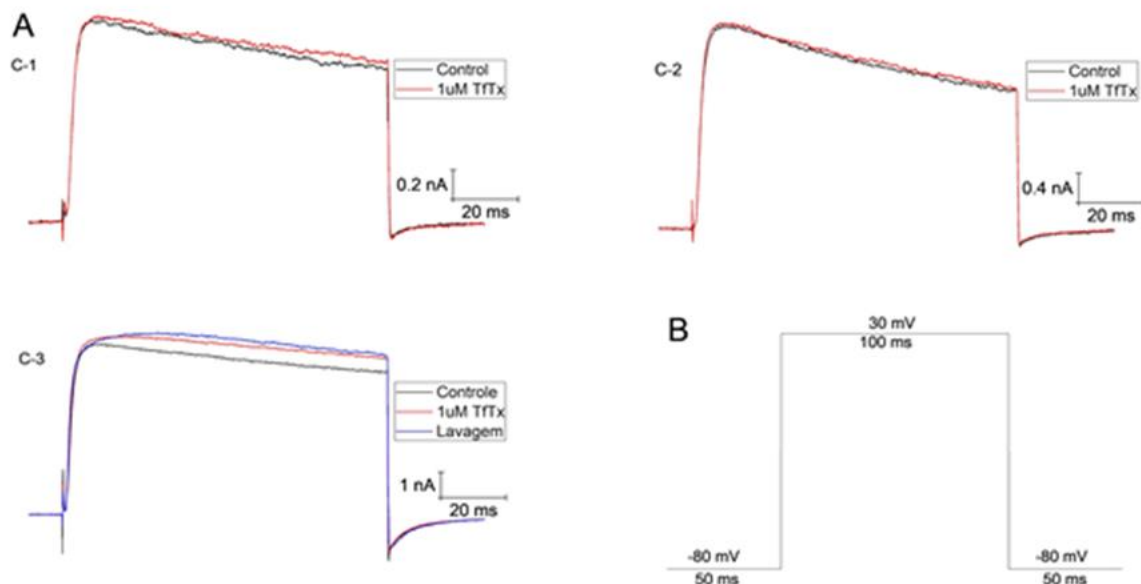
Zanotta (2006) a partir da peçonha de *Tityus fasciolatus* identificou a sequência de outros três peptídeos, os quais ela nomeou como Tf2.7 (2.750,24 Da), Tf3.5 (3.585,34 Da) e Tf14 (7.555,40 Da) (Figura 9). A Tf3.5 apresenta três ligações dissulfeto e 65% de identidade com a  $\alpha$ -KTx17.1 de *Mesobuthus martensii* (Li et al., 2003). A sequência do peptídeo Tf3.5 é compatível com precursor identificado na biblioteca transcritômica e com o peptídeo descrito posteriormente como TfTx (Figura 8). O peptídeo Tf2.7 apresentou atividade como bloqueador de correntes transientes de canais de potássio voltagem-dependentes. Os demais peptídeos não tiveram sua atividade avaliada.

Fração	Massa molecular experimental (Da)	Massa molecular teórica (Da)	Sequência N-terminal
(Tf2.7)	2.750,24	2.751,14	<sup>1</sup> ADIDFRGVPENIVKQIKETNAKPPA <sup>25</sup>
(Tf14)	7.555,40	-----	<sup>1</sup> KIYEX <sup>1</sup> CELAXELINXFNF <sup>18</sup>
(Tf3.5)	3.585,34	3.592,15	<sup>1</sup> TQKNCRSKRDCQTVCMVVDRQCQYGTCTCYCKGN <sup>30</sup>

X = resíduo não identificado.

**Figura 9** - Sequência das frações correspondentes aos peptídeos Tf2.7, Tf3.5, Tf14 isolados da peçonha de *Tityus fasciolatus*. Adaptado de Zanotta, 2006.

Em 2019 no departamento de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília, foram iniciados os experimentos de caracterização eletrofisiológica do peptídeo TfTx, onde, foram realizados ensaios preliminares utilizando a técnica de *patch-clamp* para avaliar a ação em canais de potássio dependentes de voltagem do subtipo Kv 1.3 (Figura 10). A uma concentração de 1  $\mu$ M, o peptídeo demonstrou uma inibição média de apenas 2,2% das correntes de potássio, indicando que ele não exerce uma atividade significativa nesses canais específicos.



**Figura 10 - Ensaio eletrofisiológico preliminar realizado por patch clamp para avaliar a atividade do peptídeo Tftx:** sendo C1, C2 e C3 as células testadas. Em A, registrado em preto está a corrente da célula sem a interferência da toxina, em vermelho, está registrada corrente após a aplicação da toxina. Em azul a corrente após a lavagem. Em B está representada a relação entre o tempo(ms) e corrente(mV).

Apesar das descobertas já realizadas ainda há um grande potencial a ser desvendado a respeito desta toxina. Este presente trabalho teve como objetivo dar continuidade a caracterização eletrofisiológica a fim de determinar a possível atividade da toxina em canais dependentes de voltagem  $K_V$  e  $Ca_V$ , assim como a confirmação da sequência primária do peptídeo.

## 2 – Justificativa

A regulação inadequada dos canais iônicos dependentes de voltagem está associada ao desenvolvimento de canalopatias, doenças causadas pela disfunção dos canais iônicos que podem resultar em diversos distúrbios, como a síndrome de Isaacs, fibrilação atrial, dores crônicas e certos tipos de epilepsia (Remme, 2013; Huang et al., 2019). Esses canais desempenham um papel crucial na transmissão dos sinais elétricos através das membranas celulares, permitindo a comunicação adequada entre as células. No entanto, quando ocorre um mau funcionamento desses canais, distúrbios de transmissão de sinais elétricos que afetam negativamente o funcionamento normal dos tecidos e órgãos são observados.

O estudo e desenvolvimento de moduladores de canais iônicos dependentes de voltagem oferecem uma perspectiva promissora para o tratamento dessas doenças. Esses moduladores são substâncias capazes de interagir com os canais iônicos, afetando sua atividade de maneira específica. Ao modular a função desses canais, é possível corrigir as alterações patológicas e restaurar a função normal das células.

Estudos realizados com compostos isolados a partir da peçonha de escorpiões possibilitaram a descoberta de peptídeos antiparasitários, antimicrobianos, bloqueadores e modulares de canais iônicos. Conhecer e entender essas moléculas abrem novas possibilidades para os avanços em estudos biomédicos, podendo contribuir com o avanço no tratamento de doenças relacionadas ao mau funcionamento de canais iônicos, transformando um efeito inicialmente prejudicial em uma ferramenta farmacológica benéfica na conduta terapêutica para canalopatias (Cologna et al., 2009; Menezes et al., 2020).

Atualmente, já foram descritos aproximadamente 3000 peptídeos com atividade em diferentes canais iônicos. É importante ressaltar que essa quantidade representa apenas uma fração do potencial total a ser explorado nas toxinas de escorpião. Estima-se que apenas cerca de 5% desse potencial tenha sido explorado até o momento.

A Tftx apresenta características que a descrevem como uma possível moduladora de canais iônicos seletivos para potássio, importantes na manutenção da transmissão do potencial de ação. Podendo contribuir com os estudos em canais iônicos e conseqüentemente das canalopatias.

### 3 – Objetivos

#### Objetivo geral

Caracterizar a estrutura e potencial atividade eletrofisiológica da toxina TfTx isolada a partir da peçonha de *Tityus fasciolatus* em canais iônicos K<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> dependentes de voltagem

#### Objetivos específicos

- Purificar o peptídeo TfTx por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
- Completar a sequência primária do peptídeo purificado.
- Descrever a estrutura tridimensional do peptídeo.
- Analisar o acervo de sequências de transcritos da biblioteca transcriptômica da glândula de peçonha de *T. fasciolatus*, em busca de KTxS – Acervo do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB.
- Avaliar a função do peptídeo isolado por meio de ensaios eletrofisiológicos pelo sistema *Patch clamp* em canais do tipo Ca<sub>v</sub> e K<sub>v</sub>.



## 4 – Metodologia

### Extração de peçonha bruta

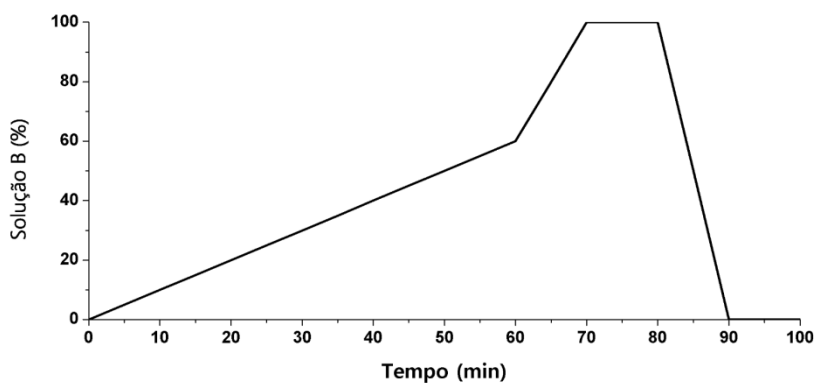
Os animais da espécie *Tityus fasciolatus* de ambos os sexos foram coletados na região na região de cerrado próximo a UnB sob licença do IBAMA n° 19138-1. Os animais foram acondicionados vivos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, mantidos em caixas plásticas com água e alimentados mensalmente com baratas.

A coleta da peçonha foi realizada uma vez ao mês, sempre 15 dias após a sua alimentação. A extração foi realizada com auxílio de um eletroestimulador, utilizando-o para estimulação da glândula secretora de peçonha presente no télson. O material secretado foi coletado em tubos de polietileno tipo *ependorf* de 1,5 mL. O material foi solubilizado em água Milli-Q, centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos para remoção do precipitado e o sobrenadante quantificado por espectrofotometria com luz UV a 280 nm (NanoVue® GE Healthcare) para proteínas totais, seco a vácuo (SpeedVac) e armazenado a -20°C.

### Purificação

#### Fracionamento da Peçonha Bruta

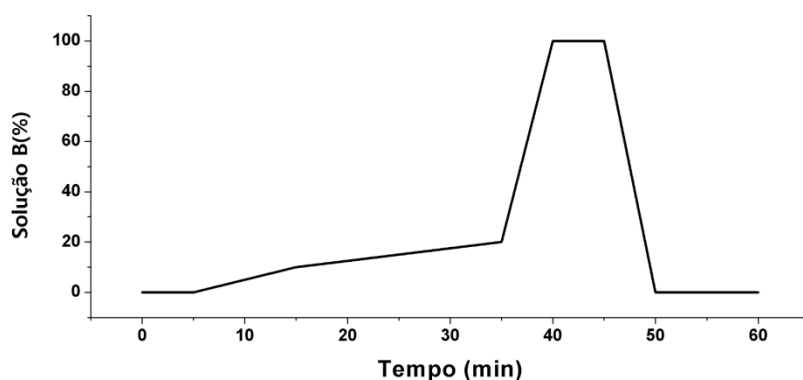
O material foi submetido ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência LC-10A Shimadzu Co. (Kyoto, Japão) em coluna semipreparativa C18 Phenomenex, mantida a uma temperatura constante de 26°C. Para a eluição, utilizou-se gradiente binário de solução A (0,12% ácido trifluoroacético - TFA em água) e de solução B (0,10% TFA em acetonitrila), com fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 216 e 280 nm de absorbância. O gradiente iniciou-se com 0% de B seguindo de 0 a 60% de B em 60 minutos; 60 a 100% de B em 10 minutos; e 100% de B mantidos pelos 10 minutos finais, para então equilibrar a coluna novamente na solução A (Figura 11). As frações cromatográficas foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20° C até seu uso.



**Figura 11 - Representação do protocolo de fracionamento da peçonha bruta.**

### **Purificação do peptídeo Tftx**

Após a etapa de fracionamento da peçonha bruta foi selecionada a fração correspondente as condições de eluição do peptídeo Tftx, baseado em estudos preliminares realizados em 2018. Para a segunda etapa de purificação foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Kinetex F5 Core-shell (15 cm × 4.6 mm). O gradiente iniciou-se com 0% de B onde permaneceu por 5 minutos; entre os minutos 5 e 15 a concentração de B passou de 0 para 10%, de 10 para 20% de B entre os minutos 15 e 35, e em seguida de 20 para 100% onde foi mantida por 10 minutos (Figura 12). Para esta etapa de purificação, a temperatura do forno do equipamento foi mantida a 40 °C durante todo o protocolo.



**Figura 12 - Representação do protocolo de purificação do peptídeo Tftx.**

## **Análise de massas moleculares**

A identificação das massas moleculares, validação das amostras e grau de pureza dos compostos foi realizada por espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF/TOF (MS). A dissolução das frações purificadas foi realizada em uma matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3% (2,5/2/0,5), na proporção 3:1(matriz:amostra). As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletido ou linear positivo, utilizando calibração externa. As amostras analisadas foram depositadas em uma placa do tipo Anchorchip (600 mm), secas à temperatura ambiente.

## **Quantificação dos peptídeos**

Os peptídeos puros foram quantificados utilizando o *kit* para proteína BCA *Protein Assay Kit*® (ThermoFischer) utilizando o protocolo *enhanced*. Os peptídeos foram diluídos em água Milli-Q, misturados com os reagentes do *kit* na razão 1:1 e incubados a 60 °C por 30 minutos. O produto da reação foi lido na absorvância de 562 nm utilizando um espectrofotômetro e quantificado por cálculo em curva padrão calibrada com albumina bovina.

## **Sequenciamento**

Para a realização do sequenciamento foi realizada a redução do peptídeo. Uma alíquota do material foi adicionada a uma solução redutora com DTT mantida a 80 °C por uma hora. Após a redução, o peptídeo foi alquilado com iodoacetamida e digerido enzimaticamente por endoproteínase Glutamil-C (Glu-C), em uma solução digestiva com acetato de amônia. Ao final da digestão o material foi seco a vácuo (SpeedVac) e armazenadas a -80 °C. Em parceria com o grupo de pesquisa do Dr Lourival D. Possani do Instituto de Biotecnologia da Universidade Autônoma do México (IBT-UNAM Cuernavaca – Morelos), o peptídeo de interesse foi submetido ao sequenciamento automático por meio da degradação de Edman em um sequenciador automático de proteínas modelo 477A da Applied Biosystems.

## **Cultura de células**

Células HEK (*Human Embryonic Kidney 293*) expressando canais iônicos K<sub>v</sub>1.3 e K<sub>v</sub>1.4 de forma estável foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10 % de Soro Fetal

Bovino e antibiótico G418 (0,4 mg/mL). Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) expressando canais iônicos hERG1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino e antibiótico G418 (0,5 mg/mL). As células foram incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### **Transfecção Transiente de canais de Cálcio**

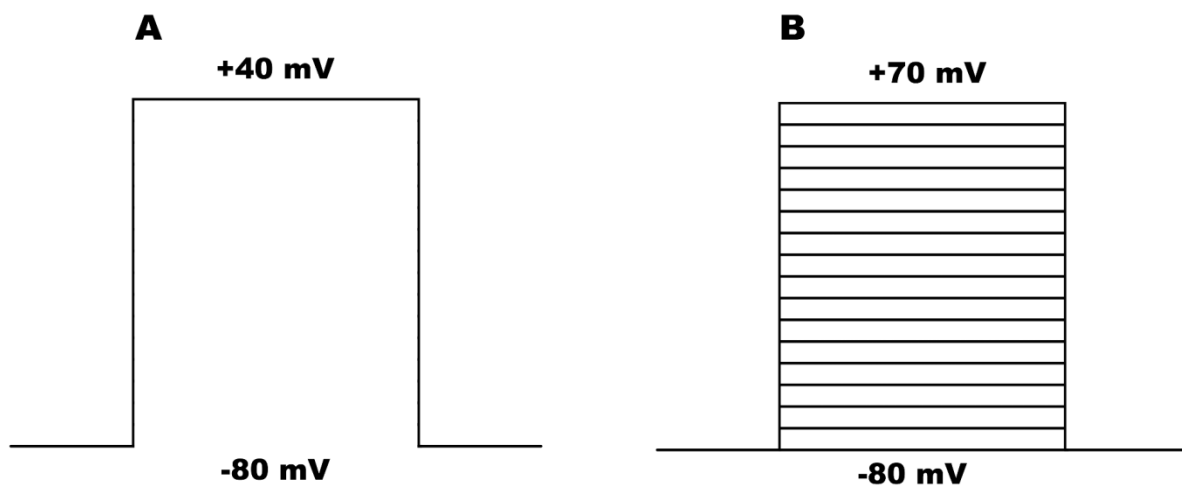
Células HEK 293T (*Human Embryonic Kidney SV-40 T-antigen*) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 4,5 % de Glicose, 10 % de Soro Fetal Bovino e 1 % de Antibiotic-Antimycotic® (Gibco). As células foram incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. A cultura de células HEK293T foi obtida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ. Células HEK293T cultivadas em placas de *petri* de 40x10 mm com confluência de 70- 90% foram transfectadas utilizando Lipofectamine3000® (ThermoFischer scientific) em meio Opti-MEM® (Gibco) com 4 plasmídeos simultaneamente: pcDNA6-CaV $\alpha$ , pcDNA3.1-CaV $\beta$ 3, pcDNA3.1- $\alpha$ 2 $\delta$ 1 e pEGFP-c1 em uma razão 1:1:1:0,1  $\mu$ g respectivamente.

