



Caracterização do efeito eletrofisiológico das mutações I1596S e V1627M em canais de sódio dependentes de voltagem associados à epilepsia e o efeito da toxina Tst2 isolada do escorpião *Tityus stigmurus*

Luis Felipe Santos Menezes

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni

Brasília

2023

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ciências Fisiológicas

**Caracterização do efeito eletrofisiológico das mutações I1596S
e V1627M em canais de sódio dependentes de voltagem
associados à epilepsia e o efeito da toxina Tst2 isolada do
escorpião *Tityus stigmurus***

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
de Brasília para aquisição do título de Doutor em
Biologia Molecular.**

Aluno: Luis Felipe Santos Menezes
Orientadora: Profa. Dra: Elisabeth Nogueira Ferroni

Brasília

2023

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais, à minha irmã, à minha namorada, ao meu afilhado, ao meu avô, à minha orientadora, à minha família, aos meus companheiros de laboratório e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela vida que me proporciona e agradecer meu pai George Washington Menezes, minha mãe Maria Domingas Santos Menezes e minha irmã Maria Carolina Santos Menezes. Amo muito vocês.

Gostaria de agradecer a minha namorada Sarah Torres Teixeira de Mello por todo suporte e incentivo em toda essa caminhada. Te amo. Aproveito para agradecer a minha sogra Sônia Maria ao meu sogro José Waldemar e a minha cunhada Maryam Torres.

Gostaria de agradecer a minha família, amigos e colegas de laboratório. Em especial ao Diogo Tibery, Adolfo Carlos Barros de Souza e Elias Sabiá por todo auxílio e colaboração no projeto.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Elisabeth Ferroni pela confiança e suporte e agradecer aos membros da banca de qualificação e de defesa pelas críticas, sugestões e disponibilidade.

Gostaria de agradecer o suporte financeiro para realização do meu trabalho. Em especial às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF). O presente trabalho foi realizado com bolsa e taxa de bancada do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Gostaria de dedicar minha tese ao meu afilhado Caetano e ao meu avô Jorge Menezes. Caetano é meu maior presente e tenho muito orgulho de ser padrinho de um menino tão especial e carinhoso. Ao meu avô, meu grande amigo que sinto muita falta, um enorme beijo e saiba que você sempre será uma inspiração para mim e que eu possa te orgulhar sempre.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo. ”

Nelson Mandela

RESUMO

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação. Esses canais são distribuídos por todo o corpo e possuem nove diferentes subtipos (Nav1.1-Nav1.9). Estruturalmente, possuem quatro domínios transmembrânicos, sendo que cada domínio possui seis α -hélices (S1-S6) e duas ou três subunidades β . Mudanças na cinética desses canais podem ocorrer tanto devido a mutações nos genes que codificam os canais iônicos acarretando as canalopatias (por exemplo, a epilepsia e a arritmia) quanto por efeito de toxinas de animais (como a dos escorpiões). A epilepsia é uma doença causada por uma atividade elétrica anormal cerebral. Ela pode ser focal, generalizada, focal e generalizada combinados ou desconhecida. Infecções (viral ou bacteriana no cérebro), doenças autoimunes, causas adquiridas e mutações genéticas são as principais etiologias. Dentre as mutações, pode-se citar as ocasionadas nos genes que expressam canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-), como as no gene *SCN2A* que codifica o canal Nav1.2. A variante I1596S foi associada à epilepsia por causar convulsão neonatal infantil benigna (BFNIS); a variante V1627M está associada à epilepsia da infância com crises focais migratórias (EIMFS) e a variante L1650P foi descrita por estar relacionada à encefalopatia epiléptica infantil precoce (EIEE). Muito do que se conhece acerca da estrutura e função dos canais de Na^+ se deu por meio do uso de ligantes específicos a essas proteínas, entre os quais as toxinas de escorpiões, em especial as que pertencem à família *Buthidae*. As espécies desta família são de maior importância médica pelo número e gravidade dos acidentes causando por suas espécies em humanos. A peçonha desses animais também tem se mostrado importante por seu potencial biotecnológico pela presença de moduladores de canais iônicos. A Tst2 é um peptídeo obtido na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* que possui alta porcentagem de identidade com peptídeos que possuem ação em canais de sódio dependentes de voltagem (NaScTx). Os objetivos desse trabalho foram a avaliação do efeito das variantes patogênicas I1596S, V1627M e L1650P, associadas à epilepsia, na cinética dos canais Nav1.2 humanos mutados e a realização da caracterização eletrofisiológica do peptídeo Tst2 em canais Navs. Como resultado obteve-se que a cinética do canal com a variante I1596S teve a probabilidade de abertura na ativação alterada para potenciais mais hiperpolarizados e a probabilidade de abertura na inativação alterada para potenciais

menos hiperpolarizados, e a mutação V1627M fez com que o canal Nav1.2 tivesse uma recuperação lenta da inativação mais acelerada que a do controle. Em relação a Tst2, a caracterização eletrofisiológica do efeito do peptídeo (100 nM) foi realizada nos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav1.1-Nav1.7). Para a probabilidade de abertura na ativação, o canal mais afetado foi o Nav1.1 (com pré pulso) e Nav1.7 (sem pré pulso). Nav1.3 foi o mais afetado na probabilidade de abertura na inativação e Nav1.4 na recuperação da inativação lenta do canal. Não foram observadas alterações na inativação rápida de nenhum subtipo testado. O canal Nav1.2 é expresso no sistema nervoso central (predomínio nos neurônios glutamatérgicos). Dito isso, mutações no gene *SCN2A* que geram ganho de função podem acarretar a atividade elétrica anormal cerebral. Por fim, o peptídeo Tst2 possui alta porcentagem de identidade com peptídeos tanto alfa quanto beta. Após a caracterização eletrofisiológica pode-se observar apenas a atividade de beta toxina, sendo o efeito observado de deslocamento da probabilidade de abertura dos canais devido ao aprisionamento do sensor de voltagem do domínio II em um estado pré ativado. Além disso, foi observada a redução da macrocorrente devido à passagem de alguns canais do estado fechado diretamente para o estado inativado. A caracterização eletrofisiológica da cinética da variante L1650P ainda não foi realizada e o sequenciamento parcial do peptídeo Tst2 está sendo realizado em colaboração com o grupo do Prof Lourival Possani do Instituto de Biotecnologia da UNAM, México.

Palavras chaves: Epilepsia, Canal de sódio dependente de voltagem, Nav1.2, canalopatias, *Tityus stigmurus*, Tst2, escorpião, Nav e toxina.

ABSTRACT

Voltage-gated sodium channels (Nav) are responsible for the initiation and propagation of the action potential. These channels are distributed throughout the body and have nine different subtypes (Nav1.1-Nav1.9). Structurally, they have four transmembrane domains, with each domain having six α -helices (S1-S6) and two or three β subunits. Changes in the kinetics of these channels can occur due to mutations in the genes that encode ion channels, resulting in channelopathies (eg epilepsy and arrhythmia) and the effect of animal toxins. Epilepsy is a disease caused by abnormal electrical activity in the brain. It can be focal, generalized, focal and generalized combined, or unknown. Infections (viral or bacterial in the brain), autoimmune diseases, acquired causes and genetic mutations are the main etiologies. Among the mutations, we can mention those caused in the genes that express voltage-dependent ion channels (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Cl^-), such as those in the *SCN2A* gene that encodes the Nav1.2 channel. The I1596S variant has been associated with epilepsy by causing benign neonatal infantile seizure (BFNIS); the V1627M variant is associated with childhood epilepsy with focal migratory seizures (EIMFS) and the L1650P variant has been described to be related to early infantile epileptic encephalopathy (EIEE). Furthermore, the scorpions of the Buthidae family are of greater medical importance due to the number and severity of accidents caused by their species in humans. The venom of these animals has also been shown to be important for its biotechnological potential due to the presence of ion channel modulators. Tst2 is a peptide obtained from the venom of the scorpion *Tityus stigmurus* that has a high percentage of identity with peptides that act on voltage-gated sodium channels (NaScTx). The objectives of this work were to evaluate the effect of the pathogenic variants I1596S, V1627M and L1650P, associated with epilepsy, on the kinetics of mutated human Nav1.2 channels and to carry out the electrophysiological characterization of the Tst2 peptide in Navs channels. As a result, it was found that the channel kinetics with the I1596S variant had the probability of opening upon activation altered for more hyperpolarized potentials and the probability of opening upon inactivation altered for less hyperpolarized potentials, and the V1627M mutation caused the Nav1.2 had a slower recovery from inactivation that was faster than the control. The electrophysiological characterization (Nav1.1-Nav1.7) of the peptide Tst2 (100 nM) was performed. For the probability of opening on activation, the most affected channel was Nav1.1 (with pre-

pulse) and Nav1.7 (without pre-pulse). Nav1.3 was most affected in the probability of opening on inactivation and Nav1.4 in the recovery of slow channel inactivation. No changes were observed in the rapid inactivation of any subtype tested. The Nav1.2 channel is expressed in the central nervous system (predominance in glutamatergic neurons). That said, mutations in the SCN2A gene that generate gain of function can lead to abnormal brain electrical activity. Finally, the Tst2 peptide has a high percentage of identity with both alpha and beta peptides. After the electrophysiological characterization, only the beta toxin activity could be observed, with the observed effect of shifting the probability of channel opening due to the entrapment of the domain II voltage sensor in a pre-activated state. In addition, a reduction in the macrocurrent was observed due to the passage of some channels from the closed state directly to the inactivated state. The electrophysiological characterization of the kinetics of the L1650P variant has not yet been carried out and the partial sequencing of the Tst2 peptide is being carried out in collaboration with Prof. Lourival Possani's group from the Institute of Biotechnology at UNAM, Mexico.

Key Words: Epilepsy, voltage-gated sodium channel, patch-clamp and channelopathies, *Tityus stigmurus*, Tst2, scorpion, eletrofisiology and scorpion toxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Canal de sódio dependentes de voltagem. Subunidade α representada nas cores rosa (domínio I), amarelo (domínio II), vermelho (domínio III), verde (domínio IV); subunidade β representada na cor azul, e sítio de inativação representado na cor laranja.	23
Figura 2. Relação entre o traço bruto de corrente de sódio com a cinética do canal de sódio.....	25
Figura 3. Local das mutações escolhidas no canal de sódio dependentes de voltagem Nav1.2. (A) Canal Nav1.2 com todos os domínios apresentados com destaque para o domínio IV (verde) e os locais das mutações escolhidas: posição 1596 (vermelho); posição 1627 (Roxo) e posição 1650 (Laranja). (B) Domínio IV do canal Nav1.2 com destaque para as posições dos aminoácidos escolhidos para o projeto. (C) Domínio IV do canal Nav1.2 com destaque para as posições dos aminoácidos escolhidos para o projeto visto de outro ângulo. Estrutura obtida pelo banco de dados PDB - código 6j8e (Human Nav1.2-beta2-KIIIA ternary complex) e visualizada pelo software Pymol.	33
Figura 4. Região de interação das α -NaScTxS e das β -NaScTxS nos canais de sódio dependentes de voltagem.	36
Figura 5. Sequência de aminoácidos da toxina Tst2 com destaque para as 4 pontes dissulfeto.	36
Figura 6. Sequência DNA e Tradução Tst2. Em cinza transparente está destaca a região do peptídeo sinal analisada pelo programa Signal IP 6. Região marcada em vermelho transparente está marcada a região removida pela amidação C-termial. C* representa a cisteína amidada.	37
Figura 7. Fluxo metodológico realizado no projeto de doutorado.	41
Figura 8. Protocolo de estimulação de voltagem sem pré-pulso	51
Figura 9. Protocolo de estimulação de voltagem com pré-pulso	51
Figura 10. Protocolo de avaliação da recuperação da inativação lenta (Recovery from inactivation).	52
Figura 11. Fragmentos na eletroforese em gel de agarose. Primeira coluna: marcador-escada Invitrogen™ Trackit™ 1 KB Plus DNA Ladder; Segunda coluna: plasmídeo após tratamento com enzima de restrição HindIII; Terceira coluna: plasmídeo integro.	56