### **Ensaio Eletrofisiológico**

#### **Ensaio eletrofisiológicos em canais de potássio dependentes de voltagem**

As macrocorrentes dos canais Kv foram estimuladas e registradas utilizando a técnica de *Patch Clamp*. O amplificador HEKA EPC 10 foi utilizado na configuração *Whole Cell*, juntamente com o *software* PATCHMASTER da HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Alemanha. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (21 a 25 °C). As pipetas foram preparadas imediatamente antes do uso utilizando vidro borosilicato e o equipamento Puller horizontal da Sutter Instruments, EUA. Após o preenchimento com a solução interna, as resistências das pipetas foram medidas e variaram entre 1,5 e 3,5 M $\Omega$ . Compensação da resistência em série e cancelamento de correntes capacitivas, a resistência em série foi mantida em aproximadamente 10 M $\Omega$  para todos os experimentos, sendo compensada em pelo menos 60%. As correntes capacitivas foram canceladas por meio de um protocolo online de estímulos p/4. Os parâmetros utilizados foram: número de vazamentos = 4, atraso de vazamento = 10,0 ms e tamanho do vazamento = 0,250. Um potencial de repouso de -100 mV foi aplicado para cancelar as correntes capacitivas e de vazamento.

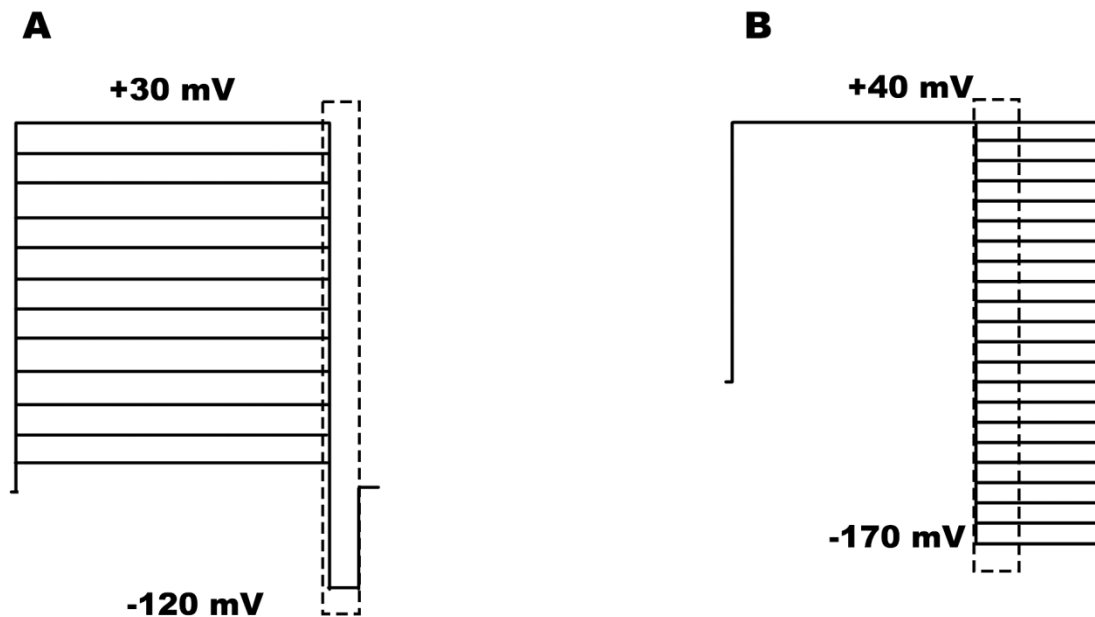
A composição das soluções: Solução intracelular em mM: 50 KCl, 60 KF, 10 NaCl, 20 EGTA e 10 HEPES, pH 7,2. Solução extracelular em mM: 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 glicose e 10 HEPES. Para aquisição dos dados foram utilizados dois protocolos: Protocolo de voltagem padrão: utilizado para evocar correntes de potássio mediadas pelos canais Kv. Consiste em uma série de despolarizações de 40 ms, variando de um potencial de manutenção de -80 mV a +40 mV, a fim de maximizar a probabilidade de abertura do canal (Figura 13A). No segundo protocolo, as correntes de potássio dependentes de voltagem foram evocadas pela aplicação de pulsos de despolarização a cada 25 segundos. O potencial inicial era de -80 mV, e em cada *sweep*, o potencial era incrementado em 10 mV até atingir um potencial de +70 mV. Em seguida, pulsos de repolarização foram aplicados até atingir -80 mV (Figura 13B).



**Figura 13 - Representação dos protocolos de canais do tipo Kv 1.4 e 3.1: A** protocolo de condicionamento de canais de potássio **B** protocolo de estímulo de canais de potássio com variação de voltagem.

Para células hERG1 foram preparadas soluções intracelular e extracelular diferentes, contendo em mM: 130 K-Aspartato, 10 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, pH 7,3 ajustado com NaOH. Solução extracelular contida em mM: 95 NaCl, 40 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 glicoses, pH 7,3 ajustado com NaOH. Para estudar a dependência de voltagem de ativação, foi utilizado o seguinte protocolo de estimulação: as correntes de cauda foram estimuladas por etapas de pré-condicionamento de 5 segundos, variando de +30 a -80 mV, seguidas por um pulso de 500 ms a -120 mV (Figura 14A). Para investigar a voltagem-dependência da inativação, as correntes foram eliciadas por um pulso de pré-condicionamento

de 1 segundo a 40 mV, seguido por etapas de despolarização variando de -170 mV a 40 mV (Figura 14B).



**Figura 14 - Representação dos protocolos de canais hERG1:** A protocolo de ativação correntes de cauda. Em B a representação do protocolo de inativação canais hERG.

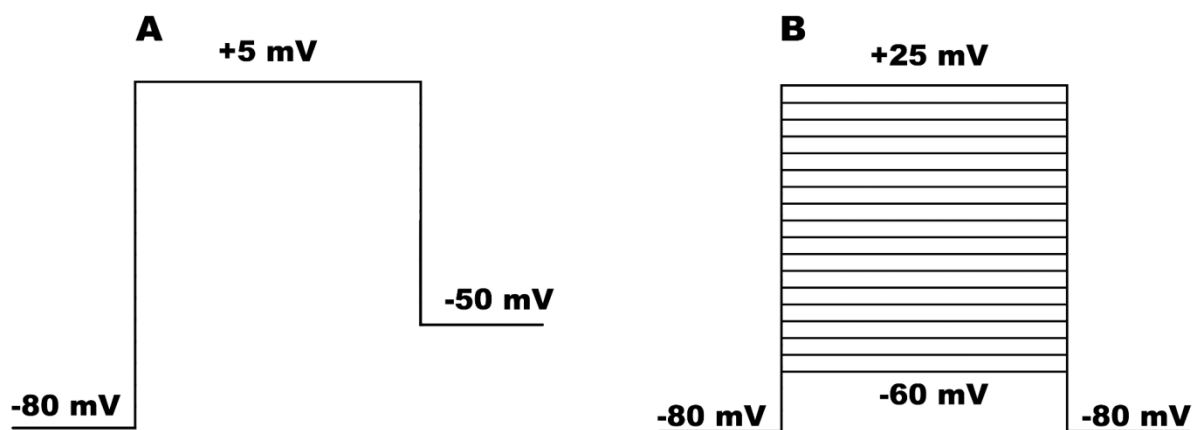
### Ensaio eletrofisiológicos em canais de cálcio dependentes de voltagem

As macrocorrentes dos canais  $Cav$  foram estimuladas e registradas utilizando a técnica de *Patch Clamp*. O amplificador HEKA EPC 10 foi utilizado na configuração *Whole Cell*, juntamente com o *software* PATCHMASTER da HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Alemanha. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, variando entre 21 e 25 °C. Para os experimentos, pipetas feitas de vidro borossilicato foram fabricadas imediatamente antes do início dos ensaios usando o *Puller* horizontal da Sutter Instruments, EUA. Após o preenchimento com a solução interna, as resistências das pipetas foram medidas e variaram entre 1,5 e 3,5 M $\Omega$ .

As correntes capacitivas foram canceladas por meio de um protocolo *online* de estímulos p/4, com a voltagem de repouso configurada para -100 mV. As micropipetas foram preenchidas com uma solução interna contendo os seguintes componentes em mM: 126 CsCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 4 Mg ATP (o pH foi ajustado para 7,3 com CsOH). As células foram

banhadas em uma solução externa contendo os seguintes componentes em mM: 5 BaCl<sub>2</sub>, 135 Colina-Cl, 10 HEPES, 4 MgCl<sub>2</sub> (o pH foi ajustado para 7,4 com CsOH).

As soluções foram entregues à célula sob o *patch* por meio de um sistema de perfusão. As correntes foram evocadas utilizando um protocolo inicialmente estimulado com despolarizações de 40 ms, a partir de um potencial de manutenção de -80 mV até +5 mV (Figura 15A). A relação corrente-voltagem (I/V) foi determinada estimulando as correntes a partir de -80 mV até 25 mV, com acréscimos de 5 mV por *sweep*, para determinar a voltagem que promove a corrente com a maior amplitude (Figura 15B).



**Figura 15 - Representação dos protocolos de canais do tipo CaV:** A protocolo de condicionamento de canais de cálcio. Em B a representação do protocolo de estímulo de canais de cálcio com variação de voltagem.

## Eletrofisiologia – Análise de dados

### Análise de dados – Ensaio em canais de potássio dependentes de voltagem

A condutância ao potássio ( $g_K$ ) foi calculada a partir das correntes obtidas na primeira parte do protocolo utilizando a lei de Ohm,

$$g_K = \frac{IK}{(V - V_{rev})}$$

Na equação mencionada, V representa o potencial de estímulo que ativou a corrente.  $I_K$  refere-se à corrente do íon potássio no potencial V.  $V_{rev}$  é o potencial de reversão do íon potássio, que é calculado utilizando a equação de *Nernst*, usada para determinar o potencial no qual não há fluxo líquido de íons potássio através do canal, ou seja, o ponto onde a corrente de potássio se inverte e se torna zero.

$$V_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_{Externa}}{[K]_{Interna}}$$

onde R é a constante dos gases ideais, T a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday, [K] Externa é a concentração do íon sódio no meio externo e [K] Interna é a concentração do íon sódio no meio interno.

Os dados experimentais foram ajustados em uma equação simples de *Boltzmann* para avaliar a probabilidade de abertura dos canais (pO),

$$g \text{ ou } pO = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/k\}}}$$

O valor de  $V_{1/2}$  representa a voltagem na qual metade dos canais está no estado aberto, enquanto k é o *slope* de voltagem, que descreve a inclinação da curva de ativação dos canais. Os valores de  $\Delta V_{1/2}$  foram calculados como a diferença entre o  $\Delta V_{1/2}$  na condição de controle e o  $\Delta V_{1/2}$  na presença do composto avaliado. Isso significa que  $\Delta V_{1/2} = \Delta V_{1/2} \text{ controle} - \Delta V_{1/2} \text{ composto avaliado}$ .

A porcentagem de canais de potássio foi estipulada pela seguinte fórmula,



$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{100 \times I_{\text{maxToxina}}}{I_{\text{maxControle}}} \right) - 100$$

### **Análise de dados - Ensaios em canais de cálcio dependentes de voltagem**

Nas correntes de cálcio em *Patch Clamp*, na configuração *Whole Cell*, é comum observar um fenômeno de diminuição da amplitude da corrente ao longo do tempo após a ruptura da membrana e diluição do citosol, conhecida como *Rundown*. Para minimizar esse efeito, técnicas como a *Perforated Patch Clamp* e a suplementação da solução interna da pipeta com ATP e inibidores de protease podem ser utilizadas. Essas abordagens visam obter registros de melhor qualidade e correntes mais estáveis. Para avaliar a porcentagem de bloqueio de um composto em um canal que sofre *Rundown*, é necessário estimar o valor da corrente de controle (*IPred*) no mesmo intervalo de tempo em que é medida a corrente na presença do composto. Essa estimativa é feita considerando a tendência linear na ausência da toxina e levando em conta o número de *sweeps* decorridos desde a aplicação da toxina.

A corrente controle foi estipulada com a seguinte fórmula:

$$I_{\text{pred}} = \frac{(I_{\text{LavagemToxina}} - I_{\text{Controle}})}{(\#SW_{\text{lavagemToxina}} - \#SW_{\text{Controle}})(\#SW_{\text{Toxina}} - \#SW_{\text{Controle}}) + I_{\text{Controle}}}$$

As seguintes medidas foram utilizadas para avaliar as diferenças entre as correntes em um experimento com toxina: *IControle*: amplitude da corrente do último *sweep* antes da aplicação da toxina. *IToxina*: amplitude da corrente avaliada na presença da toxina. *ILavagemToxina*: amplitude da corrente do último *sweep* durante a lavagem da toxina. *IPred*: amplitude da corrente de controle assumindo o comportamento linear de *Rundown*. *#SWControle*: número do *sweep* no qual a *IControle* foi medida. *#SWToxina*: número do *sweep* no qual a *IToxina* foi medida. *#SWLavagemToxina*: número do *sweep* no qual a *ILavagemToxina* foi medida.

A porcentagem de inibição (*%Inib*) foi calculada da seguinte maneira:

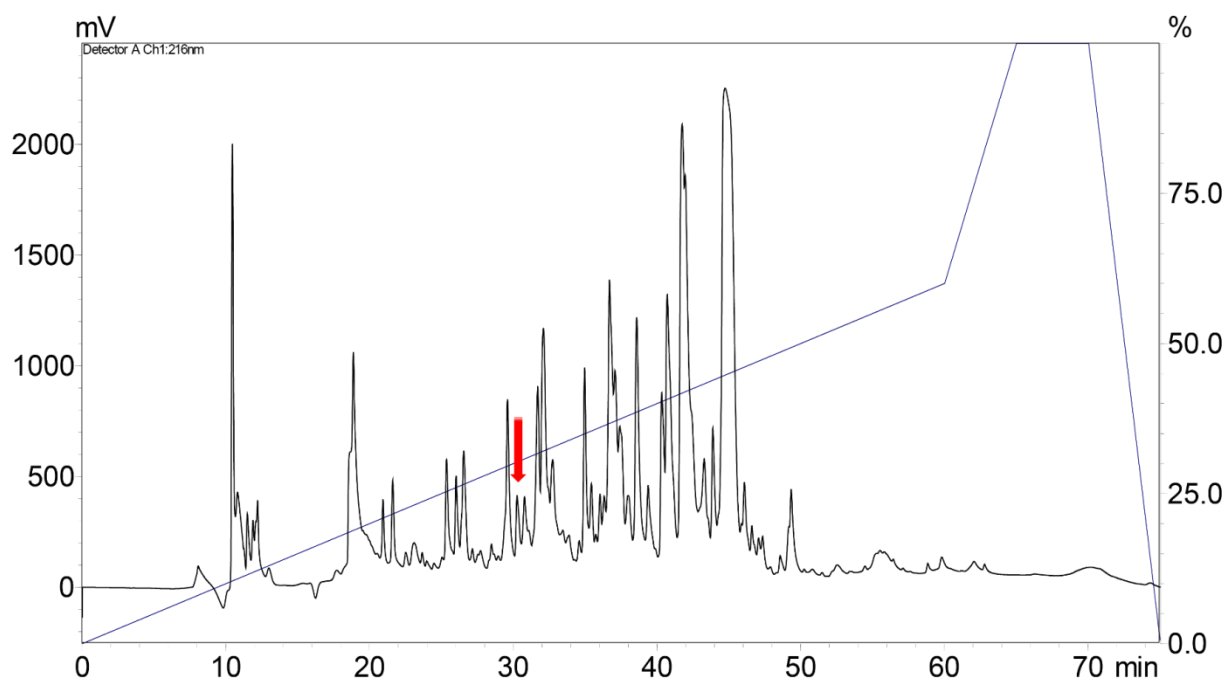
$$\% \text{ inibição} = \frac{(IToxina \times 100)}{Ipred} - 100$$

Foram utilizados o Teste T pareado para avaliar as diferenças entre as médias e consideramos significativas aquelas em que o valor de  $p < 0,05$ . As análises foram conduzidas utilizando o *software* GraphPad Prism 8.

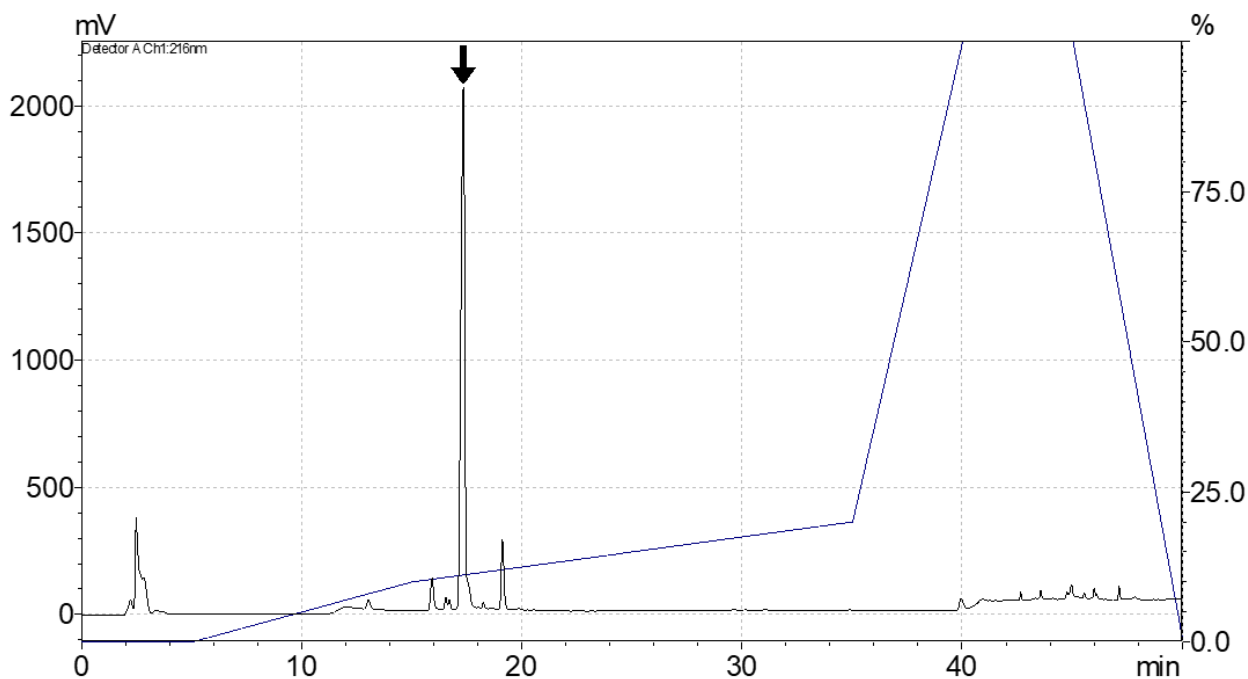
## 5 – Resultados

### Purificação

Foram extraídos 46 miligramas de peçonha de *Tityus fasciolatus*. O material foi separado em duas etapas de cromatografia. Na primeira etapa foi utilizada uma coluna semi-preparativa C18 (Phenomenex), foi selecionada a fração que eluiu em 30,83% de acetonitrila em 31 min (Figura 16). Essa fração foi novamente submetida a cromatografia, desta vez utilizando colunas analíticas Kinetex C18, Core Shell C18, Core Shell F5 (Phenomenex) com novos parâmetros para otimização do método e obtenção do peptídeo de interesse. O peptídeo de interesse eluiu em 12,6% de acetonitrila em 17,8 min (Figura 17).

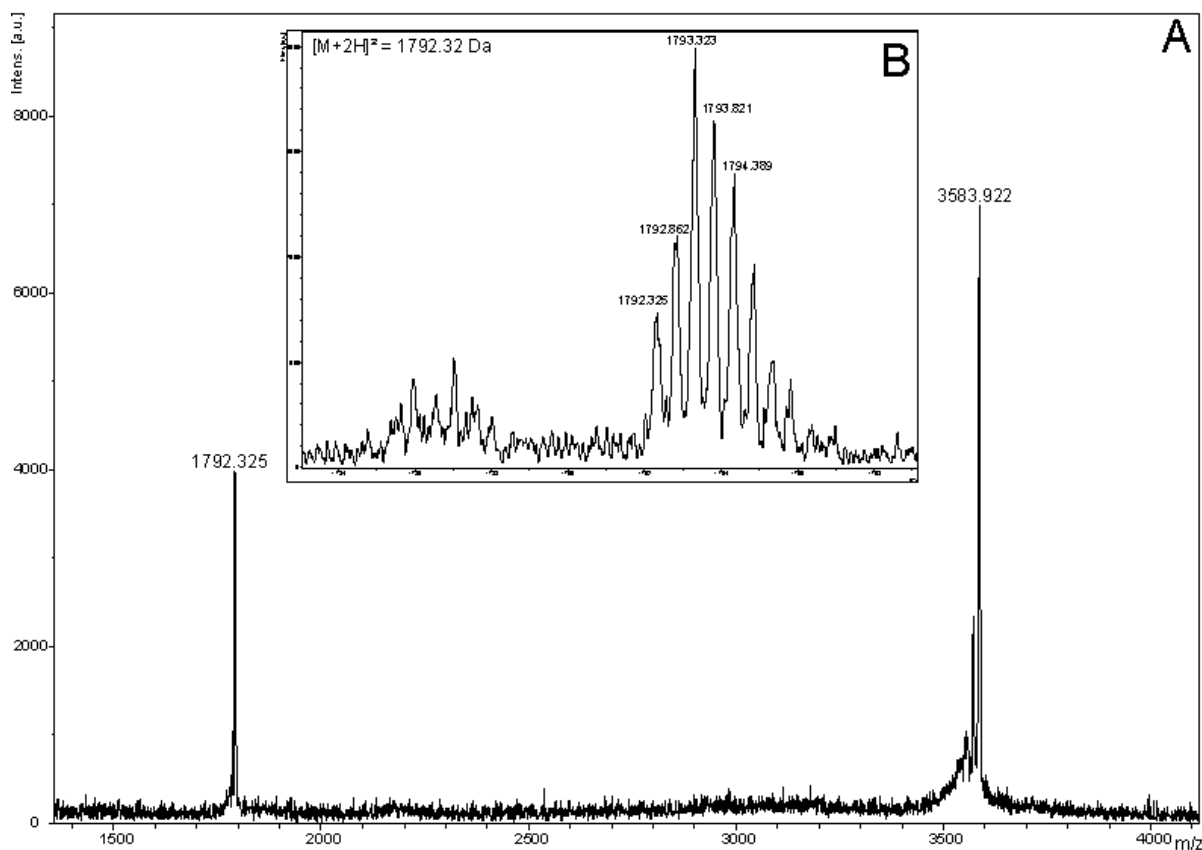


**Figura 16 - Fracionamento da peçonha bruta de *Tityus fasciolatus*.** Perfil cromatográfico de 5mg de de peçonha bruta de *Tityus fasciolatus* por RP-HPLC, em um gradiente de 100% de A (0,12% ácido trifluoroacético, TFA e água) a 60% de B (0,10% TFA e acetonitrila) em 60 minutos com um fluxo de 1,5 mL/min. A seta indica a fração cromatográfica selecionada.



**Figura 17 - Purificação do peptídeo TfTx:** Purificação da fração 17 de *Tityus fasciolatus*. O peptídeo eluiu por volta dos 17 min em aproximadamente 12% de B. foram identificados e separadas ao todo 7 frações cromatográficas nesta segunda etapa. A seta indica a fração cromatográfica selecionada

Após a segunda etapa de cromatografia foi realizada a validação da massa molecular da amostra por MALDI TOF/TOF no modo linear. A massa monoisotópica experimental do peptídeo TfTx foi de 3583,64 Da. Foram obtidos 86,2 µg de peptídeo puro (Figura 18).



**Figura 18 - Espectro de massas TftX:** **A**, Verificação de massas por MALDI TOF/TOF. Massa molecular média  $[M+H]^+$  de 3583,6 Da do peptídeo TftX utilizando a técnica de espectrometria de massa (MS) no modo linear. **B**: Massa molecular monoisotópica de  $[M+2H]^{2+}$  de 1792,3 Da utilizando a espectrometria de massa no modo refletido.

### Sequenciamento

Após a purificação, peptídeo TftX foi submetido ao sequenciamento automático por meio da degradação de Edman (Tabela 10) em um sequenciador automático de proteínas modelo 477A da Applied Biosystems. Esta etapa foi realizada em parceria com o Instituto de Biotecnologia da Universidade Autônoma do México (IBT-UNAM Cuernavaca – Morelos).


**Tabela 10 – Sequência obtida por meio da degradação de Edman**

	Massa molecular experimental (Da)	Massa molecular teórica (Da)	Sequência
TftX	3.583,64	3.591,58	TQKNCRSKRDCQTVCMVVDRCQYGTCYCKGN
	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$	

## Alinhamento de seqüências

A seqüência da Tftx foi submetida a investigação por similaridade usando o programa BlastP disponível *online* em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os alinhamentos de seqüências foram realizados pelo programa Clustal Omega disponível *online* em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Foram realizadas busca com o precursor e sem o precursor do peptídeo. Nas buscas considerando o precursor foram obtidas 6 seqüências com diferentes peptídeos moduladores e possíveis moduladores de canais de potássio (Figura 19).

Toxina	Seqüência	n° aa
Tftx	MKFIIALLLLTALTLASIPVSEATQKNCRSKRDCQTVCMVVDRCQYGTCTCYCKGNGK	56
AlphaKTx_17.2	MKTIIVLLLLLIVAAAVPKARR-QTECQIKNDCQRYCQSVKECKYKCYCNYAG-	54
AlphaKTx_17.1	MKFIIIVLILISVFIATIVPVSES-QNQCQTVRDCQPYCATPDRCLYGTCTCYCKTTGK	55
pMeKTx_7.4	MKFIIIVLILISVFIATIVPVNEA-QTQCQSVRDCQYCLTPDRCSYGTCTCYCKTTRK	55
pMeKTx_7.3	MKFIIIVLILISVFIATTVPMESEA-QRQCQHVRNCYKYCESPEKCFGTCTCYCKPPGK	55
pMeKTx_7.1	MKFIIIVLILISVLIATTVPVSEA-QRQCQTVQDCYKYMTPKRCTYGTCTCYCYPFFK	55
pMeKTx_7.2	MKFIIIVLILIGVLIATTVPMESEA-QRQCQTVRDCYKHCQSPKRCTLGTCYCEPPGK	55
	** ** *.*: . . : : * . * : * : . : * * . . * * . **	



**Figura 19 - Alinhamento múltiplo com peptídeos que apresentaram similaridade na avaliação com precursor:** Foram apresentadas seqüências que correspondem aos peptídeos  $\alpha$ -Ktx 17.1 isolado da peçonha de *Mesobuthus martensii*,  $\alpha$ -Ktx 17.2 *Lychas mucronatus* e os peptídeos pMeKtx7.1, pMeKtx7.2, pMeKtx7.3 e pMeKtx7.4 isolados da peçonha de *Mesobuthus eupeu*. O padrão de formação de pontes dissulfeto estão indicados pelas setas coloridas na parte inferior da imagem. As sequencias foram obtidas no banco de dados Uniprot.

Nas buscar sem o precursor foi disponibilizado um número menor de seqüência, onde 2 novos peptídeos aparecem, o ClINTx e o Peptídeo A. Além as seqüências correspondentes  $\alpha$ -Ktx 17.1(BmKK4) e pMeKtx7.4 continuaram apresentando um alto grau de similaridade com a Tftx (Figura 20).

Toxina	Sequência	n° aa	ID (%)
TfTx	TQKNCRSKRDCQTVCMVVDRQCQYGTCTCYCKGN--	31	
BmKK4	--TQCQSVRDCQYCLTPDRCSYGTCTCYCKTTX-	30	65,38
pMeKTx7-4	--NQCQTVRDCQPYCATPDRCLYGTCTCYCKTTGK .:*:: **** * . *** ***** .	31	58,62

Toxina	Sequência	n° aa	ID (%)
TfTx	TQKNCRSKRDCQTVCMVVDRQCQYGTCTCYCKGN	31	
ClINTx	--KYCYNDDDCCKSECMVVKYCQQGTCTCYCKGN	29	61,29
PeptideoA	--KYCYNDDDCCKSECMVVKYCQQGTCTCYCKGN * * .. *: : **** . ** *****	29	58,06

**Figura 20 - Alinhamento múltiplo com peptídeos que apresentaram similaridade na avaliação sem precursor:** Foram apresentadas sequências que correspondem aos peptídeos  $\alpha$ -Ktx 17.1 isolado da peçonha de *Mesobuthus martensii*, peptídeo pMeKtx7.4 isolados da peçonha de *Mesobuthus eupeus* e outros dois peptídeos com atividade ainda não descritas. ClINTx isolada da peçonha de *Centruroides limpidus* e o Peptídeo A isolado da peçonha de *Centruroides hirsutipalpus*. As sequencias foram obtidas no banco de dados Uniprot.

Foram realizados alinhamentos com toxinas moduladoras de canais de cálcio isolado a partir da peçonha escorpiões da família *Buthidae*. As sequências foram alinhadas a partir das cisteínas. O primeiro alinhamento foi realizado entre a TfTx, a Kurtoxina e as Kurtoxins-like I e II (Figura 21).

Toxina	Sequência	n° aa
TfTx	-----TQKNCR-----SKRDCQTVCMVVDR-----CQYGTCTCYCKGN-----	31
Kurtoxin	KIDGYPVDYWNCKRICKWYNNKYCNDLCKGLKADSGYCWGWTLSYCQGLPDNARIKRSGRCA	63
Kurtoxin-like_II	KIDGYPVDYWNCKRICKWYNNKYCNDLCKGLKADSGYCWGWTLSYCQGLPDNARIKRSGRCA	63
Kurtoxin-like_I	KIDGYPVDNWNCKRICKWYNNKYCYDLCKGLKADSGYCWGWTLSYCEGLPDNARIKRGGRCN- **: .:: * :* :. : :***:*	62

**Figura 21 - Alinhamento múltiplo com Toxinas moduladoras de canais de cálcio:** Foram alinhadas com a TfTx as toxinas Kurtoxina descrita a partir da peçonha de *Parabuthus transvaalicus* e as Kurtoxins-like I e II. descritas a partir da peçonha de *Parabuthus granulatu*. As sequencias foram obtidas no banco de dados Uniprot.

O segundo alinhamento foi realizado entre a TfTx, e possíveis toxinas moduladoras de canais de cálcio isolado a partir da peçonha escorpiões da família *Buthidae* Ts32, Tcis 32 e BmCa1 (Figura 22). Os grupos foram separados para otimizar o alinhamento com os diferentes peptídeos

Toxina	Sequência	nº aa
TfTx	-----TQKNCRSKRDCQTVCMVDRQ--YGTCYKGN---	31
Ts32	MNPKLLIVIGLLLATGVCSFAKALDEESLRKECNHLNEPCDSDGDCCT---SSEQCISTGSKYFKGKQGP	68
Tcis32	MNRLYLIIIGLLLATAACCLAKSVGEE-ARGGCNKLGGKNSDSDCCR---YGEQCLSSGSGYYKLDPGP	67
BmCa1	--MNTF-VVVFLLLTAILCHAEHALDE-TARGCNRLNKKNSDGDCCR---YGERCISTGVNYYRPFDFGP	64
	: * * . **            : :*            :* : .	

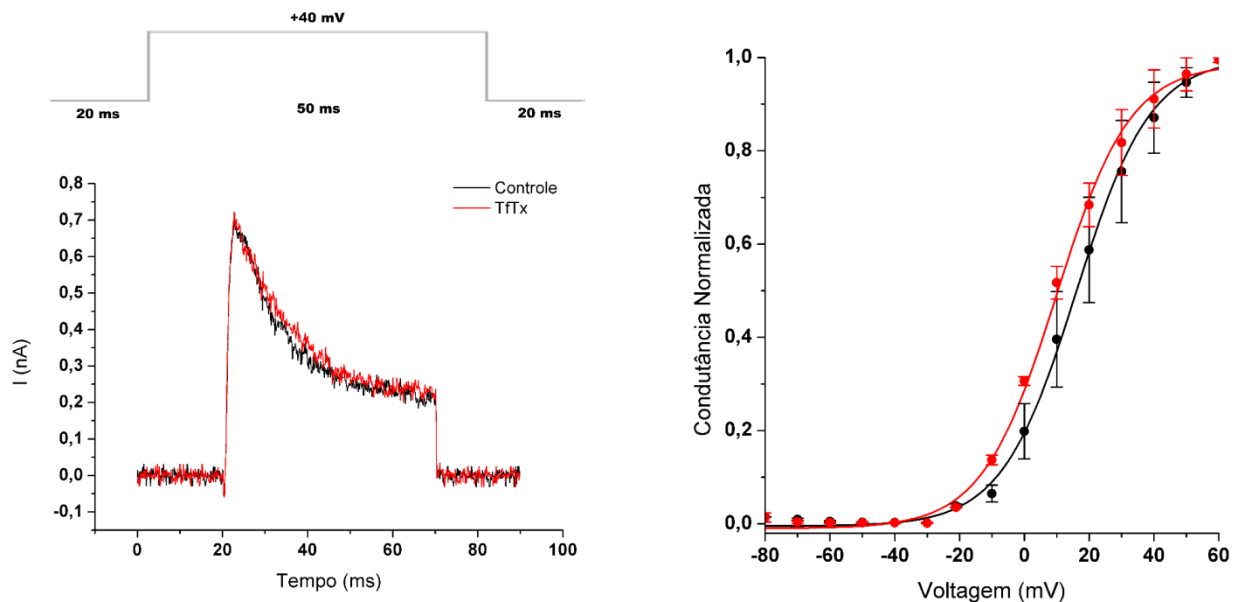
**Figura 22 - Alinhamento múltiplo com Toxinas moduladoras de canais de cálcio:** Foram alinhadas com a TfTx as toxinas Ts32 descrita a partir da peçonha de *Tityus Serrulatus*, Tcis32 descrita a partir da peçonha de *Tityus cisandinus* e a BmCa1 descrita a partir da peçonha de *Mesobuthus martensii*. As sequencias foram obtidas no banco de dados Uniprot.