Figura 12. Traço bruto de corrente de células HEK293T sem transfecção (Vermelho) e após transfecção do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet (Preto).	57
Figura 13. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet. (A) Probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na ativação. (B) Disponibilidade de canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na inativação. (C) Recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet. (D) Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet.	59
Figura 14. Fragmentos na eletroforese em gel de agarose. Primeira coluna: marcador-escada Invitrogen™ Trackit™ 1 KB Plus DNA Ladder; Segunda coluna: plasmídeo com a variante I1596S após tratamento com enzima de restrição HindIII; Terceira coluna: plasmídeo com a variante V1627M após tratamento com enzima de restrição HindIII; Quarta coluna: plasmídeo com a variante L1650P após tratamento com enzima de restrição HindIII.	60
Figura 15. Confirmação por sequenciamento da variante I1596S.	61
Figura 16. Confirmação por sequenciamento da variante V1627M.	62
Figura 17. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S. (A) Probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na ativação com a variante I1596S. (B) Disponibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na inativação com a variante I1596S. (C) Recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S. (D) Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S.	63

Figura 18. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M. (A) Probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na ativação com a variante V1627M. (B) Disponibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na inativação com a variante V1627M. (C) Recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M. (D) Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M.65

Figura 19. Perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta do escorpião *Tityus stigmurus* por HPLC em fase reversa. A fração destacada (seta) possui porcentagem de ACN de 37,8%. Fluxo de 1 mL/min e comprimento de absorção de 216nm.66

Figura 20. Perfil cromatográfico do segundo método cromatográfico obtido no HPLC em fase reversa. A fração destacada (seta) possui porcentagem de ACN de 25,11%. Fluxo de 1 mL/min e comprimento de absorção de 216nm.....67

Figura 21. Perfil cromatográfico do terceiro método cromatográfico obtido no HPLC em fase reversa. A fração destacada (seta) possui porcentagem de ACN de 26,42%. Fluxo de 1 mL/min e comprimento de absorção de 216nm.....68

Figura 22. Espectro de massa média do íon molecular da amostra purificada. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA).....69

Figura 23. Espectro de massa molecular monoisotópica $[M+2H]^{2+}$ da amostra purificada. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA)70

Figura 24. Alinhamento entre a Tst2 e toxinas com alta porcentagem de identidade. Aa: aminoácidos; Id: identidade e atividade (α -toxina ou β -toxina). P56611: Tb1; P0DQH5: Tf1a; P56612: Tst1; P15226: Ts1; H1ZZI1: To12; P68410: Ts2; C0HJM9: Tf2; P60276: Tb2-II; P56609: Tb2.....72

Figura 25. Gráficos de corrente/voltagem (I/V) com pré-pulso. Média das células com corrente normalizada. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM). ...74

Figura 26. Gráficos de corrente/voltagem (I/V) sem pré-pulso. Média das células com corrente normalizada. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM). ...75

Figura 27. Gráficos da probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem na ativação com pré-pulso. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).....	78
Figura 28. Gráficos da probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem na ativação sem pré-pulso. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).....	79
Figura 29. Gráficos da probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem na inativação. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).	81
Figura 30. Gráficos da recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Gráfico construído a partir da função ExpDec1. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).	85
Figura 31. Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem com pré-pulso. Valores de corrente máxima. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).	86
Figura 32. Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem sem pré-pulso. Valores de corrente máxima. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).	87
Figura 33. Estrutura dos aminoácidos isoleucina, serina, valina e metionina.....	88
Figura 34. Estrutura tridimensional do domínio IV do canal de sódio dependente de voltagem (A) e destaque dos segmentos S3 e S4 desse domínio (B). Estrutura obtida pelo banco de dados PDB - código 6j8e (Human Nav1.2-beta2-KIIIA ternary complex) e visualizada pelo software Pymol. Posição 1596 (vermelho); posição 1627 (Roxo) e posição 1650 (Laranja).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fração não inibida da corrente (I_u) com pré-pulso. Médias das células por subtipo (valor de corrente máxima) e seu respectivo erro padrão.....	73
Tabela 2. Fração não inibida da corrente (I_u) sem pré-pulso. Médias das células por subtipo (valor de corrente máxima) e seu respectivo erro padrão.....	73
Tabela 3. V_{half} na fase de ativação com pré pulso dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	76
Tabela 4. V_{half} na fase de ativação sem pré pulso dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	77
Tabela 5. V_{half} na fase de inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	80
Tabela 6. Sensibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem a voltagem na ativação com pré-pulso. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	82
Tabela 7. Sensibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem a voltagem na ativação sem pré-pulso. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	82
Tabela 8. Sensibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem a voltagem na inativação. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	83
Tabela 9. Valores de tau da recuperação da inativação lenta dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.....	84
Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos com a caracterização da cinética dos canais Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet sem mutação e com as variantes I1596S e V1627M. (*) Possui diferença estatística. Valores entre parênteses: número de células caracterizadas.....	90
Tabela 11. Variação do $V_{1/2}$ da probabilidade de abertura na inativação e variação do T da recuperação lenta do canal após aplicação da toxina Tf1a, Tst2 e após mutação do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com as variantes I1596S e	

V1627M. (x): Não foi adicionado devido a não diferença estatística entre a variante e o controle.....93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Peptídeos descritos do escorpião <i>Tityus stigmurus</i> e suas respectivas atividades.	34
Quadro 2. Componentes do meio LB ágar	42
Quadro 3. Volumes para realização do ensaio de enzima de restrição.....	42
Quadro 4. Especificações dos primers para uso no kit de mutagênese sitio dirigida e para a confirmação das mutações.	44
Quadro 5. Método cromatográfico peçonha bruta	46
Quadro 6. Segundo método cromatográfico.....	46
Quadro 7. Terceiro método cromatográfico.....	47
Quadro 8. Componentes da solução externa (Patch clamp).	49
Quadro 9. Componentes da solução interna (Patch clamp).	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: Acetonitrila

CHO: Ovário de hamster chinês (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*)

DBP: Peptídeos com pontes dissulfeto (do inglês, *Disulfide-bridged peptides*)

EGFP: Proteína fluorescente verde aprimorada (do inglês, *Enhanced green fluorescent protein*)

HCCA: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico

HEK: Rim embrionário humano (do inglês, *Human Embryonic Kidney*)

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High performance liquid chromatography*)

Kv: Canais de potássio dependentes de voltagem

NaScTx: Toxina escorpiônica moduladora de canais de sódio dependentes de voltagem

Nav: Canais de sódio dependentes de voltagem

NDBP: Peptídeos sem pontes dissulfeto (do inglês, *Non-disulfide-bridged peptides*)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

FAC: Fármaco anti-crise

GoF: Ganho de função (do inglês, *Gain of function*)

LoF: Perda de função (do inglês, *Loss of function*)

TFA: Ácido trifluoroacético

TOF: Tempo de voo (do inglês, *Time of flight*)

Tx: Toxina

BFNIS: Convulsões neonatais familiares benignas (do inglês, *Benign familial neonatal-infantile seizures*)

EIMFS: Epilepsia da infância com crises focais migratórias (do inglês, *Epilepsy of infancy with migrating focal seizures*)

EIEE: Encefalopatia epilética na primeira infância (do inglês, *Early childhood epileptic encephalopathy*)

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A: Alanina

C: Cisteína

D: Aspartato ou ácido aspártico

E: Glutamato ou ácido glutâmico

F: Fenilalanina

G: Glicina

H: Histidina

I: Isoleucina

K: Lisina

L: Leucina

M: Metionina

N: Asparagina

P: Prolina

Q: Glutamina

R: Arginina

S: Serina

T: Treonina

V: Valina

W: Triptofano

Y: Tirosina

Sumário

I. INTRODUÇÃO.....	22
1. Canais iônicos	22
2. Canais de sódio dependentes de voltagem.....	22
3. Cinética dos canais de sódio	23
4. Subtipos de canais de sódio.....	25
5. Epilepsia.....	26
6. Mutações nos genes que codificam os canais de sódio	28
6.1. Nav1.1 (<i>SCN1A</i>)	29
6.2. Nav1.2 (<i>SCN2A</i>)	30
6.3. Nav1.3 (<i>SCN3A</i>)	30
6.4. Nav1.6 (<i>SCN8A</i>)	31
6.5. Nav1.7 (<i>SCN9A</i>)	31
7. Variantes patogênicas I1596S, V1627M e L1650P (<i>SCN2A</i> - Nav1.2)	32
8. <i>Tityus stigmurus</i>	33
9. Toxinas de escorpião	33
10. Toxinas de escorpião com atividade em canais de sódio	35
11. Tst2	36
II. JUSTIFICATIVA.....	38
III. OBJETIVO.....	40
1. Objetivo geral	40
2. Objetivos específicos.....	40
IV. Material e Métodos	41
1. Biologia Molecular	41
1.1. Plasmídeo <i>SCN2A</i>	41
1.3. Extração de DNA plasmidial	42
1.4. Ensaio de enzima de restrição	42

1.5.	Desenho dos <i>primers</i>	43
1.6.	Mutagênese sítio dirigida	45
2.	Extração da peçonha do escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	45
3.	Purificação do peptídeo Tst2	45
3.1.	Soluções para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	45
3.2.	Cromatografia (HPLC)	45
3.3.	Espectrometria de massa	47
4.	Busca por similaridade	47
5.	<i>Patch-clamp</i>	48
5.1.	Cultura de células	48
5.2.	Meio de cultura (Células HEK 293)	48
5.3.	Meio de cultura (Células CHO)	48
5.4.	Meio de cultura (Células HEK 293T).....	48
5.5.	Transfecção de plasmídeo não integrativo	49
5.6.	Soluções para registro no <i>Patch clamp</i>	49
5.7.	Ensaio eletrofisiológicos.....	50
V.	Resultados.....	55
1.	Plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet	55
1.1.	Confirmação da integridade do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet	55
1.2.	Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet.....	57
2.	Variantes patogênicas	60
2.1.	Confirmação da integridade dos plasmídeos pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet após a realização das mutagêneses sítio dirigidas das variantes patogênicas	60
2.2.	Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S	62

2.3. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M64	
3. Purificação da toxina Tst2 da peçonha do <i>Tityus stigmurus</i>	66
4. Alinhamento Tst2	71
5. Caracterização eletrofisiológica da toxina Tst2 nos canais Nav1.1 a Nav1.7	72
5.1. Fração não inibida da corrente e I/V	72
5.2. Avaliação da probabilidade de abertura na ativação e da disponibilidade dos canais na inativação)	76
5.3. Recuperação da inativação lenta	83
5.4. Inativação rápida	86
VI. Discussão	88
VII. Conclusão	95
VIII. Perspectivas	96
IX. Referências	97

I. INTRODUÇÃO

1. Canais iônicos

Canais iônicos são proteínas de membranas celulares formadoras de poros que permeiam íons entre as regiões extracelulares e intracelulares (JENTSCH; HÜBNER; FUHRMANN, 2004). Têm como função a excitabilidade de membranas de células como os cardiomiócitos e os neurônios (CATTERALL, 2000). Dentre os canais dependentes de voltagem, podem-se citar os canais de sódio, canais de potássio, canais de cálcio e canais de cloreto (HÜBNER; JENTSCH, 2002).