### Eletrifisiologia em canais de potássio dependentes de voltagem

O peptídeo TfTx teve sua atividade avaliada nos subtipos de canais de potássio dependentes de voltagem Kv1.4, Kv.3.1 e hERG (Kv11.1) as análises foram realizadas através de ensaio eletrofisiológico para a avaliação da capacidade de alterar a amplitude da corrente pelo parâmetro de porcentagem de inibição, a probabilidade de abertura durante a ativação ( $\Delta_{1/2}$ ativação).

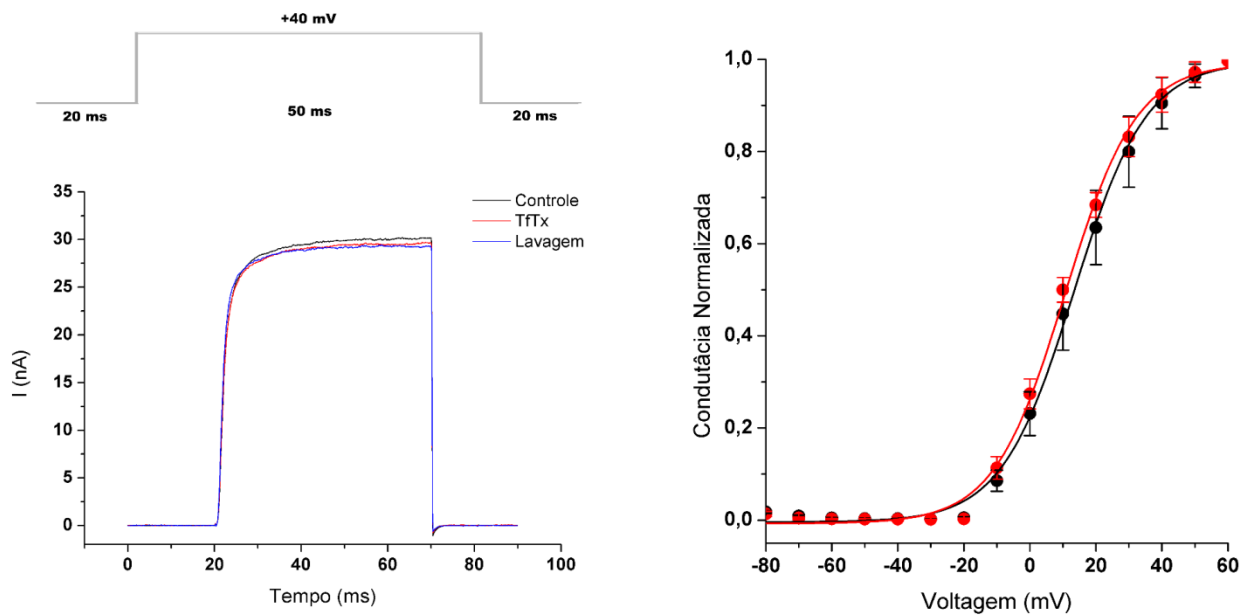
Em canais Kv1.4 a uma concentração de 1  $\mu$ M a toxina TfTx não apresentou atividade, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação. Foi observado que a TfTx promoveu uma inibição de  $1,7 \pm 1,4$  % (Figura 23) com uma variação na voltagem de ativação de  $2,6 \pm 0,01$ , onde foi realizado um n amostral de 4 células. Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0.05$ ).





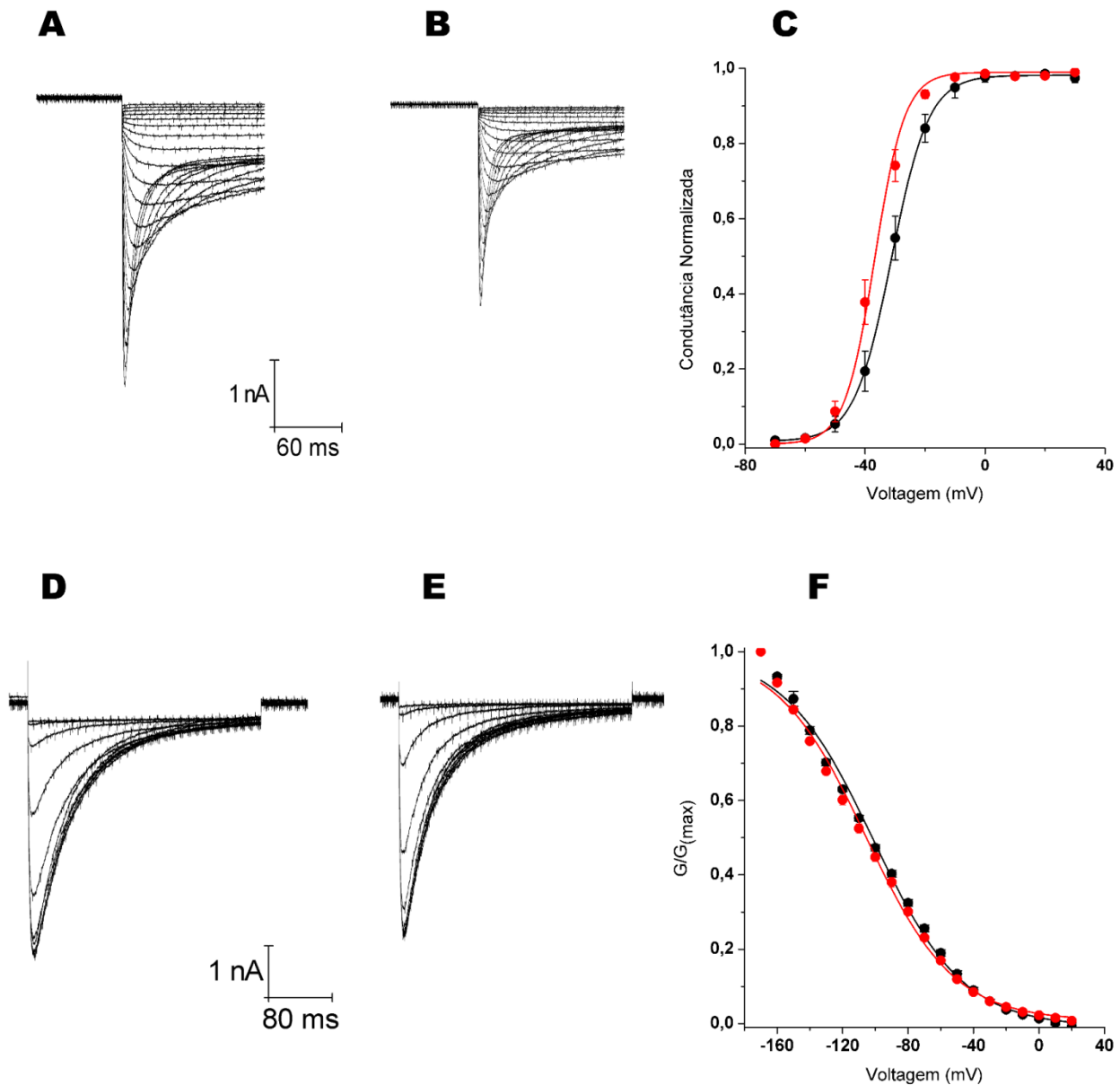
**Figura 23 - Avaliação da toxina TftX em canais dependentes de voltagem Kv1.4:** As correntes foram avaliadas na presença de solução externa e na presença de 1  $\mu$ M de TftX. A esquerda, estão representados o traço controle (em preto) na maior amplitude registrada e a mesma condição (em vermelho) na presença da toxina. A direita, o registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com TftX.

Da mesma forma em canais Kv3.1 uma concentração de 1  $\mu$ M a toxina TftX não apresentou atividade, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação. Foi observado que a TftX promoveu uma inibição de  $3,4 \pm 2,8$  % (Figura 24) com uma variação na voltagem de ativação de  $2,4 \pm 0,04$ , onde foram analisadas um total de 6 células. Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 24 - Avaliação da toxina TftTx em canais dependentes de voltagem Kv3.1:** As correntes foram avaliadas na presença de solução externa e na presença de 1  $\mu$ M de TftTx. À esquerda, estão representados o traço controle (em preto) na maior amplitude registrada e a mesma condição (em vermelho) na presença da toxina e o registro de lavagem (em azul), realizado após a aplicação do tratamento, com a remoção da toxina para avaliar a recuperação do canal. À direita, o registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento(vermelho) com TftTx.

Em canais hERG a toxina TftTx não apresentou atividade uma concentração de 500 nM, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação e inativação. Foi observado que a TftTx promoveu uma inibição de  $5,7 \pm 0,6$  % (Figura 25) com uma variação na voltagem de ativação de  $5,7 \pm 0,1$  e uma variação na voltagem de inativação de  $3,4 \pm 0,3$ . Foram analisadas um total de 7 células. Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).



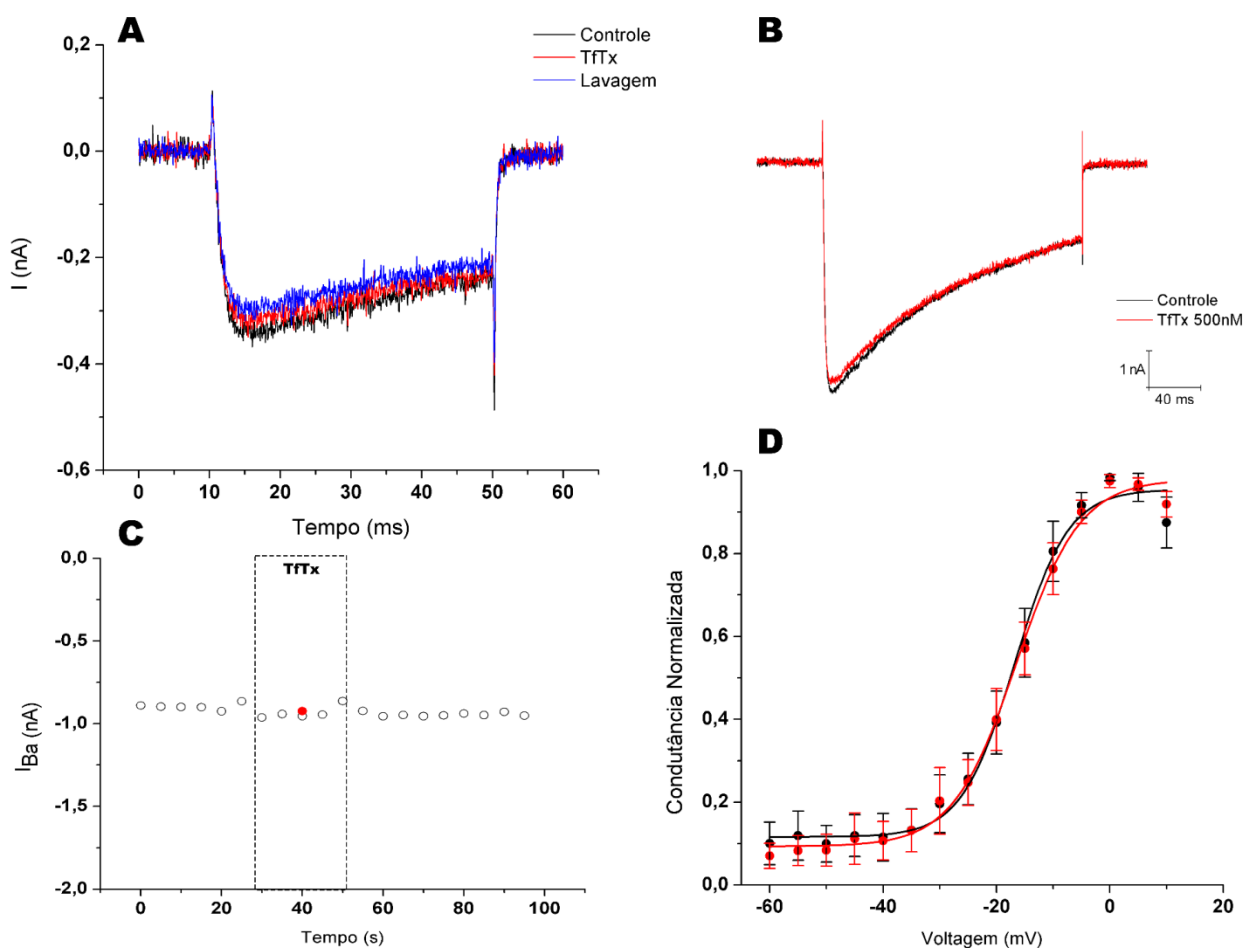
**Figura 25 - Avaliação da toxina Tftx em canais dependentes de voltagem hERG1:** Em **A** e **B**, representação de correntes de cauda registradas em condições de controle e aplicação de 500 nM de Tftx, respectivamente. Em **C**, registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento(vermelho) com Tftx. Em **D** e **E**, representação de correntes de inativação dos canais registradas em condições de controle e aplicação de 500 nM de Tftx, respectivamente. Em **F** registro normalizado de dependência de voltagem na inativação, nas condições de controle (Preto) e tratamento(vermelho) com Tftx.

### Eletrofisiologia em canais de cálcio dependentes de voltagem

Para análise em canais  $Ca_v$  foram selecionados os subtipos  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v2.1$ ,  $Ca_v2.2$ ,  $Ca_v2.3$ . As análises foram realizadas através de ensaio eletrofisiológico para a

avaliação da capacidade de alterar a amplitude da corrente pelo parâmetro de porcentagem de inibição, a probabilidade de abertura durante a ativação ( $\Delta_{1/2\text{ativação}}$ )

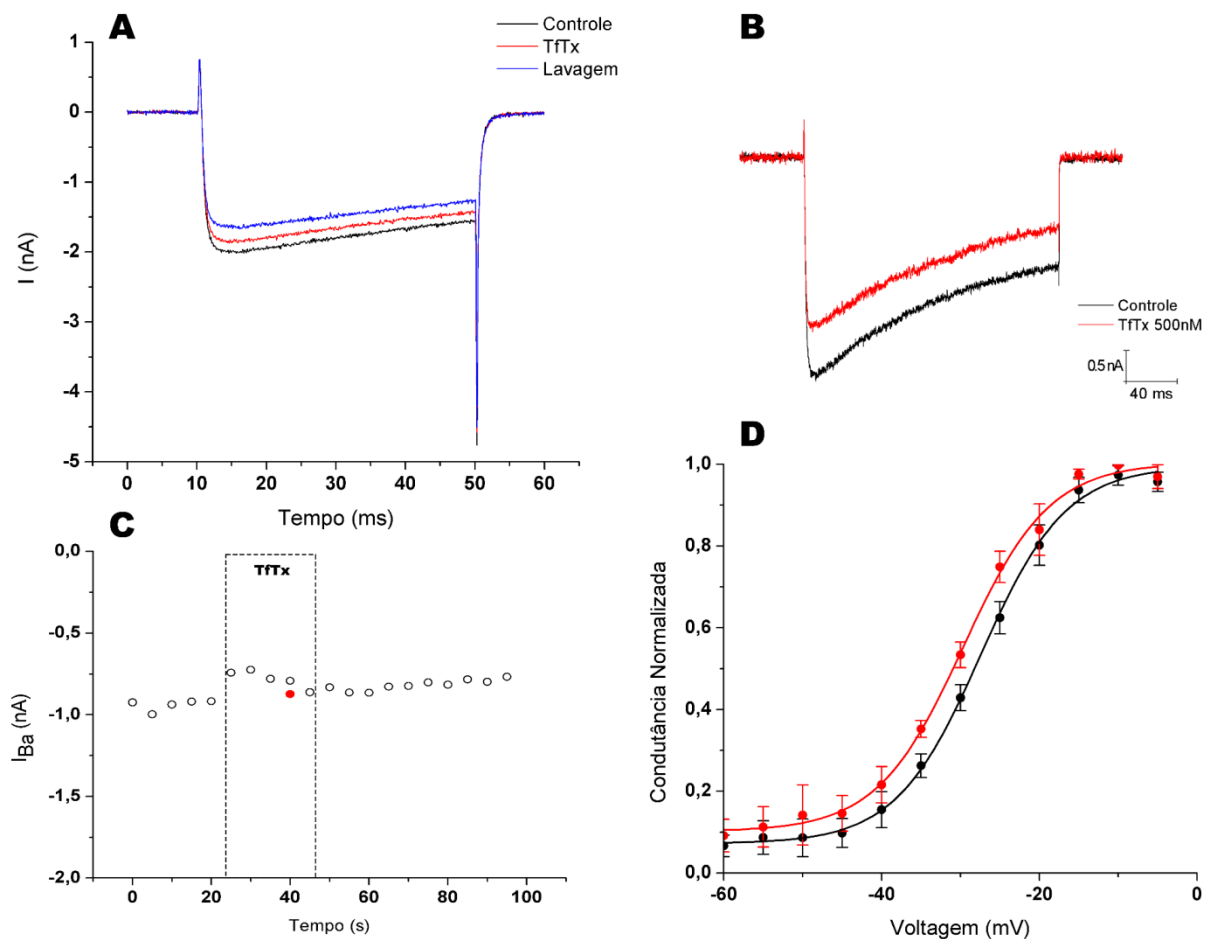
Em canais Cav1.2 foram analisados um total de 4 células. Os canais foram tratados com TftTx a uma concentração de 500 nM. Nestes ensaios a toxina TftTx não apresentou atividade, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação. Foi observado que a TftTx promoveu uma inibição de  $1,0 \pm 1,7 \%$  (Figura 26) com uma variação na voltagem de ativação de  $0,3 \pm 0,05$ . Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 26 - Avaliação da toxina TftTx em canais dependentes de voltagem CaV1.2:** Em **A**, representação de correntes de  $Ba^{2+}$  registradas em condições de controle (Preto), a corrente em condição de tratamento (Vermelho) com a aplicação de 500 nM de TftTx e o registro de lavagem (azul), realizado após a aplicação do tratamento, com a remoção da toxina para avaliar a recuperação do canal. Em **B**, traço em preto representa o traço controle de maior

condutância e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina. Em **C**, a corrente registrada é representada pelos pontos e a corrente predita ( $I_{pred}$ ) representada pelo ponto vermelho. Em **D**, registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com TftTx.

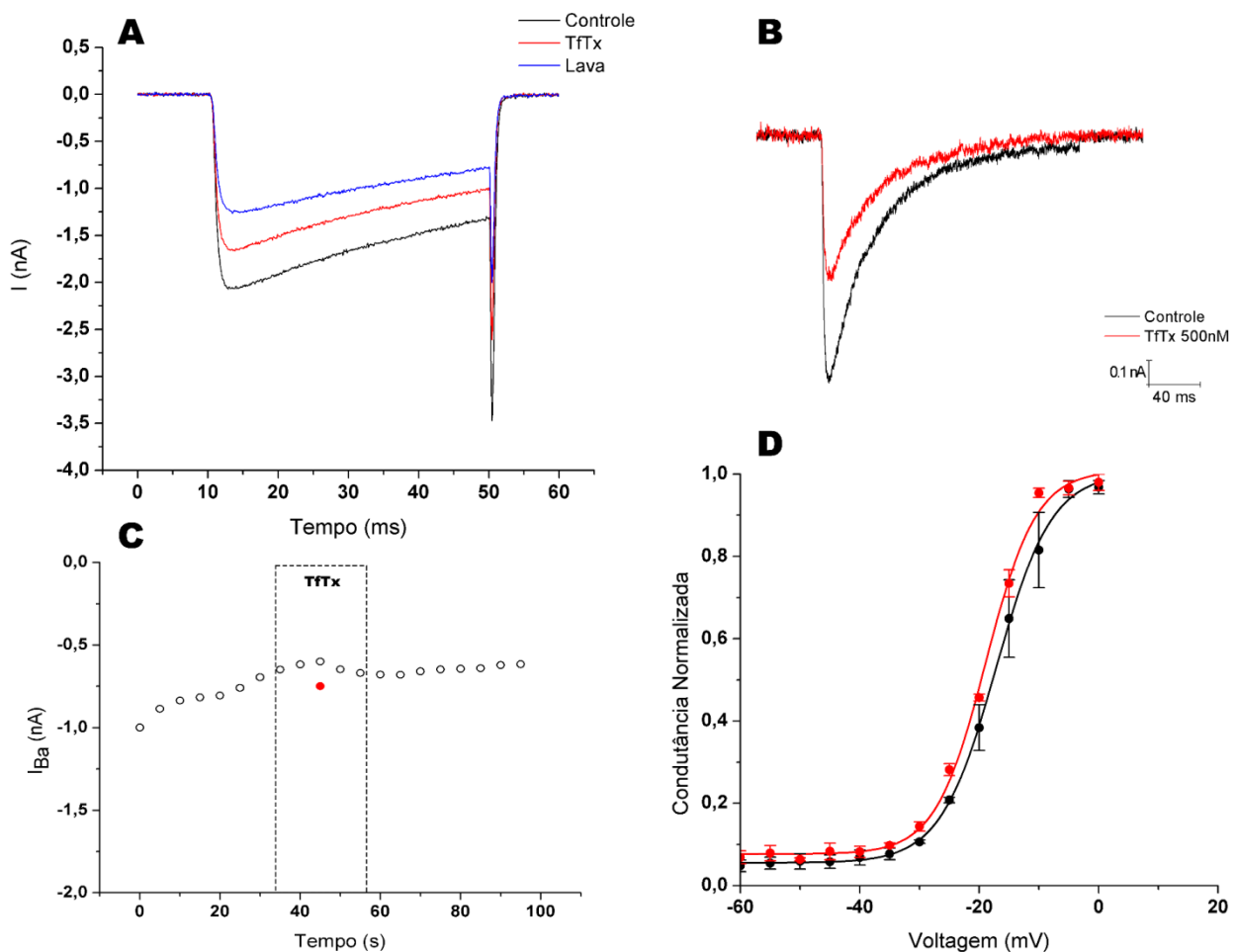
Em canais  $Cav_{1.3}$  uma concentração de 500 nM a toxina TftTx não apresentou atividade, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação. Foi observado que a TftTx promoveu uma inibição de  $1,9 \pm 1,2 \%$  (Figura 27) com uma variação na voltagem de ativação de  $2,2 \pm 0,1$ , onde foi realizado um n amostral de 3 células. Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 27 - Avaliação da toxina TftTx em canais dependentes de voltagem  $Cav_{1.3}$ :** Em **A**, representação de correntes de  $Ba^{2+}$  registradas em condições de controle (Preto), a corrente em condição de tratamento (Vermelho) com a aplicação de 500 nM de TftTx e o registro de lavagem (azul), realizado após a aplicação do tratamento, com a remoção da toxina para avaliar a recuperação do canal. Em **B**, traço em preto representa o traço controle de maior condutância

e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina. Em **C**, a corrente registrada é representada pelos pontos e a corrente predita ( $I_{pred}$ ) representada pelo ponto vermelho. Em **D**, registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com TftTx.

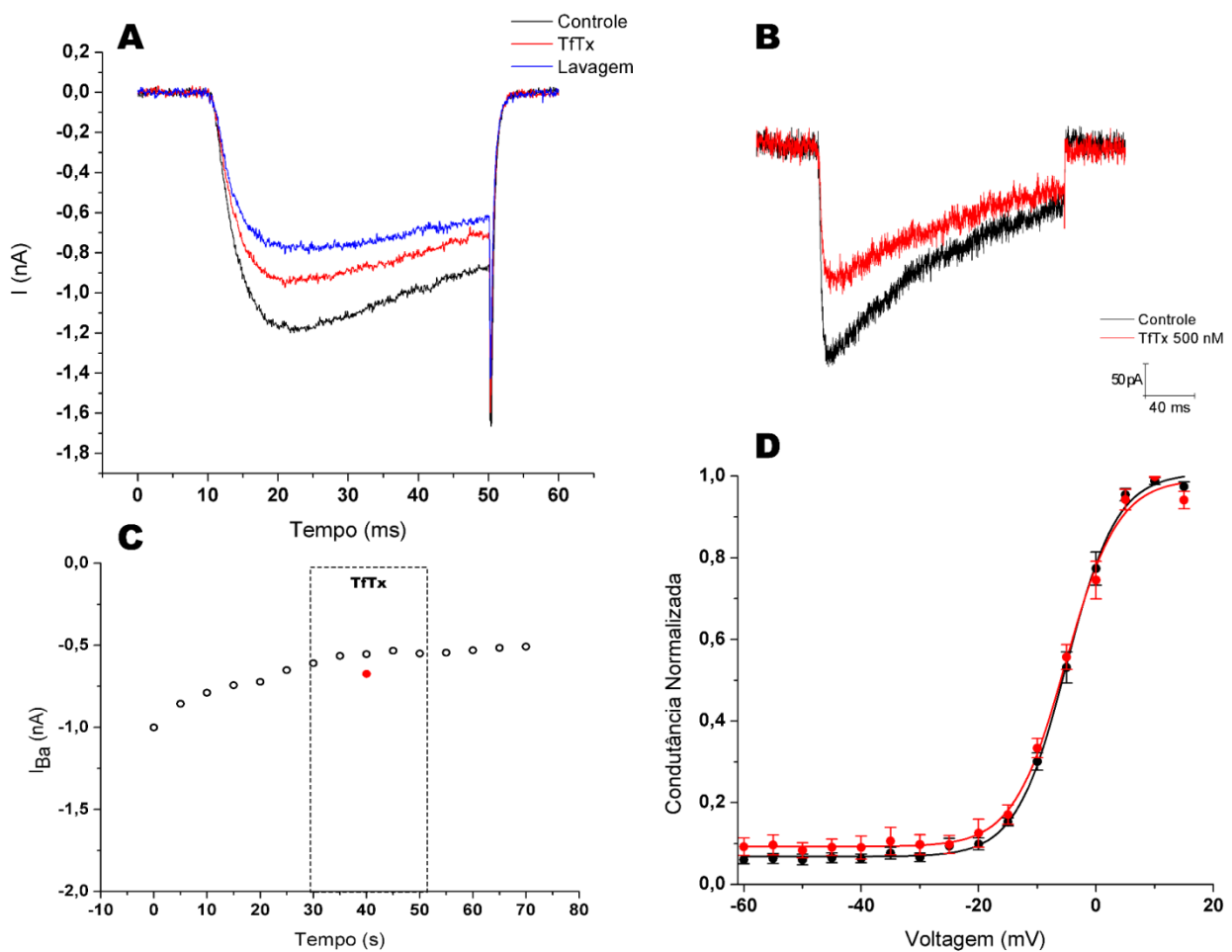
Em canais  $Ca_v2.1$  a toxina TftTx não apresentou atividade a uma concentração de 500 nM, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação e inativação. Foi observado que a TftTx promoveu uma inibição de  $2,4 \pm 1,3 \%$  (Figura 28) com uma variação na voltagem de ativação de  $1,7 \pm 0,1$ . Foram analisadas um total de 4 células. Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 28 - Avaliação da toxina TftTx em canais dependentes de voltagem  $Ca_v2.1$ :** Em **A**, representação de correntes de  $Ba^{2+}$  registradas em condições de controle (Preto), a corrente em condição de tratamento (Vermelho) com a aplicação de 500 nM de TftTx e o registro de lavagem (azul), realizado após a aplicação do tratamento, com a remoção da toxina para avaliar a recuperação do canal. Em **B**, traço em preto representa o traço controle de maior condutância

e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina. Em **C**, a corrente registrada é representada pelos pontos e a corrente predita (*I<sub>pred</sub>*) representada pelo ponto vermelho. Em **D**, registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento (vermelho) com TftTx.

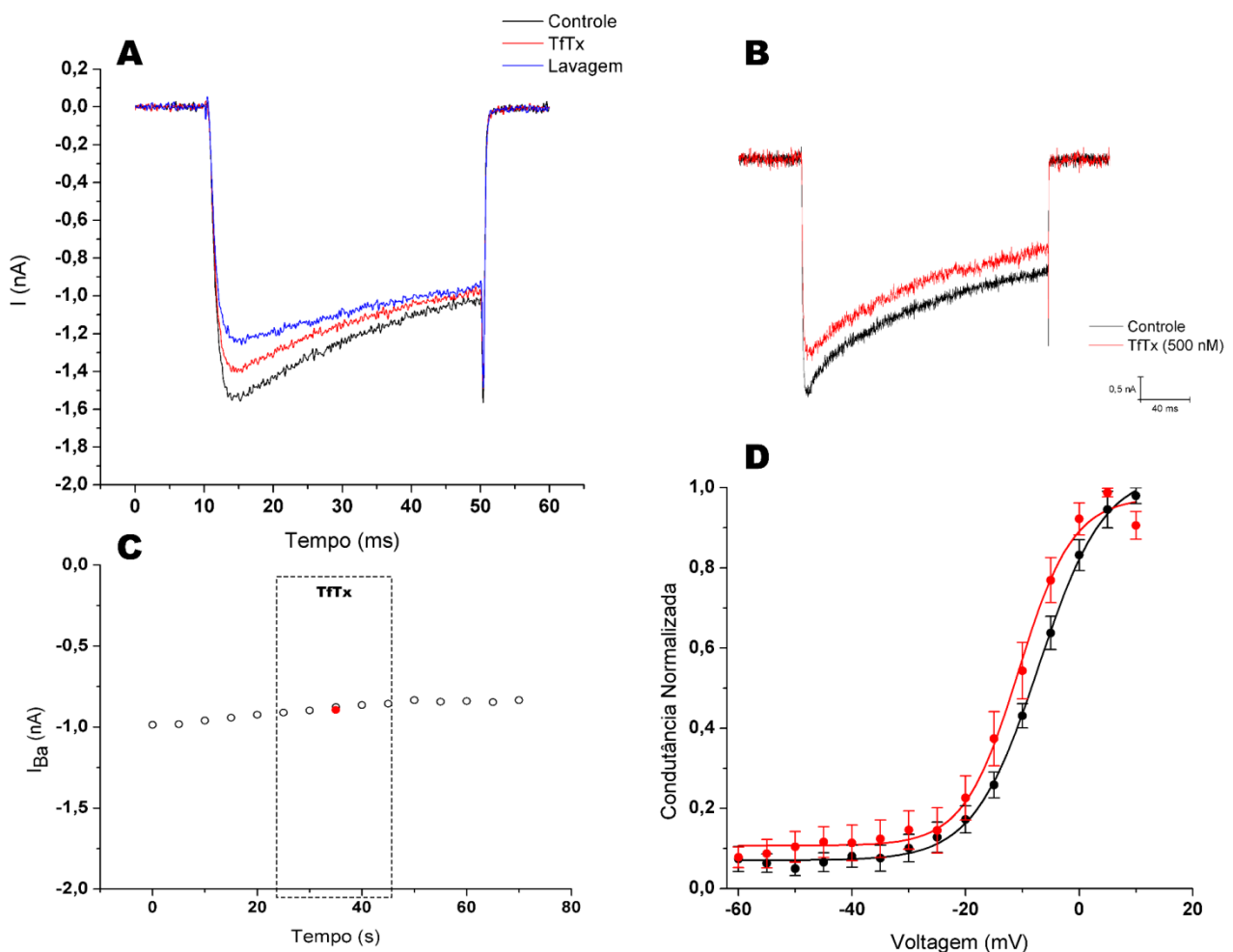
Em canais  $Ca_v2.2$  foram analisados um total de 3 células. Os canais foram tratados com TftTx a uma concentração de 500 nM. Nestes ensaios a toxina TftTx não apresentou atividade, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação. Foi observado que a TftTx promoveu uma inibição de  $0,1 \pm 0,3 \%$  (Figura 29) com uma variação na voltagem de ativação de  $0,2 \pm 0,1$ . Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 29 - Avaliação da toxina TftTx em canais dependentes de voltagem  $Ca_v2.2$ :** Em **A**, representação de correntes de  $Ba^{2+}$  registradas em condições de controle (Preto), a corrente em condição de tratamento (Vermelho) com a aplicação de 500 nM de TftTx e o registro de lavagem (azul), realizado após a aplicação do tratamento, com a remoção da toxina

para avaliar a recuperação do canal. Em **B**, traço em preto representa o traço controle de maior condutância e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina. Em **C**, a corrente registrada é representada pelos pontos e a corrente predita ( $I_{pred}$ ) representada pelo ponto vermelho. Em **D**, registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento(vermelho) com TftTx.