2. Canais de sódio dependentes de voltagem

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação e interferem nos potenciais graduados (BOSMANS, 2005; COVARRUBIAS et al., 2015; GOLDSCHEN-OHM et al., 2013). São amplamente distribuídos pelo corpo e podem ser encontrados em células excitáveis como neurônios, células do músculo cardíaco e células musculares (NAMADURAI et al., 2015). Em relação à sua estrutura, os canais de sódio são compostos por dois tipos de subunidades, sendo elas a subunidade α de 260 kDa e a subunidade β (uma a três) de 33 a 36 kDa (CESTÈLE et al., 1998).

A subunidade α é dividida em 4 domínios homólogos transmembrânicos (CATTERALL et al., 2007). Cada um desses domínios possui seis α -hélices (S1 – S6) (CAMPOS; CORONAS; BEIRÃO, 2004; TREPTOW; KLEIN, 2012; TSAI et al., 2013). Já as subunidades β estão associadas a essas α -hélices (CLARE et al., 2000) (**Figura 1**). Três regiões se destacam nos Navs: os segmentos S4 que formam os sensores de voltagem, os segmentos S5 e S6 que formam o poro iônico e o sítio de inativação rápida do canal (AHERN et al., 2016; FERNANDES; BLEICHER; BEIRÃO, 2018; SOUZA; AMARAL; TREPTOW, 2014) (**Figura 1**). Os segmentos S4 são formados por quatro a oito resíduos de aminoácidos de carga positiva (arginina e lisina) intercalados, e alterações no potencial de membrana podem gerar movimentações nesses segmentos resultando na abertura do canal (BAGAL et al., 2015; PAYANDEH et al., 2012). Ademais, o poro possui seletividade para o Na^+ (íons como lítio também podem passar) gerando um influxo de sódio para o interior da célula (LENAEUS et al., 2017).

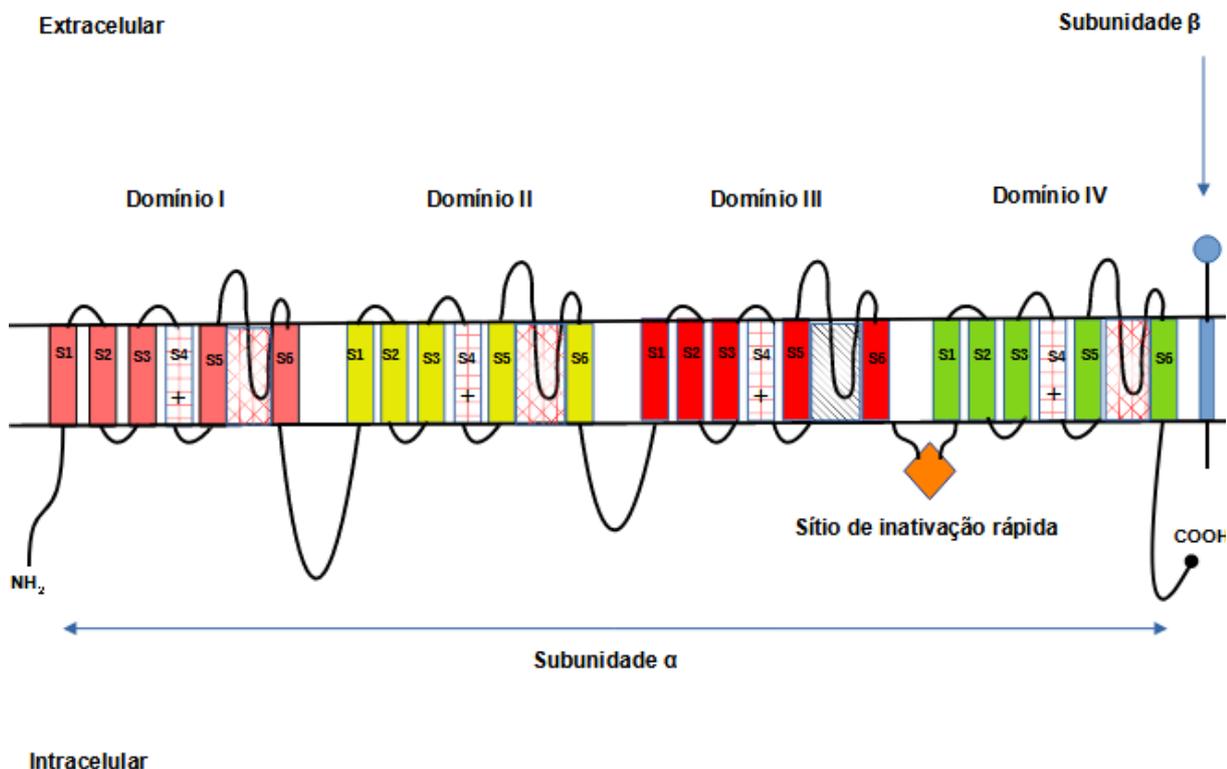


Figura 1. Canal de sódio dependentes de voltagem. Subunidade α representada nas cores rosa (domínio I), amarelo (domínio II), vermelho (domínio III), verde (domínio IV); subunidade β representada na cor azul, e sítio de inativação representado na cor laranja.

3. Cinética dos canais de sódio

A funcionalidade dos canais de sódio está diretamente relacionada à sua cinética, visto que a sensibilidade do canal à voltagem, tempo de abertura e/ou fechamento e tempo de recuperação influenciam na forma com que a atividade do canal atuará na excitabilidade das células. Os três estados que o canal pode ficar são: fechado, aberto e inativo (AHERN et al., 2016; HERNANDEZ; RICHARDS, 2022).

No estado fechado, os canais estão bloqueando a passagem dos íons de sódio, e nesse momento os quatro segmentos S4 estão na parte intracelular do canal (membrana celular em repouso). No estado aberto, os segmentos S4 dos domínios I-III estão voltados para a porção extracelular e apenas o segmento S4 do domínio IV ainda não se encontra totalmente na porção extracelular, por ser mais lento que os outros. Nesse momento, ocorre a despolarização e o influxo de íons sódio para a porção intracelular. Para o último estado (inativado), o segmento S4 do domínio IV fica completamente na porção extracelular, juntamente com os demais segmentos S4, e conseqüentemente faz com que a alça intracelular que conecta os domínios III e IV

obstrua o portão de inativação, bloqueando a passagem dos íons sódio. Por fim, os canais começam o processo de recuperação da inativação fazendo com que saiam do estado inativado para o estado fechado, estando assim, prontos para uma nova despolarização (AHERN et al., 2016; BARBER et al., 2012).

O potencial de ação é a mudança rápida e transitória na voltagem da membrana (GRIDER; JESSU; KABIR, 2023). A maioria das células excitáveis possuem 4 principais fases: a despolarização, a repolarização, a hiperpolarização e o retorno para o potencial de repouso. Contudo, para os cardiomiócitos pode-se citar 5 principais fases: a despolarização, a repolarização inicial, o platô, a repolarização e a fase de repouso. Essas fases estão associadas à cinética dos canais iônicos. Quando os estímulos gerados atingem o limiar de excitabilidade da célula (-60 a -40 mV) ocorre a despolarização da membrana e o início do potencial de ação mediada pelos canais de sódio (HAMMOND, 2015). A repolarização é mediada pelos canais de potássio. Contudo, por ter uma cinética mais lenta que a dos canais de sódio, até o fechamento total dos canais de potássio ocorre a hiperpolarização (GRIDER; JESSU; KABIR, 2023). Por fim, o equilíbrio de íons é realizado pela bomba de sódio e potássio (realiza o transporte de íons sódio para fora da célula e o transporte do íon potássio para dentro da célula a partir da degradação de ATP) atingindo assim, o potencial de repouso novamente (GRIDER; JESSU; KABIR, 2023). Ademais, para as células cardíacas, o platô é gerado devido à influência dos canais de cálcio que geram um equilíbrio entre a entrada de íon cálcio com a saída do íon potássio (HAMMOND, 2015).

Considerando-se a cinética dos canais de sódio, os três estados (fechado, aberto e inativado) estão diretamente relacionados com a despolarização das membranas celulares (1ª fase do potencial de ação). Durante o repouso, os canais de sódio encontram-se fechados. Entretanto, quando os estímulos gerados atingem o limiar de excitabilidade da célula, ocorre a despolarização da membrana e o início do potencial de ação. Essa depolarização ocorre em virtude da abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem, gerando um influxo de íons sódio, levando à alteração da polaridade da membrana celular (mais positivo dentro da célula e mais negativo fora). Após a abertura, os canais de sódio passam para o estado inativado, bloqueando o influxo de sódio (**Figura 2**). Em seguida, os canais de sódio se recuperam da inativação (estado inativado para o estado fechado). Após esse período

os canais tornam-se aptos novamente para uma nova despolarização (BAGAL et al., 2015).

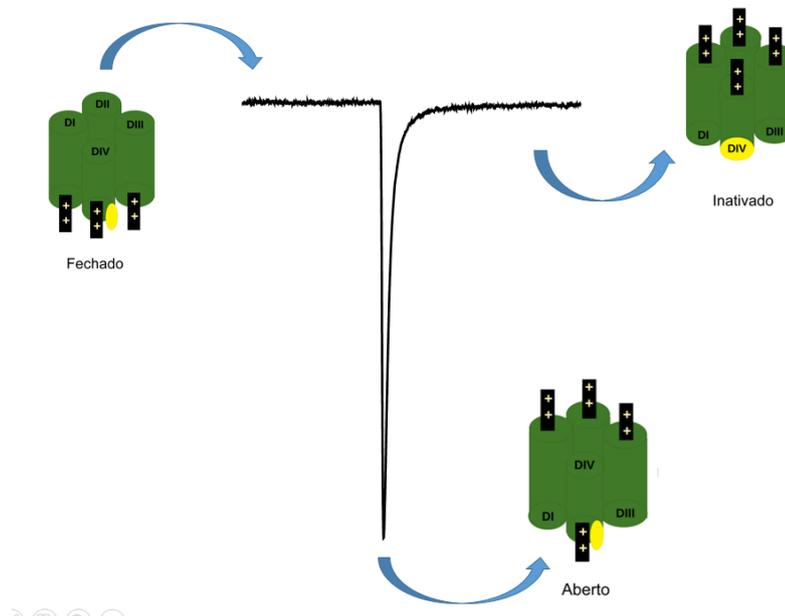


Figura 2. Relação entre o traço bruto de corrente de sódio com a cinética do canal de sódio.

4. Subtipos de canais de sódio

Nove subtipos de Navs são descritos na literatura, sendo elas nomeadas de Nav1.1 até Nav1.9 (CATTERALL et al., 2007). Cada isoforma tem sua distribuição característica. As isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.6 são principalmente expressas no sistema nervoso central (SCN) (GOLDIN et al., 2000), a isoforma Nav1.4 no músculo esquelético e a isoforma Nav1.5 no músculo cardíaco (BILLEN; BOSMANS; TYTGAT, 2008). A isoforma Nav1.7 é expressa em neurônios dos gânglios da raiz dorsal da medula (ESTACION et al., 2008) e as isoformas Nav1.8 e Nav1.9 são expressas em terminações nervosas e em gânglios da raiz dorsal, sendo elas relacionadas à nocicepção (BILLEN; BOSMANS; TYTGAT, 2008; YAN et al., 2017).

Devido à distribuição pelo corpo, mutações nos genes que codificam canais podem acarretar doenças chamadas canalopatias. Por exemplo, a paralisia periódica hipercalcêmica em mutações no gene *SCN4A* (Nav1.4) (SOKOLOV; SCHEUER; CATTERALL, 2007), a síndrome do QT longo em mutações no gene *SCN5A* (TFELT-

HANSEN et al., 2010), a epilepsia em mutações nos genes *SCN1A* (Nav1.1), *SCN2A* (Nav1.2), *SCN3A* (Nav1.3), *SCN8A* (Nav1.6) e *SCN9A* (Nav1.7) (MENEZES et al., 2020) e doenças relacionadas à dor em mutações nos genes *SCN10A* (Nav1.8) e *SCN11A* (Nav1.9) (EIJKELKAMP et al., 2012; YUAN et al., 2011).

5. Epilepsia

A epilepsia afeta cerca de 65 milhões de pessoas (DEVINSKY et al., 2018; KANNER; BICCHI, 2022; MILLIGAN, 2021), sendo ela uma doença caracterizada por uma atividade elétrica anormal cerebral (CHEN et al., 2022; ESCAYG; GOLDIN, 2010; KANNER; BICCHI, 2022). Clinicamente, a epilepsia é diagnosticada quando em um intervalo maior que 24 horas o paciente apresenta ao menos duas crises epiléticas não provocadas ou quando possui alta probabilidade (mais que 60%) de ocorrer novas crises nos próximos 10 anos após pelo menos uma crise não provocada ou diagnóstico de uma síndrome epilética (FISHER et al., 2014).

Os tipos de epilepsia são classificados em focal quando a atividade neuronal anormal começa em uma ou mais regiões localizadas do cérebro ou hemisfério, generalizada quando iniciada de forma generalizada e em ambos os hemisférios, combinada (focal e generalizada juntas) ou de início desconhecido quando os meios de detecção não conseguem determinar se foi focal ou generalizada (LEAGUE; EPILEPSY; PRIMARY, 2011).

A incidência é maior em países de baixa ou média renda (SAXENA; LI, 2017), sendo maior em pessoas mais jovens (na primeira infância, por exemplo) e em pessoas mais idosas (50 a 60 anos) (AUVIN, 2022; DEVINSKY et al., 2018; TONIOLO; ROMOLI; SEN, 2022). Alguns estudos demonstram uma incidência maior em pessoas do sexo masculino. Contudo, acredita-se que não ocorra essa diferença em relação ao sexo, mas sim uma subnotificação, devido à marginalização das mulheres em alguns países (DEVINSKY et al., 2018). Vale ressaltar que a epilepsia foi classificada como doença e não mais como uma desordem em 2014, visando dar mais visibilidade e importância à sua gravidade. Essa modificação foi feita pela Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE) e pela Secretaria Internacional para Epilepsia (IBE) (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018).

A epilepsia pode ser letal tanto direta quanto indiretamente. Pode-se citar o Estado de mal epilético, morte súbita inesperada e acidentes (ex: quedas e batidas de

carro) como formas diretas, e efeitos adversos de fármacos anticrises e suicídio como causas indiretas (CARNEIRO; MORTARI, 2019; DEVINSKY et al., 2018; GIAMBARBERI; MUNGER CLARY, 2022; RIBAN; FITZSIMONS; DURING, 2009). A epilepsia é diagnosticada tendo suporte de alguns exames como as características clínicas, eletroencefalograma (EEG), neuroimagem e testes genéticos (DEVINSKY et al., 2018; THIJS et al., 2019).

Atualmente o tratamento para a epilepsia está na administração de fármacos anticrises (FACs). Mais de 20 fármacos já foram liberados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela agência europeia de medicamentos (BARTMANN; SANDER, 2013). Contudo, os fármacos não curam a doença, e sim reduzem o grau das crises ou os seus intervalos. Ademais, alguns pacientes são fármaco resistentes, sendo a cirurgia uma outra possibilidade (BARTMANN; SANDER, 2013). Por fim, tratamentos alternativos podem ser utilizados como neuroestimulação, terapias dietéticas e ensaios clínicos de novos fármacos em curso (GARDELLA et al., 2018; INUZUKA-NAKAHARADA, 2008; PATEL et al., 2016). Apesar de não ter cura, a epilepsia é considerada resolvida caso o paciente esteja com 10 anos ou mais livre de crises e sem FACs nos últimos 5 anos ou pessoas fora da faixa etária de ocorrência de crise (síndrome idade-dependente) (FISHER et al., 2014).

Os principais mecanismos dos FACs incluem a modulação de canais de sódio dependentes de voltagem, bloqueadores de canais de cálcio dependentes de voltagem, aumento do neurotransmissor GABA, inibidores do neurotransmissor glutamatérgico, entre outros (ROGAWSKI; LÖSCHER; RHO, 2016). Eles podem ser divididos em FACs de primeira geração como os fármacos fenobarbital, fenitoína e etossuximida, FACs de segunda geração como diazepam, carbamazepina, valproato e clonazepam, e FACs de terceira geração como vigabatrina, lamotrigina e oxycarbamazepina (LÖSCHER et al., 2013). Existem alguns compostos em estudos como o canabidiol e o cenobamato (DEVINSKY et al., 2016b, 2018; KIRKPATRICK; O'CALLAGHAN, 2022).

Existem diversas etiologias possíveis para a epilepsia. Pode-se citar a estrutural como após lesão cerebral traumática ou após um acidente vascular cerebral (AVC), metabólica, autoimunes (esclerose múltipla), após doenças infecciosas como neurocisticercose, por variantes patogênicas e ainda as causas com etiologia desconhecidas (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). A renda do país está

diretamente relacionada com a etiologia. Por exemplo, epilepsias causadas por infecções são mais comuns em países menos desenvolvidos que em países desenvolvidos. Por fim, elas não são hierárquicas, sendo assim podem ocorrer mais de uma forma ao mesmo tempo (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018).

Nas epilepsias de etiologia genética, aproximadamente 1.000 genes associados a doença já foram descritos (WANG et al., 2017; WEI et al., 2017; ZHANG et al., 2019), entre os quais os genes *KCNQ2* e *KCNQ3* (canal de potássio), *PLCB1* (fosfolipase), *GABRG2* (receptor GABA_A), *SLC2A1* (GLUT1), *CHRNA2* (receptor nicotínico), *CACNA1A* (canal de cálcio), *ATP1A2* (ATPase sódio-potássio) (LOPES-CENDES; OLIVEIRA RIBEIRO, 2013) e os genes associados aos canais de sódio dependentes de voltagem *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN8A* e *SCN9A* (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7 respectivamente (MENEZES et al., 2020). A respeito das variantes em genes que codificam Nav associadas à epilepsia já foram publicados relatos de casos, identificação de variantes patogênicas em pacientes portadores da doença diagnosticadas por sequenciamento de nova geração e caracterizações da cinética dos canais mutados (LOSSIN et al., 2003; NICITA et al., 2010; ORSINI; ZARA; STRIANO, 2018; VEERAMAH et al., 2013; WOLFF et al., 2017; ZUCCA et al., 2008).

Por fim, uma forma de conscientização sobre a doença é o Dia Mundial de Conscientização da Epilepsia (*Purple day*), comemorado no dia 26 de março, caracterizado por todo o mundo vestir-se de roxo. Essa data tem como objetivo trazer reflexões, discussões e ensinamentos sobre a doença, tendo como foco acabar com preconceitos e paradigmas que pacientes com epilepsia vivenciam no seu dia a dia. Foi criada no Canadá no ano de 2008 por influência de uma criança chamada Cassidy e traz a cor roxa como referência a flor lavanda, conhecida por ter relação ao isolamento, representando o isolamento que pessoas com a doença sofrem. Após sua criação, a iniciativa ganhou robustez com o suporte do ILAE e atualmente é bastante difundida por todo mundo.

6. Mutações nos genes que codificam os canais de sódio

Mutações nos genes que codificam os canais de sódio dependentes de voltagem podem acarretar em alterações na cinética do canal fazendo com que possa ocorrer ganhos de função (GoF) ou perdas de função (LoF) (MANTEGAZZA et al., 2005; VANOYE et al., 2014; WENGERT et al., 2019; YE et al., 2018; ZAMAN et al., 2018; ZHANG et al., 2020b). Alterações como aumentar a densidade de corrente,

alterar o deslocamento da ativação para potenciais mais negativos (hiperpolarizados), deslocar a inativação para potenciais mais positivos, recuperar a inativação dos canais mais aceleradamente, e desacelerar a inativação rápida geram GoF. Ademais, diminuir a densidade de correntes, deslocar a ativação e inativação para potenciais mais positivos e mais negativos, respectivamente, recuperar a inativação mais demoradamente e acelerar a inativação rápida acarretam em LoF (MENEZES et al., 2020).

6.1. Nav1.1 (SCN1A)

Existem aproximadamente 1.700 mutações descritas para o gene *SCN1A*, que codifica o canal Na_v1.1. Tem-se descrito cerca de 1.500 variantes patogênicas associadas à epilepsia (MENEZES et al., 2020). O subtipo de canal Nav1.1 é altamente expresso no SNC, tendo sua predominância em interneurônios inibitórios GABAérgicos (TAI et al., 2014). Esses interneurônios geram estímulos inibitórios que irão ocasionar o balanceamento com os estímulos excitatórios de outros neurônios para o funcionamento normal do neurônio. A perda de função dessa isoforma pode acarretar em desbalanceamento na excitabilidade celular causando uma atividade neuronal anormal devido a uma predominância dos estímulos excitatórios (TAI et al., 2014; VERRET et al., 2012; YU et al., 2006).

As principais doenças associadas a Nav1.1 são: epilepsia generalizada com crises febris *plus* (GEFS+) e síndrome de Dravet (ESCAYG; GOLDIN, 2010; HUANG et al., 2017; MENG et al., 2015). Dentre as mutações, pode-se citar a T391P e a L1717P que foram descritas por causarem crises generalizadas tônico clônicas (REYES et al., 2011; VERBEEK et al., 2013), a N1011I que reduz a densidade de corrente (FUJIWARA, 2003; RHODES et al., 2005) e a G1754R que gera crises focais (PETRELLI et al., 2012).

O tratamento para a epilepsia associada a variantes patogênicas no gene *SCN1A* está voltado para o aumento da transmissão GABAérgica pós-sináptica ou para a diminuição da degradação de GABA. Ademais, bloqueadores de canal de sódio são contraindicados como forma de tratamento para esse subtipo de canal, devido à perda de função dos canais e por consequência um possível aumento no desbalanceamento da excitabilidade neuronal (KNUPP; WIRRELL, 2018; ZIOBRO et al., 2018).

6.2. Nav1.2 (SCN2A)

O subtipo Nav1.2 é expresso no SNC, com predomínio nos neurônios glutamatérgicos (SANDERS et al., 2018; SYRBE et al., 2016). Conseqüentemente, opostamente ao Nav1.1, o ganho de função desses canais pode acarretar no aumento da excitabilidade celular. Atualmente, estão descritas mais de 100 mutações no gene *SCN2A* relacionadas à epilepsia. As doenças mais comuns são síndrome de West, epilepsia da infância com crises focais migratórias e convulsões neonatais familiares benignas (MENEZES et al., 2020).