Em canais  $Ca_v2.3$  a toxina TftTx não apresentou atividade a uma concentração de 500 nM, sendo incapaz de promover inibição do canal ou a alteração na cinética de ativação e inativação. Foi observado que a TftTx promoveu uma inibição de  $4,2 \pm 1,5 \%$  (Figura 30) com uma variação na voltagem de ativação de  $3,5 \pm 0,2$ . Foram analisadas um total de 6 células. Todos os valores citados para a toxina não são estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).

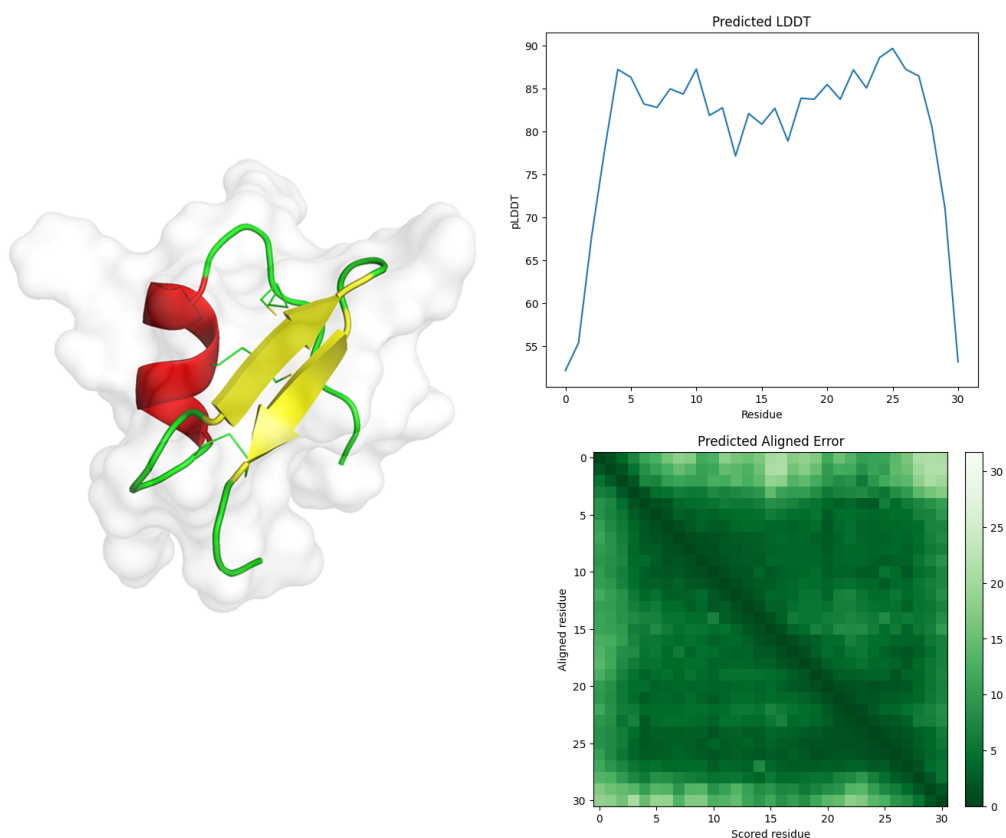


**Figura 30 - Avaliação da toxina TftTx em canais dependentes de voltagem  $Ca_v2.3$ :** Em **A**, representação de correntes de  $Ba^{2+}$  registradas em condições de controle (Preto), a corrente em condição de tratamento (Vermelho) com a aplicação de 500 nM de TftTx e o registro de lavagem (azul), realizado após a aplicação do tratamento, com a remoção da toxina para avaliar a recuperação do canal. Em **B**, traço em preto representa o traço controle de maior condutância



e traços em vermelho representam a condição na presença da toxina. Em **C**, a corrente registrada é representada pelos pontos e a corrente predita (*I<sub>pred</sub>*) representada pelo ponto vermelho. Em **D**, registro normalizado de condutância nas condições de controle (Preto) e tratamento(vermelho) com TfTx.

Foi realizada uma predição da estrutura tridimensional utilizando a ferramenta AlphaFold2 (<https://11nk.dev/VuIHq> acessado em 20 de junho de 2023) disponível online. Atualmente a ferramenta é capaz de prever com alto grau de confiabilidade (intervalo de confiança de 95% = 1,2–1,6 Å). Na estrutura predita é possível observar uma  $\alpha$ -hélice e duas fitas- $\beta$ , a estrutura é estabilizada por 3 pontes dissulfeto, apresentando uma estrutura clássica descrita em  $\alpha$ -Ktxs (Figura 31).



**Figura 31 - Predição da estrutura tridimensional da toxina TfTx:** A esquerda está representada a estrutura tridimensional predita da toxina TfTx. Em vermelho está representado a  $\alpha$ -hélice e em amarelo as fitas- $\beta$ . A direita estão representados o resultado do teste de diferença de distância local previsto (pLDDT) e o erro predito do alinhamento.

## 6 – Discussão

Nesta dissertação o sequenciamento do peptídeo TfTx isolado da peçonha de *Tityus fasciolatus* foi concluído e deu-se início a investigação da sua atividade em alguns subtipos dos canais  $K_V$  e  $Ca_V$ . A TfTx a uma concentração de 1  $\mu$ M não apresentou a capacidade de bloquear ou modular os canais  $K_V1.3$ ,  $K_V1.4$ ,  $K_V3.1$ . De forma parecida, a toxina não apresentou afinidades aos canais  $Ca_V1.2$ ,  $Ca_V1.3$ ,  $Ca_V2.1$ ,  $Ca_V2.2$ ,  $Ca_V2.3$  e canais hERG, em ensaios a uma concentração de 500 nM. De forma complementar, foi realizada a predição de sua estrutura tridimensional utilizando a ferramenta de predição de estrutura de proteínas, AlphaFold. A TfTx apresentou a partir da sua sequência primária uma estrutura tridimensional clássica de  $\alpha$ -Ktx sem a presença do motivo ICK (Inhibitor Cystine Knot). Compostas por uma estrutura  $\alpha$ -hélice e duas fitas- $\beta$  formando uma folha. Entretanto, é importante ressaltar que ainda são necessários mais estudos para que a estrutura possa ser predita com mais assertividade (Jumper et al., 2021).

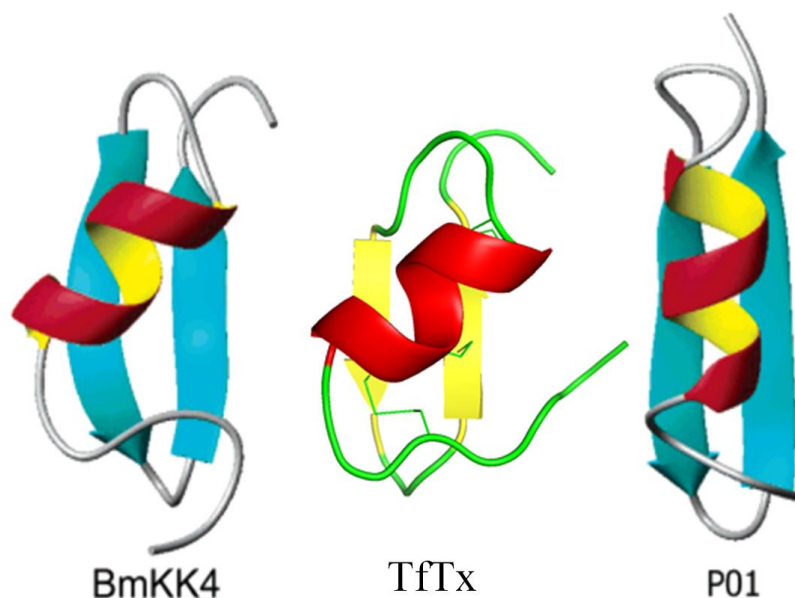
A TfTx possui uma massa molecular de 3.583,64 Da  $[M+H]^+$  e seu sequenciamento revelou 31 resíduos de aminoácidos com a presença de 3 pontes dissulfeto, o que justificaria a diferença de massa existente entre a massa molecular experimental de 3.583,64 Da  $[M+H]^+$  e a massa molecular teórica do peptídeo 3.591,58 Da  $[M+H]^+$ . A diferença entre a massa experimental e a massa teoria se dá pela formação de ligações covalentes do tipo pontes dissulfeto na molécula. As ligações dissulfeto são formadas a partir da oxidação de grupos tiol dos aminoácidos Cys com a liberação de  $2e^-$  e  $2H^+$ , onde para cada ponte formada há uma diferença de -2 Da. (Tsai et al., 2013) Além disso, a toxina apresenta uma região de sinal de amidação do C-terminal GK, o que sugere a presença de uma amina na Asn<sup>31</sup>, o que implicaria na redução de 0,98 Da.

Em comparações realizadas em bancos de dados, foi observado que a TfTx apresentou um grau de identidade com dois grupos de toxina. O primeiro grupo apresentou um grau de identidade superior a 58%, sendo de 65,3% com o peptídeo BmKK4, avaliado em neurônios piramidais do hipocampo, onde apresentou capacidade de inibir correntes de canais de potássio sendo classificada como  $\alpha$ -Ktx 17.1 (Li et al., 2003) e 58,6% com o peptídeo pMeKTx7-4 (Kuzmenkov et al., 2015), descrita como precursores putativos de toxina de potássio, sendo outro possível membro da subfamília  $\alpha$ -KTx 17. Para o segundo grupo foi observado uma similaridade de cerca de 60% com outros 2 peptídeos: ClINtx (Uribe et al., 2017), isolado do

peçonha de *Centruroides limpidus*, e ‘‘Peptídeo A’’ (Valdez-Velázquez, 2018), isolado de *Centruroides hirsutipalpus*. Este segundo grupo de peptídeos não possui atividade fisiológica descrita, e estudos realizados com essas moléculas sugerem que elas compõem uma família de neurotoxinas ainda não descrita, com possível atividade em canais de potássio.

A BmKK4, toxina com a qual apresentou maior identidade, é um importante representante das  $\alpha$ -toxinas, sendo a primeira toxina descrita da subfamília  $\alpha$ -KTX 17. A BmKK4 foi inicialmente avaliada em canais em neurônios piramidais do hipocampo, onde foram registradas as correntes de potássio. Neste ensaio foi observada uma inibição de cerca de 65% das correntes de potássio a uma concentração máxima de 100  $\mu$ M (Li et al., 2003). Os testes realizados com a BmKK4 variam em concentrações de 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M com as maiores taxas de inibição sendo obtidos em concentrações mais altas indicando uma baixa capacidade de interação com os  $K_v$  (Li et al., 2003). Devido a sua baixa concentração na peçonha bruta (0,2% das proteínas) os ensaios com Tftx chegaram a concentrações máximas de 1  $\mu$ M em canais de potássio, o que representaria um centésimo da concentração utilizada para a obtenção dos melhores resultados com a toxina BmKK4.

Além disso, a baixa interação das toxinas BmKK4 com os canais de potássio pode ser compreendida pela substituição de resíduos de aminoácidos em posições altamente conservadas, assim como é observado na Tftx. Como por exemplo, a Asp<sup>19</sup> onde usualmente é observado um resíduo de Gly ou Ala em toxinas de escorpião com motivo  $\alpha/\beta$  (Zhang et al., 2004). Essas toxinas apresentam uma assinatura, Cys- [,,,] -Cys-x-x-x-Cys- [,,,] -Gly-x-Cys- [,,,] -Cys-x-Cys, devido a impedimentos estéricos entre a hélice e a folha que limitam a variação de resíduos presentes (Kuzmenkov et al., 2023). Por consequência, a substituição de Gly por Asp na posição 19 da toxina Tftx (Figura 32) pode apresentar grande influência na conformação em solução da molécula. O que levaria à formação da estrutura de protuberância na porção de folha, tornando a presença do resíduo Asp<sup>19</sup> aceitável ao mover sua cadeia lateral hidrofílica para longe do núcleo hidrofóbico para o solvente, como é observado na estrutura da toxina BmKK4. Essas modificações sugerem o estabelecimento de uma estrutura tridimensional menos favorecida termodinamicamente para interação com  $K_v$  (Zhang et al., 2004).



**Figura 32 - Estrutura tridimensional BmKK4 e TftX** – Os peptídeos foram colocados lado a lado para demonstrar a torção da estrutura  $\alpha$ -hélice presente no BmKK4 e TftX. A direita está a estrutura do peptídeo BmP01,  $\alpha$ -Ktx com alta afinidade para canais iônicos dependentes de voltagem seletivos para potássio.

Através de análises comparativas em bancos de dados utilizando outras toxinas típicas bloqueadoras de poro, é possível observar a substituição do resíduo de aminoácido Lys por um resíduo de Arg<sup>20</sup> (Li et al., 2003). A lisina presente antes da quarta cisteína estabelece uma relação crítica para a interação com o canal. A avaliação de um mutante de caribdotoxina, onde houve uma substituição do resíduo Lys<sup>27</sup> por Arg<sup>27</sup> foi observada uma diminuição de 3 ordens de grandeza em sua afinidade por um canal de K<sup>+</sup> do tipo Shaker em comparação com o peptídeo de tipo selvagem (Zhang et al., 2004). Além disso,  $\alpha$ -Ktxs que não apresentam uma díade clássica (Lys e Tyr) ou pelo menos o resíduo de Lys demonstraram baixa afinidade para canais K<sub>v</sub>1.3, que apesar de não serem críticas para interação toxina-canal, contribuem significativamente com o processo (Naseem, 2023).

Observando os demais grupos que apresentaram maior grau de identidade com a TftX, é possível observar que tanto ClINTx quanto o Peptídeo A compartilham a região central da sequência com o peptídeo TftX. Uma sequência de resíduos Cys-Met-Val-Val região do *loop-m*, localizada entre a  $\alpha$ -hélice e a primeiras fitas- $\beta$ . O *loop-m* facilita o estabelecimento da conformação tridimensional do peptídeo trazendo flexibilidade para o enovelamento da toxina, foi observado que o *loop-m* é um importante sítio descrito em peptídeos com atividade antifúngica e antiparasitária (Zhu, 2008).

A CIINTx e o Peptídeo A não apresentam estudo com os peptídeos isolados. Todos os ensaios realizados com essas toxinas foram realizados a partir de alíquotas de peçonha bruta, não sendo possível determinar especificamente a atividade dos peptídeos, apenas trazendo uma visão geral do potencial da peçonha. No caso da CIINTx, Uribe e colaboradores em 2017 avaliaram a atividade relacionada à reprodução, onde, durante o cortejo de acasalamento de algumas espécies de escorpiões foi descrito que o macho injetava no corpo da fêmea algum veneno. Neste sentido, foram injetados 10 mg da peçonha bruta do macho (*Centruroides limpidus*) na fêmea da mesma espécie. Entretanto nenhuma alteração no comportamento foi observada (Uribe et al., 2017). O Peptídeo A não foi avaliado isoladamente. Os ensaios eletrofisiológicos descritos no trabalho em que o peptídeo foi apresentado foram realizados a partir de uma alíquota de peçonha bruta, onde a eletrofisiologia revelou atividade em canais do tipo  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.6$ ,  $K_v1.1$  e canais hERG ( $K_v11$ ) (Valdez-Velázquez et al., 2018).

Existem três grupos de compostos que atuam no canal de cálcio  $Ca_v2.1$ : compostos peptídicos derivados de várias peçonhas de animais, compostos de baixo peso molecular e compostos terapêuticos que afetam os canais de  $Ca_v2.1$  como alvos secundários (Nimmrich e Gross, 2012). Como os canais  $Ca_v2.1$  e  $Ca_v2.2$  apresentam grande similaridade são poucos os existentes descritos que possuem atividade com maior seletividade ou especificidade para o canal  $Ca_v2.1$ . Em análise de banco de dados a TftTx não apresentou similaridade com toxinas de escorpião que atuam em canais cálcio. A princípio foi proposto a hipótese de uma possível atuação da toxina TftTx em canais de potássio, tendo em vista se tratar de um peptídeo curto, com a massa molar por volta de 3,5 kDa, apresentando um alto grau de estabilidade, onde já haviam sido observadas 3 pontes dissulfeto.

A interação com canais iônicos requer a presença de uma superfície hidrofóbica cercada por resíduos carregados, formando o motivo ICK e resultando no dobramento compacto das toxinas (Dongol et al., 2019). Para garantir a complementaridade da toxina, é essencial a presença de resíduos hidrofóbicos e aromáticos entre as cisteínas C1 e C2, entre C5 e C6, e na região C-terminal. Além disso, os resíduos com carga positiva entre C5 e C6 e no C-terminal desempenham um papel fundamental (Dongol et al., 2019).