Variantes patogênicas com GoF nesse canal estão predominantemente associadas a epilepsia. Dentre as variantes pode-se citar a L1563V que acelera a recuperação do canal (BERECKI et al., 2018; LAUXMANN et al., 2013; SCALMANI et al., 2006), a Y1589C que aumenta as correntes persistentes de Na⁺ (LAUXMANN et al., 2013), a R220G que gera crises generalizadas tônico clônicas (MERCIMEK-MAHMUTOGLU et al., 2015) e a R1882G que aumenta a densidade de corrente de sódio (CARVILL et al., 2013; WOLFF et al., 2017).

O tratamento de epilepsias associadas ao gene *SCN2A* está relacionado à administração de bloqueadores de canais de sódio como carbamazepina, fenitoína, lamotrigina e mexilentina (MUSTO; GARDELLA; MØLLER, 2020). Contudo, efeitos adversos devido à alta identidade entre os subtipos de canal de sódio dependentes de voltagem devem ser observados (SANDERS et al., 2018).

6.3. Nav1.3 (SCN3A)

O subtipo Nav1.3 é encontrado principalmente durante o desenvolvimento embrionário e neonatal, sendo no período pós-natal pouco detectável nos indivíduos (durante a infância é substituído pelos canais Nav1.1) (FELTS et al., 1997; ZAMAN et al., 2018).

Os casos associando a mutação no gene *SCN3A* e a epilepsia são de ganho de função, entretanto já foram descritas mutações que geraram perda de função. Pode-se citar a variante K354Q que aumenta as correntes persistentes de sódio (ESTACION et al., 2010; HOLLAND et al., 2008), a variante M1765I relacionada a paciente com crises focais e generalizadas (INUZUKA et al., 2019, 2021) e a variante P1333L que aumenta a densidade de corrente (TRUJILLANO et al., 2017; ZAMAN et al., 2018). O tratamento indicado para pacientes com epilepsias relacionadas ao gene

SCN3A é a utilização de bloqueadores de canais de sódio como a carbamazepina (ZAMAN et al., 2018). Além disso, pode-se citar o ácido valpróico como forma de tratamento para paciente com variantes patogênicas nesse gene (TAN et al., 2017).

6.4. Nav1.6 (*SCN8A*)

Aproximadamente, 200 mutações no gene *SCN8A* relacionadas à epilepsia já foram descritas (MENEZES et al., 2020). Essa isoforma é altamente expressa nas regiões entre as bainhas de mielina de axônios mielinizados e em partes distais dos segmentos iniciais do axônio (AIS). Dito isso, esse canal pode ser encontrado no SNC e SNP, tanto em neurônios inibitórios quanto em neurônios excitatórios (CALDWELL et al., 2000; OLIVA; BERKOVIC; PETROU, 2012). As principais mutações associadas à epilepsia são de ganho de função devido ao AIS estar relacionado com acionamento do potencial de ação (KATZ et al., 2018).

Pelo fato do Nav1.6 também ser expresso em músculos e tecidos cardíacos (como miócitos ventriculares), a principal causa de morte em pacientes com epilepsia está relacionada a essa isoforma. Conhecida como morte súbita inesperada, mutações nesse gene associadas à epilepsia podem acarretar no mal funcionamento do canal também no coração, causando falha no sistema cardiorrespiratório e consequentemente resultando na morte do paciente (GARDELLA et al., 2018; JOHANNESSEN et al., 2018)

Ademais, as mutações no gene *SCN8A* estão relacionadas à encefalopatia epiléptica infantil precoce tipo 13 (HAMMER et al., 2016). Por exemplo, a variante R1617Q aumenta as correntes persistentes de sódio (OHBA et al., 2014; RAUCH et al., 2012) e a variante R1872L desloca a inativação para potenciais mais positivos (LINDY et al., 2018; SPRISLER et al., 2017; WAGNON et al., 2016). Pacientes com epilepsia associadas a mutação no gene *SCN8A* apresentaram resposta positiva ao tratamento com bloqueadores de canal de sódio como a fenitoína (BRAAKMAN et al., 2017).

6.5. Nav1.7 (*SCN9A*)

O canal Nav1.7 é expresso no SNP e SNC, e diversas mutações no seu gene estão relacionadas à dor (DOTY, 2010; HAN et al., 2009). Entretanto, alguns estudos já mostraram a relação de mutações no gene *SCN9A* e epilepsia (CEN et al., 2017; SINGH et al., 2009; YANG et al., 2018; ZHANG et al., 2020a). Por exemplo, a variante

Q10R está relacionada a GEFS+ e causa crises generalizadas tônico clônicas (CEN et al., 2017).

7. Variantes patogênicas I1596S, V1627M e L1650P (SCN2A - Nav1.2)

Após uma vasta revisão bibliográfica feita por Menezes e colaboradores (2020), as variantes patogênicas escolhidas para esse projeto foram I1596S, V1627M e L1650P no gene *SCN2A* (Nav1.2) (**Figura 3**).

As mutações escolhidas estão todas localizadas no domínio IV do canal de sódio dependente de voltagem devido a ser um dos sítios de interação de peptídeos moduladores de canais de sódio isolados das peçonhas de escorpiões, uma das principais linhas de pesquisa do Laboratório de Eletrofisiologia do grupo de pesquisa em Neurofarmacologia da UnB. Dito isso, a escolha dessa região para as mutações teve como perspectiva trabalhos futuros relacionando a caracterização da cinética dessas variantes patogênicas com ação de NaScTxS, visando a busca de possíveis novos tratamentos.

A mutação I1596S foi descrita por Herlenius e colaboradores (2007). O estudo traz uma avaliação clínica e genética de uma família que era afetada por convulsão neonatal infantil familiar benigna (BFNIS) (HERLENIUS et al., 2007). O probando foi uma mulher australiana de 34 anos que apresentou crises aos 8 meses de idade. Além disso, nove outros integrantes dessa família também apresentaram crises. No geral, elas consistiam em revirar os olhos/olhos brancos, seguida de convulsões unilaterais ou bilaterais. As remissões em todos os indivíduos foram aos 12 meses de idade. Após sequenciamento foi observado a mutação I1596S em 8 indivíduos da família, contudo para o probando não foi identificado a mutação nessa posição.

A mutação V1627M foi descrita por Wolff e colaboradores (2017) e traz dados fenotípicos de indivíduos com diferentes mutações no gene *SCN2A*. Para a mutação em questão, foi relatado que o paciente tinha epilepsia da infância com crises focais migratórias (EIMFS), tendo início aos dois dias de idade e tendo resposta positiva ao tratamento com vigabatrina (WOLFF et al., 2017).

A mutação L1650P foi descrita por Trump e colaboradores (2016), que relatam um indivíduo com a mutação e que possuía encefalopatia epiléptica infantil precoce (EIEE) (TRUMP et al., 2016).

Entretanto, estudos de caracterização eletrofisiológica da cinética dessas variantes ainda não foram realizados. O entendimento da cinética dessas mutações é de importância para a busca de tratamentos mais específicos para os pacientes.

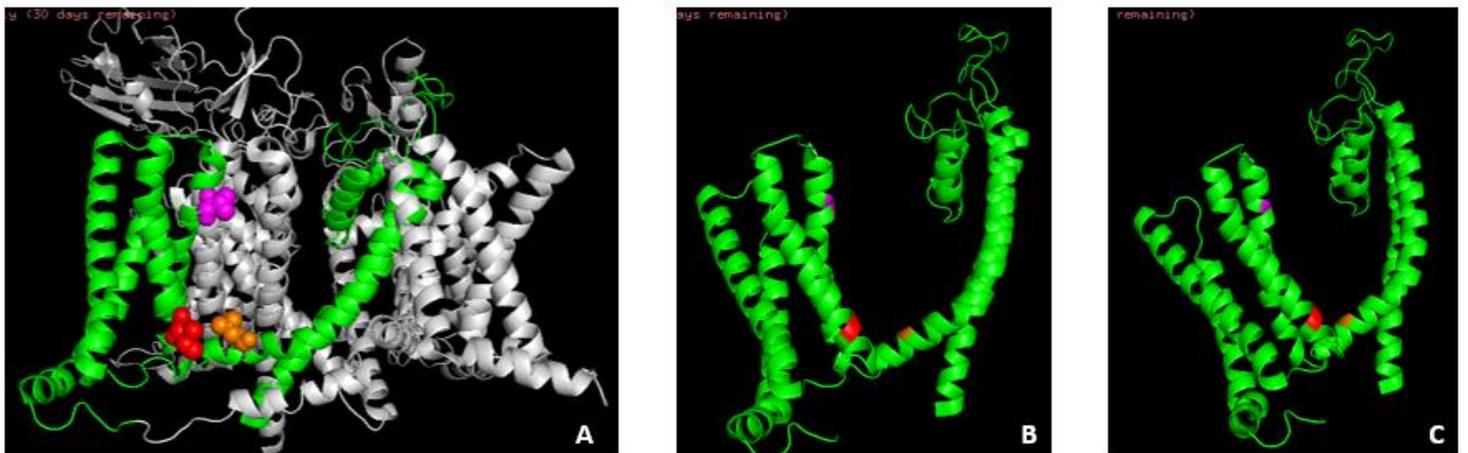


Figura 3. Local das mutações escolhidas no canal de sódio dependentes de voltagem Nav1.2. (A) Canal Nav1.2 com todos os domínios apresentados com destaque para o domínio IV (verde) e os locais das mutações escolhidas: posição 1596 (vermelho); posição 1627 (Roxo) e posição 1650 (Laranja). (B) Domínio IV do canal Nav1.2 com destaque para as posições dos aminoácidos escolhidos para o projeto. (C) Domínio IV do canal Nav1.2 com destaque para as posições dos aminoácidos escolhidos para o projeto visto de outro ângulo. Estrutura obtida pelo banco de dados PDB - código 6j8e (Human Nav1.2-beta2-KIIIA ternary complex) e visualizada pelo software Pymol.

8. *Tityus stigmurus*

Escorpião de aproximadamente 7 cm, mancha escura em formato de triângulo no prossoma, pernas e pedipalpos amarelos além de serrilha no metassoma. Possui distribuição nas regiões Nordeste e Sudeste (FURTADO et al., 2020). É o escorpião com maior relação de acidentes da região Nordeste (LIRA-DA-SILVA; AMORIM; BRAZIL, 2000). O envenenamento por esse escorpião é caracterizado por apresentar bastante dor, parestesia, vômito, dor de cabeça e hipoestesia (LIRA-DA-SILVA; AMORIM; BRAZIL, 2000).

9. Toxinas de escorpião

Diversos compostos podem ser encontrados na peçonha de escorpiões, entre os quais aminas bioativas, enzimas, lipídeos, proteínas e peptídeos (BATISTA et al., 2004; POSSANI et al., 1999). Os peptídeos podem ser classificados em dois grupos: os peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs) e os peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBPs) (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014).

Os DBPs atuam principalmente em canais iônicos de membrana e podem ser divididos em: DBPs de cadeia longa, com aproximadamente 60 a 70 resíduos de aminoácidos e três ou quatro de pontes dissulfeto (6 ou 8 cisteínas) e atuação em canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) ou em canais de potássio dependentes de voltagem (Kv), e os DBPs de cadeia curta, com cerca de 20 a 40 resíduos de aminoácidos e de duas a quatro pontes dissulfeto (4 a 8 cisteínas) e atuação em canais de potássio dependentes de voltagem (Kv), canais de cálcio ou canais de cloreto (RATES et al., 2008; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005; VASCONCELOS et al., 2005). Os NDBPs podem possuir atividade antimicrobiana, hipotensora ou imunomoduladora (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; ZENG; CORZO; HAHIN, 2005).

A peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* vem sendo investigada quanto à sua toxicidade e a prospecção de peptídeos ativos (ALMEIDA et al., 2012; BATISTA et al., 2007; BECERRIL et al., 1996; BECERRIL; MARANGONI; POSSANI, 1997; NASCIMENTO et al., 2006). Possui peptídeos como a Tst1, Tst2, Tst3 e Tst17 (BATISTA et al., 2007). Diversos peptídeos já foram caracterizados como por exemplo a Tst1 que possui atividade de inibição de corrente nos canais Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.4, mas não possui atividade nos canais Nav1.1, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (OLIVEIRA DA MATA et al., 2022) e a Tst17 que tem ação de inibição em canais de potássio *Shaker B* (BATISTA et al., 2007) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Peptídeos descritos do escorpião *Tityus stigmurus* e suas respectivas atividades.

Peptídeos	Atividade	Referência
Tst1	Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.4	(OLIVEIRA DA MATA et al., 2022)
Tst2	-	(BECERRIL et al., 1996)
Tst3	Nav1.1-Nav1.5 e Nav1.7	Tese de doutorado Daniel Oliveira da Mata
Stigmurina	Antimicrobiano	(AMORIM-CARMO et al., 2019; CUNHA NETO et al., 2015; DANIELE-SILVA et al., 2016, 2021; PARENTE et al., 2018)
Tst17	Shaker B	(BATISTA et al., 2007)
Hyaluronidase	Ácido hialurônico	(BATISTA et al., 2007)
Tst-beta-KTx	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3,	(DIEGO-GARCÍA et al., 2008)

TstKMK	-	-
Alpha-KTx 12.4	Shaker B	
Alpha-KTx 13.4	Shaker B	(BATISTA et al., 2007)
Peptídeo tipo lisozima	Antimicrobiano	
Alpha-KTx 4.6	Kv1.2 e Kv1.3	(PAPP et al., 2009)
Alpha-KTx 4.7	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6, Kv1.5, Kv2.1, Kv7.1, ERG e Shaker	-

10. Toxinas de escorpião com atividade em canais de sódio

As toxinas de escorpião com atividade em canais de sódio dependentes de voltagem (NaScTxS) são divididas em duas famílias conforme seu efeito na cinética dos canais: as α -NaScTxS e as β -NaScTxS (CATTERALL et al., 2007; POSSANI et al., 1999). As α -toxinas inibem a inativação rápida dos canais e, conseqüentemente, resultam no prolongamento do potencial de ação (CAMARGOS et al., 2015) e as β -toxinas alteram a ativação dependente de voltagem para potenciais mais hiperpolarizados e reduzem a amplitude de corrente (DUQUE et al., 2017; MENEZES et al., 2023).

As α -NaScTxS atuam no *loop* S3-S4 do domínio IV dos canais - sítio 3 (**Figura 4**) e podem ser classificadas em 3 grupos: as clássicas (ação nos canais de sódio dependentes de voltagem de células de mamífero e com pouca ação em células de inseto), anti-inseto (ação em células de inseto e baixa atuação em células de mamífero) e *like* (ação em ambas as células) (CAMPOS; CORONAS; BEIRÃO, 2004; GUERRERO-VARGAS et al., 2012). Já as β -NaScTxS atuam no sítio 4 do domínio II (**Figura 4**) e são divididas em 4 grupos: anti-mamífero (ação em células de mamífero), depressoras anti-inseto (atuam em células de inseto gerando uma forte despolarização da membrana axonal e paralisia flácida), excitatórias anti-inseto (atuam em células de inseto produzindo paralisia espasmódica nos nervos motores) e *like* (ação tanto em células de mamífero quanto nas de inseto) (BOSMANS; MARTIN-EAUCCLAIRE; TYTGAT, 2007; CAMPOS et al., 2007; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005).

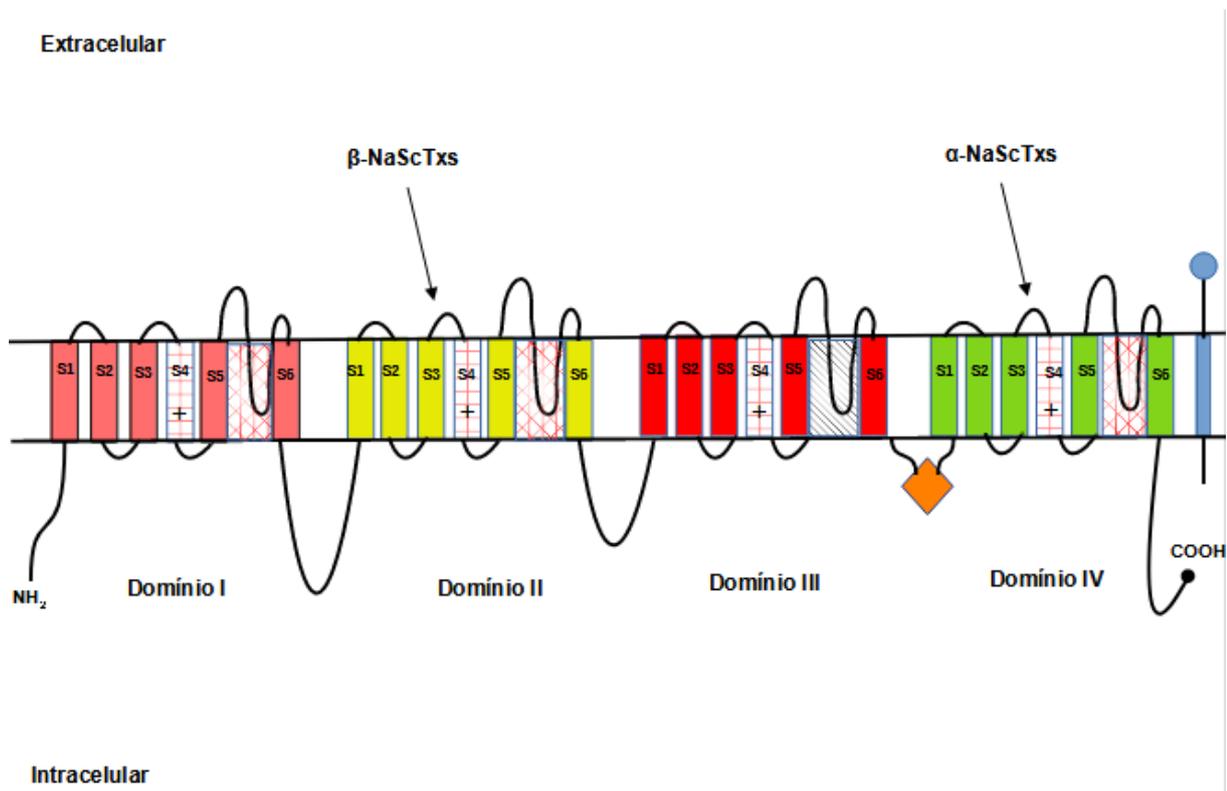


Figura 4. Região de interação das α -NaScTx e das β -NaScTx nos canais de sódio dependentes de voltagem.

11. Tst2

Inicialmente denominada toxina III-8st, a Tst2 é um peptídeo com uma sequência de 62 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto (11-62, 15-38, 23-43, 27-45) (BECERRIL et al., 1996) (**Figura 5**).

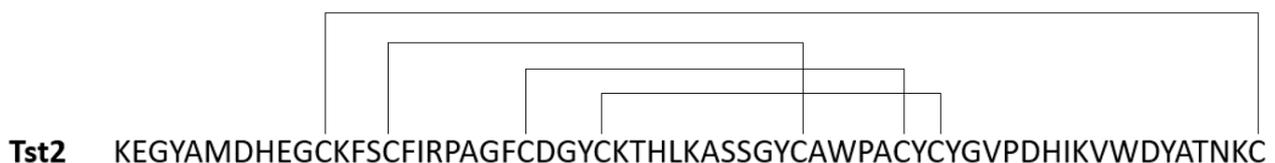


Figura 5. Sequência de aminoácidos da toxina Tst2 com destaque para as 4 pontes dissulfeto.

Becerril e colaboradores (1996) descreveram a ocorrência da Tst2 peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*, sua purificação e estrutura primária. Batista e colaboradores (2007) mostraram que o peptídeo eluiu aos 36,24% de ACN em uma

cromatografia de fase reversa da peçonha bruta e que a massa molecular obtida por espectrometria de massa por ionização por eletrospray foi de 6989,2 Da (BATISTA et al., 2007). Almeida e colaboradores (2012) realizaram a análise do transcriptoma da peçonha bruta e obtiveram a sequência precursora do peptídeo.

A partir do trabalho de Almeida e colaboradores e utilizando-se do auxílio das ferramentas ORF finder – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>) foi possível obter dados como peptídeo sinal, peptídeo maduro e o sinal para amidação. Dito isso, a sequência precursora da Tst2 possui um peptídeo sinal de 20 resíduos de aminoácidos, 62 resíduos de aminoácidos como peptídeo maduro e uma amidação pós-traducional na região C-terminal (**Figura 6**).

1 -	ATG	AAG	GGA	TTT	CTT	TTG	TTT	ATC	AGC	ATC	TTG	ATG	ATG	ATT	GGA	ACT	ATT	GTG	GTG	GGA	- 60
1 -	M	K	G	F	L	L	F	I	S	I	L	M	M	I	G	T	I	V	V	G	- 20
61 -	AAG	GAA	GGC	TAT	GCC	ATG	GAT	CAC	GAA	GGA	TGC	AAA	TTT	AGC	TGT	TTC	ATA	AGA	CCA	GCA	- 120
21 -	K	E	G	Y	A	M	D	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	A	- 40
121 -	GGC	TTT	TGT	GAT	GGT	TAC	TGC	AAA	ACA	CAT	TTG	AAG	GCA	AGT	TCA	GGC	TAT	TGC	GCT	TGG	- 180
41 -	G	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	A	W	- 60
181 -	CCA	GCC	TGT	TAC	TGC	TAC	GGG	GTC	CCA	GAT	CAT	ATA	AAA	GTT	TGG	GAC	TAT	GCC	ACA	AAT	- 240
61 -	P	A	C	Y	C	Y	G	V	P	D	H	I	K	V	W	D	Y	A	T	N	- 80
241 -	AAA	TGT	GGC	AAA	TAA																- 255
81 -	K	C*	G	K	STOP																- 100

Figura 6. Sequência DNA e Tradução Tst2. Em cinza transparente está destaca a região do peptídeo sinal analisada pelo programa Signal IP 6. Região marcada em vermelho transparente está marcada a região removida pela amidação C-terminal. C* representa a cisteína amidada.

II. JUSTIFICATIVA

A epilepsia afeta cerca de 65 milhões de pessoas no mundo (MILLIGAN, 2021). A doença pode ser letal tanto diretamente, devido ao *status epilepticus* ou morte súbita inesperada, quanto pelos efeitos indiretos como o suicídio (DEVINSKY et al., 2016a).

Existem cerca de 1.000 diferentes genes associados à epilepsia para a etiologia genética (WEI et al., 2017; ZHANG et al., 2019), sendo que em um único gene pode-se encontrar diversas mutações relacionadas ao fenótipo da epilepsia. As variantes patogênicas em estudo já foram descritas por estarem presentes em pacientes que possuem o fenótipo para epilepsia (HERLENIUS et al., 2007; TRUMP et al., 2016; WOLFF et al., 2017). Entretanto, foram apenas estudos clínicos e/ou genéticos. Dito isso, caracterizar a cinética desses canais mutados auxiliará para um melhor entendimento do seu funcionamento e, assim, proporcionar um melhor direcionamento para futuros tratamentos.

Existem diversas formas de tratamento como os antiepiléticos (FACs) e cirurgia, porém ainda observam-se problemas na eficácia e segurança (efeitos adversos) dos fármacos e ilegitimidade de diversos pacientes para os procedimentos cirúrgicos (DEVINSKY et al., 2018; MALAGÓN-VALDEZ, 2004).

Fundações como a *FamilieSCN2A Foundation* (www.scn2a.org) podem ser beneficiar dessas caracterizações, visto que uma das missões da organização está voltada para o melhor entendimento da doença tendo como um dos objetivos a busca por novos tratamentos que possam melhorar a vida do indivíduo com epilepsia e de sua família.

Peçonhas e venenos animais são conhecidos por possuírem compostos bioativos como proteínas e peptídeos que podem ter potenciais biotecnológicos ou utilizados como ferramentas de estudo (MONGE-FUENTES et al., 2015). A Tst2 foi descrita há mais de 25 anos, mas sua atividade biológica era desconhecida até agora. Após alinhamento com outros peptídeos, pode-se prever que a ação da Tst2 é em canais de sódio dependentes de voltagem, conseqüentemente existem diversas características a serem estudadas sobre o efeito do peptídeo na cinética dos subtipos dos canais Nav. Com o alinhamento da Tst2 com outros peptídeos, pode-se observar

uma identidade de 100% com a Ts2 do escorpião *Tityus serrulatus*, cuja caracterização eletrofisiológica foi realizada previamente (COLOGNA et al., 2012). Contudo, as metodologias empregadas e as concentrações de estudo entre Ts2 e Tst2 foram diferentes. Além de serem peptídeos obtidos de escorpiões de diferentes espécies.

A caracterização eletrofisiológica da Tst2 poderá ser usada em estudos de canais iônicos (ensaios eletrofisiológicos) como uma ferramenta, além de um possível benefício industrial, considerando o potencial neurofarmacológico da toxina. Na literatura, existem exemplos de compostos obtidos de peçonhas de animais que foram base para o desenvolvimento de fármacos. Por exemplo, o Captopril que é um fármaco desenvolvido a partir da peçonha da *Bothrops jararaca* e que é usado para o tratamento de hipertensão arterial (MCGIVERN, 2007).

III. OBJETIVO

1. Objetivo geral

Caracterizar eletrofisiologicamente a cinética da subunidade α do canal de sódio dependente de voltagem Nav1.2 com as variantes I1596S, V1627M e L1650P e Caracterizar o efeito do peptídeo Tst2 isolado do escorpião *Tityus stigmurus* na cinética de canais de sódio dependentes de voltagem.

2. Objetivos específicos

- Isolar o plasmídeo que expressa o canal Nav1.2;
- Mutar o plasmídeo com as variantes em estudo (I1596S, V1627M e L1650P);
- Transfectar os canais com e sem as variantes patogênicas em células HEK293T separadamente;
- Caracterizar a cinética dos canais de sódio dependentes de voltagem com e sem as variantes patogênicas;
- Purificar o peptídeo Tst2 presente na peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*;
- Obter a massa monoisotópica do peptídeo Tst2;
- Obter o sequenciamento parcial do peptídeo;
- Avaliar ação do peptídeo Tst2 por ensaios eletrofisiológicos nos canais Nav1.1 a Nav1.7.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Doutorado

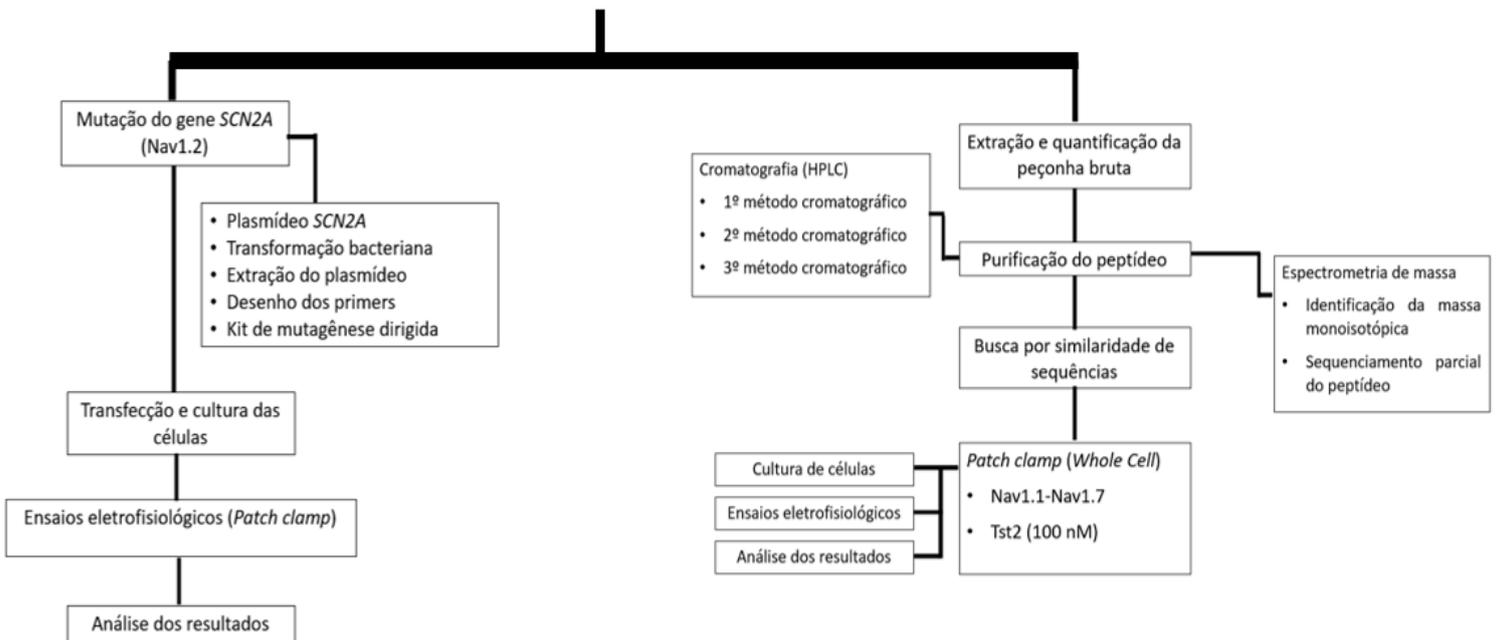


Figura 7. Fluxo metodológico realizado no projeto de doutorado.

1. Biologia Molecular

1.1. Plasmídeo SCN2A

O plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet, em bactéria (*agar stab*), foi adquirido da Addgene (Plasmid #162279). O plasmídeo tem como objetivo a expressão eucariótica da isoforma humana de SCN2A, sendo ele modificado para possibilitar ser mantido em cepa bacteriana de forma estável. Possui resistência a canamicina e expressa uma proteína fluorescente vermelha (mScarlet) com excitação máxima em 569 nm e emissão máxima em 594 nm.

Todas as informações sobre o plasmídeo podem ser encontradas no *site* da Addgene (<https://www.addgene.org/162279/>). Além disso, foi utilizada a proteína de fluorescência verde (EGFP) como repórter do protocolo de transfecção transiente (excitação máxima em 488 nm e emissão máxima em 507 nm).

1.2. Transformação bacteriana

Visando uma alta expressão do plasmídeo não mutado, foi realizada a transformação bacteriana utilizando-se as células competentes DH10B. O protocolo seguido foi obtido pelo site da Addgene (Protocol - Bacterial Transformation). Ademais, o plaqueamento para seleção das bactérias transformadas foi feito em meio LB ágar (**Quadro 2**) com adição do antibiótico canamicina (50 µg/mL).

Quadro 2. Componentes do meio LB ágar

Meio LB	
Peptona de caseína	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1% (p/v)
Ágar bacteriológico	1,4% (p/v)

*pH ajustado para 7,2 com NaOH

1.3. Extração de DNA plasmidial

As extrações dos plasmídeos foram realizadas utilizando o PureLink™ Quick Plasmid Miniprep kit da Invitrogen™ para extrações de menor escala (Miniprep) e o PureLink™ Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification Kit da Invitrogen™ para extrações de maior escala (Max prep).

1.4. Ensaio de enzima de restrição

O protocolo usado foi o Anza™ Restriction Enzyme Cloning System da invitrogen™ (**Quadro 3**). A enzima de restrição utilizada foi a HindIII (Anza™ 16 HindIII – 20 U/µL da Invitrogen™).

Quadro 3. Volumes para realização do ensaio de enzima de restrição

Reagentes	Reação
<i>Nuclease-Free Water</i>	Completar para volume final
Anza™ 10X Buffer ou Anza 10X Red Buffer	2 µL
DNA	0,2 – 1 µg
Enzima de restrição (HindIII)	1 µL
Volume final	20 µL

A análise dos tamanhos dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1% agarose (m/v)), utilizando tampão de corrida TBE 1X, tampão de amostra Invitrogen™ Trackit™ Orange LB e marcador – escada de massa molecular de ácidos nucleicos Invitrogen™ Trackit™ 1 KB Plus DNA *Ladder*). O agente intercalante usado foi o brometo de etídeo e a voltagem utilizada foi de 100 V, sendo feita a visualização das bandas por meio do transiluminador Alpha Innotech no comprimento de onda 302 nm.

1.5. Desenho dos *primers*

Foram desenhados *primers* contendo as mutações desejadas para utilização no kit de mutagênese dirigida. Três diferentes pares de *primers* (*forward* e *reverse*) foram desenhados, um para cada mutação requerida (I1596S, V1627M e L1650P). Além disso, foi desenhado um par de *primers* com o intuito de confirmar as mutações realizadas. Os *primers* foram adquiridos na empresa Exxtend (São Paulo) e as características dos *primers* seguiram especificações recomendadas pelo *kit* de mutagênese dirigida (**Quadro 4**).

Quadro 4. Especificações dos primers para uso no kit de mutagênese sitio dirigida e para a confirmação das mutações.

Mutação	Sequência 5' → 3'	Tamanho	Tm – Agilent (°C)	%GC
I1596S F	5' GAATGACCACCACAAAATCAAAACTATTCCATCCAATAGTGAAATAGT 3'	48	78,17	33,33
I1596S R	5' ACTATTTCACTATTGGATGGAATAGTTTTGATTTTGTGGTGGTCATTC 3'	48	78,17	33,33
V1627M	5' CAAGACGGATCATTTCGGAACAGGGTAGGGGAC 3'	32	80,34	56,25
V1627M	5' GTCCCCTACCCTGTTCCGATGATCCGTCTTG 3'	32	80,34	56,25
L1650P	5' CATCATCAAAGCAAAAGGCAGCGTGCGGATCCC 3'	33	80,38	57,57
L1650P	5' GGGATCCGCACGCTGCCCTTTGCTTTGATGATG 3'	33	80,38	57,57
Primer geral para sequenciamento	5' ACTGGAGAATGTGTGCTGAAAC 3'	22	59,12	45,45
Primer geral para sequenciamento	5' GAAGGAGGCCGATGTTAAACAA 3'	22	58,92	45,45

1.6. Mutagênese sítio dirigida

O kit de mutagênese sítio dirigida utilizado foi o QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit da Agilent. Esse kit é usado para fazer mutações pontuais, para substituir, excluir ou inserir aminoácidos adjacentes simples ou múltiplos.