O sequenciamento da TftTx revelou uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos carregados positivamente, distribuídos ao longo de toda a molécula, diferente do que é observado em  $\omega$ -toxinas de escorpião. Comparando os valores teóricos de grandeza média de hidrofobicidade (*Gravy*) calculados pelo programa *Expasy ProtParam*

(<https://web.expasy.org/protparam/> acessado em 24 de junho de 2023) observamos valor de -1,436 e -1,288 para as toxinas Imeprecalcina e Maurocalcina, respectivamente. Em contrapartida a Tftx apresenta um valor de -0,855 demonstrando ser significativamente mais hidrofóbica, uma vez que valores mais negativos indicam uma condição mais hidrofílica. A diferença entre os valores de hidrofobicidade médio teórico entre as toxinas pode contribuir para a diferença de comportamento observado entre elas. A análise da distribuição geral de carga eletrostática das toxinas Maurocalcina (Fajloun et al., 2000) e Imperacalcina (Nabhani et al., 2002), ambas atuantes em canais de cálcio nos receptores de rianodina, revelou uma anisotropia acentuada (Mosbah et al., 2000; Lee et al., 2004). Esta anisotropia pode ser representada por um momento dipolar que emerge da molécula através de uma superfície rica em aminoácidos básicos (Lys<sup>19</sup>, Lys<sup>20</sup>, Lys<sup>22</sup>, Arg<sup>23</sup>, Arg<sup>24</sup> e Arg<sup>33</sup>) sem nenhum resíduo ácido.

Entretanto, a superfície oposta contém quatro resíduos ácidos (Asp<sup>2</sup>, Glu<sup>12</sup>, Asp<sup>15</sup> e Glu<sup>29</sup>) para apenas um resíduo básico (Lys<sup>8</sup>) (Xiao et al., 2016). Segundo Mosbah e seus colaboradores, esse dipolo contribuiria para a orientação adequada dos peptídeos no momento de interação com o receptor de rianodina (Mosbah et al., 2000).

Esse grupo de toxinas (Maurocalcina e Imperacalcina) apresentam um motivo ICK (inhibitor cystine knot), que pode ser observada em toxinas de cálcio de outros animais que não escorpiões, como as  $\omega$ -conotoxinas MVIIA, MVIIC, GVIA e GXIA de *Conus geographus* que apresentam afinidade com canais Ca<sub>v</sub>2.1 e Ca<sub>v</sub>2.2 a concentrações de 100 nM (Ramírez et al., 2017), e  $\omega$ -agatoxin-IVA que inibe totalmente as correntes a uma concentração de 40 nM e atua no canal deslocando a dependência de voltagem para potenciais mais positivos (Singh et al 2023). Em contrapartida, a Tftx indica trazer uma estrutura compatível com que é observado em clássica de  $\alpha$ -Ktx, com ausência do motivo ICK. Entretanto, o motivo ICK não é exclusivo deste grupo de toxinas, estando presente em toxinas com diferentes especificidades farmacológicas (Norton & Pallaghy, 1998; Van Baelen et al., 2022).

Por fim as toxinas Kurtoxina e Kurtoxina-like-II, derivadas das peçonhas de *Parabuthus transvaalicus* (Sadich & Mintz, 2002) e *Parabuthus granulatus* (López-González et al., 2003), respectivamente, têm a capacidade de modular canais de cálcio do tipo T, que têm baixo limiar de ativação, em neurônios do tálamo. Além disso, essas toxinas também afetam canais de cálcio do tipo P, N e L, que possuem um limiar de ativação mais alto (Sadich & Mintz, 2002; López-González et al., 2003). Embora as Kurtoxinas compartilhem um motivo estrutural semelhante à toxina Tftx (motivo CS $\alpha\beta$ ), há diferenças estruturais que conferem alta afinidade aos canais

de cálcio dependentes de voltagem. As Kurtoxinas possuem uma estrutura característica das  $\alpha$ -toxinas de escorpião, consistindo em uma  $\alpha$ -hélice, três cadeias  $\beta$  e várias voltas estabilizadas por quatro pontes dissulfeto (CS $\alpha\beta$ ). Essas toxinas apresentam três regiões principais: um loop longo inicial (Asp<sup>8</sup>–Ile<sup>15</sup>), loop  $\beta$ -*hairpin* (Gly<sup>39</sup>–Leu<sup>42</sup>) e segmento C-terminal (Arg<sup>57</sup>–Ala<sup>63</sup>) (Lee et al., 2012), que desempenham um papel importante na interação com os canais de cálcio do tipo T. Além disso, é observada uma região mais eletropositiva adjacente à região hidrofóbica. Essas toxinas têm alta afinidade por esses canais, sendo capazes de inibir as correntes de cálcio e alterar a voltagem de ativação e inativação em concentrações inferiores a 500 nM : 50 nM (canais do tipo T), 15 nM (canais do tipo P), 460 nM (canais do tipo N) e 70 nM (correntes do tipo L) (Sadich & Mintz, 2002). Neste sentido, a Tftx apresenta uma estrutura reduzida além de uma distribuição de resíduos carregados positivo e negativamente desfavoráveis para atuação em canais de cálcio com alta afinidade. As Kurtoxinas reconhecem um motivo comum nesses tipos de canais, localizado no seguimento entre S3-S4 do domínio IV, próximo ao sensor de voltagem (Chuang et al., 1998). Essa hipótese é especialmente interessante, pois a mesma região do canal (ou uma equivalente) parece ser crucial para a ligação de alta afinidade de outros moduladores de ativação aos canais de potássio e cálcio dependentes de voltagem (Mendes et al., 2023).

## 7 – Conclusão

O peptídeo TfTx isolado a partir da peçonha de *Tityus fasciolatus* não apresentou atividade em nenhum dos canais avaliados. As inibições de  $1,77 \pm 1,44\%$  e  $3,40 \pm 2,85\%$  das correntes dos canais  $K_v1.4$  e  $K_v3.1$  respectivamente, a uma concentração de  $1 \mu\text{M}$ , sugerem que a toxina não tem esses subtipos como alvo.

De forma similar, as inibições de  $1,00 \pm 1,75\%$  ( $\text{Cav}1.2$ ),  $1,98 \pm 1,22\%$  ( $\text{Cav}1.3$ ),  $2,44 \pm 1,39\%$  ( $\text{Cav}2.1$ ),  $0,17 \pm 0,36\%$  ( $\text{Cav}2.2$ ) e  $4,22 \pm 1,58\%$  ( $\text{Cav}2.3$ ) a uma concentração de  $500 \text{ nM}$ , sugerem que a toxina não tem esses subtipos como alvo. Entretanto, é possível que a TfTx tenha atividade em outros subtipos destas mesmas famílias, com mais probabilidade para os subtipos de canais de potássio dependentes de voltagem, dada a similaridade já observada com outras toxinas atuantes nesses mesmos canais.

Neste sentido se faz necessário um novo direcionamento para a execução de ensaios biológicos, através de mais análises em bancos de dados associados aos dados obtidos a partir da sequência obtida neste presente trabalho.



## 8 – Perspectivas

- Ampliar a variedade subtipos canais de potássio dependentes de voltagem testados para caracterização eletrofisiológica do peptídeo TfTx.
- Análise detalhada da estrutura do peptídeo TfTx utilizando ferramentas de *Docking*
- Análise da atividade do peptídeo em canais dependentes de voltagem de inseto e artrópodes.

## 9 - Referência Bibliográfica

- Adams, D. J., & Berecki, G. (2013). Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (Cav2.2) calcium channels. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1828, Issue 7, pp. 1619–1628). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.019>
- Aiyar, J., Rizzi, J. P., Gutman, G. A., & Chandy, K. G. (1996). The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31013–31016. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31013>
- Aizawa, T., Wada, Y., Hasegawa, K., Huang, H., Imamura, T., Gao, J., Kashiwa, A., Kohjitani, H., Fukuyama, M., Kato, K., Kato, E. T., Hisamatsu, T., Ohno, S., Makiyama, T., Kimura, T., & Horie, M. (2023). Non-missense variants of KCNH2 show better outcomes in type 2 long QT syndrome. *Europace*, 25(4), 1491–1499. <https://doi.org/10.1093/europace/euac269>
- Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. In *Peptides* (Vol. 51, pp. 35–45). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>
- Bartok, A., Panyi, G., & Varga, Z. (2015). Potassium channel blocking peptide toxins from scorpion venom. In *Scorpion Venoms* (pp. 493–527). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6404-0\\_30](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6404-0_30)
- Becerril, B., Corona, M., Coronas, F. I. V., Zamudio, F., Calderon-Aranda, E. S., Fletcher, P. L., Martin, B. M., & Possani, L. D. (1996). Toxic peptides and genes encoding toxin  $\gamma$  of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. In *Biochem. J* (Vol. 313).
- Bechis, G., Sampieri, F., Yuan, P. M., Brando, T., Martin, M. F., Diniz, C. R., & Rochat, H. (1984). Amino acid sequence of toxin VII, A  $\beta$ -toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 122(3), 1146-1153.
- Bhavya, J., N. Francois, N., S. More, V., & S. More, S. (2016). Scorpion Toxin Polypeptides as Therapeutic Agents: An Overview. *Protein & Peptide Letters*, 23(9), 848–859. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160630184635>
- Blanc, E., Romi-Lebrun, R., Bornet, O., Nakajima, T., & Darbon, H. (1998). *Solution Structure of Two New Toxins from the Venom of the Chinese Scorpion Buthus martensi Karsch Blockers of Potassium Channels* †, ‡. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Brazil, Tania Kobler; Porto, Tiago Jordão. Os escorpiões. EDUFBA, 2010.
- Brusca, R.C. & Brusca, G.J.. Invertebrados. Segunda edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 968 pp. 2007

- Camargos, T. S. (2014). Prospecção da peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus* sob a perspectiva proteômica e transcritômica, e caracterização biológica de peptídeos moduladores de canais de Na<sup>+</sup>.
- Candido, D. M., & Fan, H. W. (2019). Controle de escorpiões de importância em saúde.
- Candido, D. M., Lucas, S., Souza, C. A. R. D., Diaz, D., & Lira-da-Silva, R. M. (2005). Uma nova espécie de *Tityus* CL Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do estado da Bahia, Brasil. *Biota Neotropica*, 5, 193-200.
- Carstens, B. B., Berecki, G., Daniel, J. T., Lee, H. S., Jackson, K. A. V., Tae, H., Sadeghi, M., Castro, J., O'Donnell, T., Deiteren, A., Brierley, S. M., Craik, D. J., Adams, D. J., & Clark, R. J. (2016). Structure–Activity Studies of Cysteine-Rich  $\alpha$ -Conotoxins that Inhibit High-Voltage-Activated Calcium Channels via GABA B Receptor Activation Reveal a Minimal Functional Motif. *Angewandte Chemie*, 128(15), 4770–4774. <https://doi.org/10.1002/ange.201600297>
- Catterall, W. A. (2000). STRUCTURE AND REGULATION OF VOLTAGE-GATED Ca<sup>2+</sup> CHANNELS. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 16). [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Catterall, W. A. (2017). Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. *Neurochemical Research*, 42(9), 2495–2504. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2314-9>
- Catterall, W. A., & Few, A. P. (2008). Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. In *Neuron* (Vol. 59, Issue 6, pp. 882–901). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.005>
- Chadwick, D. J., & Goode, J. A. (Eds.). (2005). *The hERG cardiac potassium channel: structure, function, and long QT syndrome* (Vol. 266). John Wiley & Sons.
- Chen, Z. Y., Hu, Y. T., Yang, W. S., He, Y. W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R. M., Ding, J. P., Cao, Z. J., Li, W. X., & Wu, Y. L. (2012). Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13813–13821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343996>
- Chi, G., Liang, Q., Sridhar, A., Cowgill, J. B., Sader, K., Radjainia, M., Qian, P., Castro-Hartmann, P., Venkaya, S., Singh, N. K., McKinley, G., Fernandez-Cid, A., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Delemotte, L., Covarrubias, M., & Dürr, K. L. (2022). Cryo-EM structure of the human Kv3.1 channel reveals gating control by the cytoplasmic T1 domain. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29594-w>
- Choe, S. (2002). Ion channel structure: Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nrn727>

- Chuang, R. S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., and Swartz, K. J. (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* 1, 668–674.
- Cid Uribe, J. I., Jiménez Vargas, J. M., Ferreira Batista, C. V., Zamudio Zuñiga, F., & Possani, L. D. (2017). Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. *Toxicon*, 125, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.256>
- Cid-Urbe, J. I., Veytia-Bucheli, J. I., Romero-Gutierrez, T., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2020). Scorpion venomomics: a 2019 overview. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 17, Issue 1, pp. 67–83). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1705158>
- Cremonese, C. M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J. S., Dutra, A. A. A., Waelkens, E., Lescrinier, E., Herdewijn, P., de Lima, M. E., Pimenta, A. M. C., Arantes, E. C., & Tytgat, J. (2016). Structural and functional elucidation of peptide TS11 shows evidence of a novel subfamily of scorpion venom toxins. *Toxins*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/toxins8100288>
- Csoti, A., del Carmen Nájera Meza, R., Bogár, F., Tajti, G., Szanto, T. G., Varga, Z., Gurrola, G. B., Tóth, G. K., Possani, L. D., & Panyi, G. (2022). sVmKTx, a transcriptome analysis-based synthetic peptide analogue of Vm24, inhibits Kv1.3 channels of human T cells with improved selectivity. *Biochemical Pharmacology*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115023>
- Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., & Treptow, W. (2011). Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY*, 108(15), 6109–6114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102724108/-/DCSupplemental>
- Diego-García, E., Caliskan, F., & Tytgat, J. (2014). The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): Transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-295>
- Dolphin, A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. In *Journal of Physiology* (Vol. 594, Issue 19, pp. 5369–5390). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1113/JP272262>
- Dolphin, A. C. (2018). Voltage-gated calcium channel  $\alpha 2 \delta$  subunits: An assessment of proposed novel roles [version 1; referees: 2 approved]. In *F1000Research* (Vol. 7). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16104.1>
- Dolphin, A. C. (2021). Functions of Presynaptic Voltage-gated Calcium Channels. In *Function* (Vol. 2, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/function/zqaa027>
- Dolphin, A. C., & Lee, A. (2020). Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 4, pp. 213–229). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0278-2>

- Fainzilber, M., Lodder, J. C., Van Der Schors, R. C., Li, K. W., Yu, Z., Burlingame, A. L., Geraerts, W. P. M., & Kits, K. S. (1996). *A Novel Hydrophobic  $\omega$ -Conotoxin Blocks Molluscan Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeb, M., Rochat, H., Allen, P. D., Pessah, I. N., De Waard, M., & Sabatier, J. M. (2000). Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca<sup>2+</sup> release channel/ryanodine receptors. *FEBS Letters*, 469(2–3), 179–185. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01239-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01239-4)
- Finol-Urdaneta, R. K., Belovanovic, A., Micic-Vicovac, M., Kinsella, G. K., McArthur, J. R., & Al-Sabi, A. (2020). Marine toxins targeting KV1 channels: Pharmacological tools and therapeutic scaffolds. In *Marine Drugs* (Vol. 18, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md18030173>
- Gao, B., Harvey, P. J., Craik, D. J., Ronjat, M., De Waard, M., & Zhu, S. (2013). Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Bioscience Reports*, 33(3), 513–527. <https://doi.org/10.1042/BSR20130052>
- Garcia, M. L., Gao, Y.-D., Mcmanus, O. B., & Kaczorowski, G. J. (n.d.). *Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure*. [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)
- Ghosh, A., Roy, R., Nandi, M., & Mukhopadhyay, A. (2019). Scorpion Venom–Toxins that Aid in Drug Development: A Review. In *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* (Vol. 25, Issue 1, pp. 27–37). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9721-x>
- Giangiaco, K. M., Ceralde, Y., & Mullmann, T. J. (2004). Molecular basis of  $\alpha$ -KTx specificity. *Toxicon*, 43(8), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.029>
- Giangiaco, K. M., Garcia, M. L., & Mcmanus, O. B. (1992). Mechanism of Iberitoxin Block of the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel from Bovine Aortic Smooth Muscle. In *Biochemistry* (Vol. 31). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Goldstein, S. A. N., Pheasant, D. J., & Miller, C. (n.d.). *The Charybdotoxin Receptor of a Shaker K + Channel: Peptide and Channel Residues Mediating Molecular Recognition*.
- Grashof, D. G. B., Kerckamp, H. M. I., Afonso, S., Archer, J., Harris, D. J., Richardson, M. K., Vonk, F. J., & Van Der Meijden, A. (2019). Transcriptome annotation and characterization of novel toxins in six scorpion species. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6013-6>
- Guatimosim, S. C., PRADO, V. F., DINIZ, C. R., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. & KALAPOTHAKIS, E. 1999. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from Tityus serrulatus scorpion venom. *Toxicon*, 37, 507-17.

- Guerrero-Vargas, J. A., Mourão, C. B. F., Quintero-Hernández, V., Possani, L. D., & Schwartz, E. F. (2012). Identification and phylogenetic analysis of Tityus pachyurus and Tityus obscurus novel putative Na<sup>+</sup>-channel scorpion toxins. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030478>
- Guimarães, P. T. C., Pinto, M. C. L., & Melo, M. M. (2011). Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por Tityus fasciolatus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(6), 1382–1390. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600015>
- Gurrola, G. B., Capes, E. M., Zamudio, F. Z., Possani, L. D., & Valdivia, H. H. (2010). Imperatoxin a, a cell-penetrating peptide from scorpion venom, as a probe of Ca<sup>2+</sup>-release channels/ryanodine receptors. *Pharmaceuticals*, 3(4), 1093–1107. <https://doi.org/10.3390/ph3041093>
- Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L. D., & Wanke, E. (n.d.). A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 57, Issue 4, pp. 473–508). <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
- Hilal, I., Khourcha, S., Safi, A., Hmyene, A., Asnawi, S., Othman, I., Stöcklin, R., & Oukkache, N. (2023). Comparative Proteomic Analysis of the Venoms from the Most Dangerous Scorpions in Morocco: *Androctonus mauritanicus* and *Buthus occitanus*. *Life*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/life13051133>
- Huang, K., Luo, Y. B., & Yang, H. (2019). Autoimmune channelopathies at neuromuscular junction. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00516>
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. In *Protein and Cell* (Vol. 1, Issue 2, pp. 143–152). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
- Isaacs, N. W. (n.d.). *Cystine knots*.
- Islas, L. D. (2016). Functional diversity of potassium channel voltage-sensing domains. In *Channels* (Vol. 10, Issue 3, pp. 202–213). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1141842>

- Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. In *Journal of Physiology* (Vol. 590, Issue 11, pp. 2591–2599). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224212>
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & Mackinnon, R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. In *NATURE* (Vol. 423). [www.nature.com/](http://www.nature.com/)
- Jugloff, D. G. M., Khanna, R., Schlichter, L. C., & Jones, O. T. (2000). *Internalization of the Kv1.4 Potassium Channel Is Suppressed by Clustering Interactions with PSD-95\**. <http://www.jbc.org>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kim, D. M., & Nimigean, C. M. (2016). Voltage-gated potassium channels: A structural examination of selectivity and gating. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029231>
- Kuzmenkov A.I., Grishin E.V. Vassilevski A. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry.*, v. 80, n.13, p.1764-1799, dez 2016
- Kuzmenkov, A. I., Gigolaev, A. M., Pinheiro-Junior, E. L., Peigneur, S., Tytgat, J., & Vassilevski, A. A. (2023). Methionine-isoleucine dichotomy at a key position in scorpion toxins inhibiting voltage-gated potassium channels. *Toxicon*, 231, 107181. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107181>
- Kuzmenkov, A. I., Vassilevski, A. A., Kudryashova, K. S., Nekrasova, O. V., Peigneur, S., Tytgat, J., Feofanov, A. V., Kirpichnikov, M. P., & Grishin, E. V. (2015). Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1: An integrated transcriptomic and proteomic study. *Journal of Biological Chemistry*, 290(19), 12195–12209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637611>
- Labro, A. J., Priest, M. F., Lacroix, J. J., Snyders, D. J., & Bezanilla, F. (2015). Kv 3.1 uses a timely resurgent K<sup>+</sup> current to secure action potential repolarization. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms10173>
- Lee, C. W., Bae, C., Lee, J., Ryu, J. H., Kim, H. H., Kohno, T., Swartz, K. J., & Kim, J. II. (2012). Solution structure of kurtotoxin: A gating modifier selective for Cav3 voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochemistry*, 51(9), 1862–1873. <https://doi.org/10.1021/bi201633j> Lee, C. W.,
- Lee, E. H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., ... & KIM, J. I. (2004). Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochemical Journal*, 377(2), 385-394.

- Li, M. H., Zhang, N. X., Chen, X. Q., Wu, G., Wu, H. M., & Hu, G. Y. (2003). BmKK4, a novel toxin from the venom of Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch, inhibits potassium currents in rat hippocampal neurons in vitro. *Toxicon*, *42*(2), 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00136-3)
- Li, Z., Hu, P., Wu, W., & Wang, Y. (2019). Peptides with therapeutic potential in the venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch. In *Peptides* (Vol. 115, pp. 43–50). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.009>
- Lipscombe, D., Helton, T. D., & Xu, W. (2004). L-type calcium channels: The low down. In *Journal of Neurophysiology* (Vol. 92, Issue 5, pp. 2633–2641). <https://doi.org/10.1152/jn.00486.2004>
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, *450*(7168), 376–382. <https://doi.org/10.1038/nature06265>
- López-González, I., Olamendi-Portugal, T., De La Vega-Beltrán, J. L., Van Der Walt, J., Dyason, K., Possani, L. D., Felix, R., & Darszon, A. (2003). Scorpion toxins that block T-type Ca<sup>2+</sup> channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *300*(2), 408–414. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02859-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02859-0)
- Lourenço, W. R., Cloudsley-Thompson, J. L., Cuellar, O., Eickstedt, V. R. D. VON, Barraviera, B., & KNOX, M. B. (1996). THE EVOLUTION OF SCORPIONISM IN BRAZIL IN RECENT YEARS. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, *2*(2), 121–134. <https://doi.org/10.1590/S0104-79301996000200005>
- Machado, R. J. A., Estrela, A. B., Nascimento, A. K. L., Melo, M. M. A., Torres-Rêgo, M., Lima, E. O., Rocha, H. A. O., Carvalho, E., Silva-Junior, A. A., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2016). Characterization of TstH, a multifunctional peptide from the scorpion *Tityus stigmurus*: Structure, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Toxicon*, *119*, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.002>
- MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Letters*, *555*(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01104-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01104-9)
- Marangoni, S., Ghiso, J., Sampaio, S. V., Arantes, E. C., Giglio, J. R., Oliveira, B., & Frangione, B. (1990). The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Journal of protein chemistry*, *9*, 595–601.
- Martens, J. R., Kwak, Y. G., & Tamkun, M. M. (1999). Modulation of Kv channel  $\alpha/\beta$  subunit interactions. *Trends in cardiovascular medicine*, *9*(8), 253–258.
- Mata, D. O. D. (2022). Caracterização eletrofisiológica das toxinas moduladoras de canais de sódio (Tst1 e Tst3) purificadas da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*.



- McGivern, J. G. (2006). Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. In *Drug Discovery Today* (Vol. 11, Issues 5–6, pp. 245–253). [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03662-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03662-7)
- Mendes, L. C., Viana, G. M. M., Nencioni, A. L. A., Pimenta, D. C., & Beraldo-Neto, E. (2023). Scorpion Peptides and Ion Channels: An Insightful Review of Mechanisms and Drug Development. In *Toxins* (Vol. 15, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxins15040238>
- Mendes, T. M., Guimarães-Okamoto, P. T. C., Machado-De-Avila, R. A., Oliveira, D., Melo, M. M., Lobato, Z. I., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2015). General characterization of Tityus fasciolatus scorpion venom. Molecular identification of toxins and localization of linear B-cell epitopes. *Toxicon*, 99, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.018>
- Menezes, L. F. S., Sabiá Júnior, E. F., Tibery, D. V., Carneiro, L. dos A., & Schwartz, E. F. (2020). Epilepsy-Related Voltage-Gated Sodium Channelopathies: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01276>
- Mille, B. G., Peigneur, S., Predel, R., & Tytgat, J. (2015). Transcriptomic approach reveals the molecular diversity of Hottentotta conspersus (Buthidae) venom. *Toxicon*, 99, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.015>
- Morales Duque, Harry. Caracterização de novos peptídeos bloqueadores de canais para K<sup>+</sup> isolados da peçonha do escorpião Tityus sp. 2013
- Nabhani, T., Zhu, X., Simeoni, I., Sorrentino, V., Valdivia, H. H., & García, J. (2002). Imperatoxin A enhances Ca<sup>2+</sup> release in developing skeletal muscle containing ryanodine receptor type 3. *Biophysical Journal*, 82(3), 1319–1328. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75487-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75487-8)
- Naseem, M. U., Gurrola-Briones, G., Romero-Imbachi, M. R., Borrego, J., Carcamo-Noriega, E., Beltrán-Vidal, J., Zamudio, F. Z., Shakeel, K., Possani, L. D., & Panyi, G. (2023). Characterization and Chemical Synthesis of Cm39 ( $\alpha$ -KTx 4.8): A Scorpion Toxin That Inhibits Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel KV1.2 and Small- and Intermediate-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels KCa2.2 and KCa3.1. *Toxins*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/toxins15010041>
- Nimmrich, V., & Gross, G. (2012). P/Q-type calcium channel modulators. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 167, Issue 4, pp. 741–759). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02069.x>
- Noebels, J. (2017). Precision physiology and rescue of brain ion channel disorders. In *Journal of General Physiology* (Vol. 149, Issue 5, pp. 533–546). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711759>
- Norton, R. S., & Pallaghy, P. K. (n.d.). *THE CYSTINE KNOT STRUCTURE OF ION CHANNEL TOXINS AND RELATED POLYPEPTIDES*.

- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. In *Toxicon* (Vol. 93, pp. 125–135). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>
- Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J., & Norton, R. S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded  $\alpha$ -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. In *Protein Science* (Vol. 3). Cambridge University Press.
- Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., & Becerril, B. (2000). *Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels*. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure)
- Pringos, E., Vignes, M., Martinez, J., & Rolland, V. (2011). Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: A close-up on  $\omega$ -agatoxins. In *Toxins* (Vol. 3, Issue 1, pp. 17–42). <https://doi.org/10.3390/toxins3010017>
- Raghavan, M., Fee, D., & Barkhaus, P. E. (2019). *Generation and propagation of the action potential* (pp. 3–22). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1>
- Ramírez, D., Gonzalez, W., Fissore, R. A., & Carvacho, I. (2017). Conotoxins as tools to understand the physiological function of voltage-gated calcium (CaV) channels. In *Marine Drugs* (Vol. 15, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md15100313>
- Registro de *tityus fasciolatus* em botucatu – SP, BRASIL. RECORD OF *TITYUS FASCIOLATUS* IN BOTUCATU – SP, BRASIL.
- Remme, C. A. (2013). Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: Electrophysiological, molecular and genetic aspects. *Journal of Physiology*, 591(17), 4099–4116. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.256461>
- Richards, K. S., Swensen, A. M., Lipscombe, D., & Bommert, K. (2007). Novel CaV2.1 clone replicates many properties of Purkinje cell CaV2.1 current. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2950–2961. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05912.x>
- Robbins, C. A., & Tempel, B. L. (2012). Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models. *Epilepsia*, 53(SUPPL. 1), 134–141. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x>
- Rodríguez De La Vega, R. C., & Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. In *Toxicon* (Vol. 43, Issue 8, pp. 865–875). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.022>
- Scanziani, M., & Häusser, M. (2009). Electrophysiology in the age of light. In *Nature* (Vol. 461, Issue 7266, pp. 930–939). <https://doi.org/10.1038/nature08540>
- Schwartz, E. F., Michelle Capes, E., Diego-García, E., Zamudio, F. Z., Fuentes, O., Possani, L. D., & Valdivia, H. H. (2009). Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi*

scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 157(3), 392–403. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00147.x>

Selvakumar, P., Fernández-Mariño, A. I., Khanra, N., He, C., Paquette, A. J., Wang, B., Huang, R., Smider, V. V., Rice, W. J., Swartz, K. J., & Meyerson, J. R. (2022). Structures of the T cell potassium channel Kv1.3 with immunoglobulin modulators. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31285-5>

Shahbazzadeh, D., Srairi-Abid, N., Feng, W., Ram, N., Borchani, L., Ronjat, M., Akbari, A., Pessah, I. N., De Waard, M., & El Ayeb, M. (2007). Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochemical Journal*, 404(1), 89–96. <https://doi.org/10.1042/BJ20061404>

Sidach, S. S., & Mintz, I. M. (2002). *Kurtoxin, A Gating Modifier of Neuronal High-and Low-Threshold Ca Channels*.

Singh, M., Sapkota, K., Sakimura, K., Kano, M., Cowell, R. M., Overstreet-Wadiche, L., Hablitz, J. J., & Nakazawa, K. (2023). Maturation of GABAergic Synaptic Transmission From Neocortical Parvalbumin Interneurons Involves N-methyl-D-aspartate Receptor Recruitment of Cav2.1 Channels. *Neuroscience*, 513, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.01.007>

Srairi-Abid, N., Othman, H., Aissaoui, D., & BenAissa, R. (2019). Anti-tumoral effect of scorpion peptides: Emerging new cellular targets and signaling pathways. In *Cell Calcium* (Vol. 80, pp. 160–174). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.003>

Stehling, E. G., Sforça, M. L., Zanchin, N. I. T., Oyama, S., Pignatelli, A., Belluzzi, O., Polverini, E., et al. (2012). Looking over toxin-K(+) channel interactions. Clues from the structural and functional characterization of  $\alpha$ -KTx toxin Tc32, a Kv1.3 channel blocker. *Biochemistry*, 51(9), 1885-94.

Tabakmakher, V. M., Krylov, N. A., Kuzmenkov, A. I., Efremov, R. G., & Vassilevski, A. A. (2019). Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Scientific Data*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0074-x>

Taylor, J. T., Zeng, X. Bin, Pottle, J. E., Lee, K., Wang, A. R., Yi, S. G., Scruggs, J. A. S., Sikka, S. S., & Li, M. (2008). Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 32, pp. 4984–4991). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4984>

Tibery, D. V. (2020). Peptídeos isolados da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria paulensis*: caracterização da atividade eletrofisiológica em canais iônicos dependentes de voltagem.

- Treptow, W., Tarek, M., & Klein, M. L. (2009). Initial Response of the Potassium Channel Voltage Sensor to a Transmembrane Potential. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(6), 2107–2109. <https://doi.org/10.1021/ja807330g>
- Triggle, D. (2006). L-Type Calcium Channels. *Current Pharmaceutical Design*, *12*(4), 443–457. <https://doi.org/10.2174/138161206775474503>
- Tsai, P. L., Chen, S. F., & Huang, S. Y. (2013). Mass spectrometry-based strategies for protein disulfide bond identification. *Reviews in Analytical Chemistry*, *32*(4), 257–268. <https://doi.org/10.1515/revac-2013-0011>
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., & Possani, L. D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms:  $\alpha$ -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences*, *20*(11), 444-447.
- Valdez-Velázquez, L. L., Olamendi-Portugal, T., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2018). Mass fingerprinting and electrophysiological analysis of the venom from the scorpion *Centruroides hirsutipalpus* (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *24*(1). <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0154-y>
- Valdivia, H. H., Kirbyf, M. S., Lederer, W. J., & Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-release channel of skeletal and cardiac muscle. In *Physiology* (Vol. 89).
- Van Baelen, A. C., Robin, P., Kessler, P., Maïga, A., Gilles, N., & Servent, D. (2022). Structural and Functional Diversity of Animal Toxins Interacting With GPCRs. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.811365>
- Wagner, S., Castro, M. S., Barbosa, J. A. R. G., Fontes, W., Schwartz, E. N. F., Sebben, A., Pires, O. R., Sousa, M. V., & Schwartz, C. A. (2003). Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon*, *41*(7), 737–745. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00008-4)
- Xiao, L., Gurrola, G. B., Zhang, J., Valdivia, C. R., SanMartin, M., Zamudio, F. Z., Zhang, L., Possani, L. D., & Valdivia, H. H. (2016). Structure–function relationships of peptides forming the calcin family of ryanodine receptor ligands. *Journal of General Physiology*, *147*(5), 375–394. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511499>
- Yellen, G. (2002). *The voltage-gated potassium channels and their relatives*. [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
- Yoshizawa, M. A. C. 2002. Estudo dos acidentes escorpiônicos no Distrito Federal de 1991-2000. Mestrado Dissertação, Universidade de Brasília, UnB.

- Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. In *Genome Biology* (Vol. 4). <http://genomebiology.com/2003/4/3/207>
- Zanotta, L. C. (2006). Isolamento e caracterização de peptídeos biologicamente ativos presentes na peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*.
- Zeng, X. C., Corzo, G., & Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. In *IUBMB Life* (Vol. 57, Issue 1, pp. 13–21). <https://doi.org/10.1080/15216540500058899>
- Zhang, N., Chen, X., Li, M., Cao, C., Wang, Y., Wu, G., Hu, G., & Wu, H. (2004). Solution structure of BmKK4, the first member of subfamily  $\alpha$ -KTx 17 of scorpion toxins. *Biochemistry*, *43*(39), 12469–12476. <https://doi.org/10.1021/bi0490643>
- Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., & Wenxin, L. (2006). Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon*, *47*(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.013>
- Zhou, K., Luo, W., Liu, T., Ni, Y., & Qin, Z. (2023). Neurotoxins Acting at Synaptic Sites: A Brief Review on Mechanisms and Clinical Applications. In *Toxins* (Vol. 15, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxins15010018>
- Zhu, S. (2008). Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha\beta$  defensins. *Molecular Immunology*, *45*(3), 828–838. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.354>