Basicamente, o procedimento se dá a partir de uma fita dupla de DNA contendo o local de interesse, os primers contendo a mutação desejada e a polimerase de DNA de alta fidelidade PfuUltra. As três etapas são: síntese da fita mutada, digestão da fita modelo com a enzima de restrição Dpn I e a transformação bacteriana. Meio NZ amina, X-gal e IPTG foram utilizados conforme recomendações do kit para realização da metodologia.

2. Extração da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*

A peçonha foi obtida por meio de colaboração com o professor Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A peçonha total foi quantificada utilizando o NanoVue no protocolo *Protein UV* com leitura nos comprimentos de onda 280 nm e 260 nm para o cálculo da concentração proteica total (SIMONIAN, 2004).

Para a utilização na cromatografia, foram feitas alíquotas contendo 1 mg de peçonha bruta em *ependorfs* estéreis de 1,5 mL, sendo elas secadas no speedVac e armazenadas a uma temperatura de -20°C.

3. Purificação do peptídeo Tst2

3.1. Soluções para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Solução A: Água Milli-Q e ácido Trifluoroacético (TFA) 0,12% (v/v)

Solução B: Acetonitrila (ACN) e TFA 0,10% (v/v)

3.2. Cromatografia (HPLC)

Para o fracionamento da peçonha bruta, foi utilizado o primeiro método cromatográfico (**Quadro 5**). A peçonha foi ressuspendida em 200 µL de solução A, centrifugada por 3,5 minutos a 16.000 g e o sobrenadante utilizado no fracionamento.

Quadro 5. Método cromatográfico peçonha bruta

Tempo (minutos)	Porcentagem de solução B (%)
0	0
60	60
65	100
70	100
75	0

Para esse primeiro método foi utilizada a coluna de fase reversa analítica C18 (Phenomenex Synergi 4 μ Fusion-RP 80Å, dimensão: 250x4,6mm) equilibrada com o solvente A, com um fluxo de 1 mL/min e absorvância monitorada a 216 nm.

No segundo método cromatográfico, o gradiente foi alterado conforme descrito no **Quadro 6**, mantendo a coluna cromatográfica, o fluxo e a absorvância usados no primeiro método.

Quadro 6. Segundo método cromatográfico

Tempo (minutos)	Porcentagem de solução B (%)
0	0
5	20
10	20
20	25
80	40
85	100
90	100
95	0

Para o terceiro método cromatográfico, foi utilizada uma coluna de fase reversa analítica C18 (Phenomenex Kinetex 5 μ EVO 100Å, dimensão: 250x4,6mm), com um fluxo de 1 mL/min e absorvância monitorada a 216 nm. O gradiente foi realizado conforme **Quadro 7**.

Tempo (minutos)	Porcentagem de solução B (%)
0	0
5	10
10	10
75	35
80	100
85	0

Todos as amostras foram coletadas manualmente em tubos de polietileno de 1,5 mL, secas a vácuo pelo speedVac e mantidas a -80°C até seu uso.

3.3. Espectrometria de massa

Para avaliar o grau de pureza e as massas moleculares contidas na amostra, em cada etapa da cromatografia foram realizadas análises por espectrometria de massa do tipo MALDI Autoflex Speed TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). Foi utilizada a matriz ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA) tanto para o modo linear quanto para o modo refletivo. A amostra foi dissolvida em água deionizada (Milli-Q) e aplicada em uma placa do tipo MTP 384 *ground steel* (2µL da amostra + 2µL de suas respectivas matrizes). Os *softwares* usados foram o FlexControl versão 3.4 e o FlexAnalysis versão 3.4 Build 76 (Bruker Daltonics). Após obtenção do peptídeo purificado. O sequenciamento parcial da toxina está sendo realizado em colaboração com o laboratório do professor Lourival Possani do Instituto de Biotecnologia da UNAM, Mèxico, pela metodologia de degradação de Edman.

Para a quantificação final da toxina purificada foi utilizado o FlexStation 3 – Molecular Devices por meio da metodologia de quantificação BCA – Pierce (BCA protein Assay Kit - ThermoFischer). O peptídeo foi diluído em água deionizada (Milli-Q) e misturado com na razão 1:1 com os reagentes do *kit*. Em seguida, foi realizada uma incubação por 30 minutos a 60°C. Ao final da reação, o produto foi lido na absorvância de 562 nm e quantificado por albumina bovina (curva padrão calibrada).

4. Busca por similaridade

Foi realizada a busca por sequências similares à Tst2 pelo banco de dados BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Com a identificação desses peptídeos, foi

realizada uma busca no banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) para a obtenção dessas sequências em formato FASTA. Por fim, foi feito o alinhamento usando o programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) com o intuito de observar as regiões conservadas e a porcentagem de identidade entre os peptídeos similares e a Tst2.

5. Patch-clamp

5.1. Cultura de células

O laboratório de Eletrofisiologia possui um banco de células para ensaios fisiológicos. Para o projeto foi utilizado a linhagem 293 *Human Embryonic Kidney* (HEK 293) que expressa separadamente os canais Nav1.1 a Nav1.6 e a linhagem *Chinese Hamster Ovary* (CHO) que expressa Nav1.7. Além disso, o laboratório possui células 293T *Human Embryonic Kidney* (HEK 293T), para a realização das transfecções, separadamente, dos plasmídeos (plasmídeo sem mutação e plasmídeos com suas respectivas mutações). As células HEK 293T derivam das células HEK 293, mas com uma alta capacidade de realizar transfecção (LIN et al., 2014).

Todas as culturas celulares foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura (Item 5.2, 5.3, 5.4) e incubadas a temperatura constante de 37°C e atmosfera umedecida com 5% de CO₂.

5.2. Meio de cultura (Células HEK 293)

Meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High glucose* - DMEM (Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de aminoácidos não essenciais (MEM), 4,5% de Glicose e antibiótico G418 (0,4mg/mL, Sigma).

5.3. Meio de cultura (Células CHO)

Meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 4,5% de Glicose e antibiótico G418 (0,4mg/mL, Sigma).

5.4. Meio de cultura (Células HEK 293T)

Meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 4,5% de Glicose e 1% de estreptomicina e penicilina.

5.5. Transfecção de plasmídeo não integrativo

As células HEK 293T foram cultivadas em placa de 24 poços variando sua confluência entre 50 e 100%. A transfecção foi feita usando Lipofectamina 3000® (ThermoFischer scientific) e meio Opti-MEM® (Gibco). Foram utilizados 2 µg de DNA plasmidial (pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet) e 1 µg de plasmídeo codificante de GFP em cada transfecção realizada.

As células foram mantidas a temperatura constante de 37° C e atmosfera umedecida com 5% de CO₂, sendo o cultivo feito no primeiro dia e a transfecção 24 h depois.

5.6. Soluções para registro no *Patch clamp*

5.6.1. Solução externa (banho extracelular)

Quadro 8. Componentes da solução externa (*Patch clamp*).

	nM
NaCl	130
KCl	5
CaCl ₂ .H ₂ O	2
MgCl ₂ .6H ₂ O	2
HEPES	10
Glicose	10

*pH ajustado com NaOH (7,4)

5.6.2. Solução interna (pipeta)

Quadro 9. Componentes da solução interna (*Patch clamp*).

	nM
CsF	105
CsCl	27
NaCl	5
MgCl ₂	2
EGTA	10

*pH ajustado com CsOH

5.7. Ensaios eletrofisiológicos

Os registros foram obtidos pelo amplificador EPC 10 HEKA e comandado pelo *software* PatchMaster. As células HEK293T contendo os plasmídeos para os canais Nav1.2 mutados e não mutados foram transferidas para placas de petri 60 x 15 mm e banhadas de solução externa (Item 5.6.1) por perfusão (0,5 ml/min), sendo utilizado a fluorescência com emissão em LP 590nm e excitação em BP 546nm (Filter set 15 – ZEISS) para o EGFP visando avaliar a eficiência da transfecção, e emissão em LP 515nm e excitação em BP 450-490nm (Filter set 09 – ZEISS) para o mScarlet visando a identificação das células que expressam os canais Nav1.2. Ademais, as células HEK293 contendo os canais Nav1.1-Nav1.6 e as células CHO contendo os canais Nav1.7 foram transferidas para a cubeta de experimentação e banhadas em solução externa (Item 5.6.1).

Os registros foram feitos no modo *Whole-cell* (HEKA Patch clamp EPC 10) em temperatura ambiente. As pipetas de borosilicato, confeccionadas no *Puller* horizontal (Sutter Instruments, USA) e apresentando uma resistência entre 1,5 e 2,5 MOhms, foram preenchidas com solução interna (Item 5.6.2).

As macrocorrentes (somatória de correntes de sódio da célula) foram mensuradas. O protocolo para avaliação da probabilidade de abertura do canal durante a ativação, inativação e inibição de corrente tem seu início em um potencial de repouso de -100 mV, sendo estimulada por uma sequência de despolarizações (-100 mV até 65 mV) em um período de 50 ms, tendo ao final um estímulo, imediatamente após a sequência de despolarizações, de um pulso de -10 mV visando avaliar a inativação lenta do canal (SSI) (**Figura 8**). Protocolo utilizando um pré pulso (0 mV por 10 ms) também foi realizado (**Figura 9**). Por fim, as correntes capacitivas foram compensadas em um protocolo p/4 e a resistência em série compensada em pelo menos 70%.

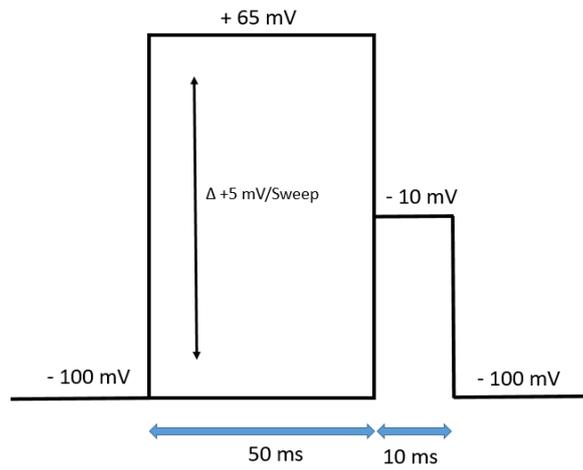


Figura 8. Protocolo de estimulação de voltagem sem pré-pulso

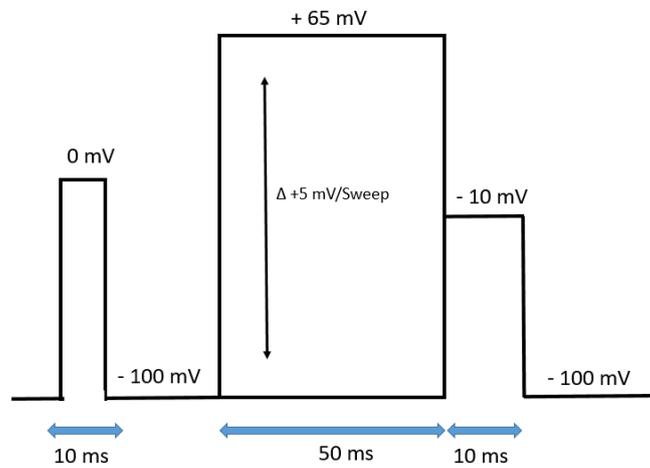


Figura 9. Protocolo de estimulação de voltagem com pré-pulso

Para a avaliação da recuperação da inativação lenta (*Recovery from inactivation*), foram realizados ciclos com um pulso de 0 mV por 10 ms e outro pulso de 0 mV por 20 ms, sendo que a cada ciclo 1 ms foi adicionado entre os dois pulsos, tendo um intervalo total de 80 ms (**Figura 10**).

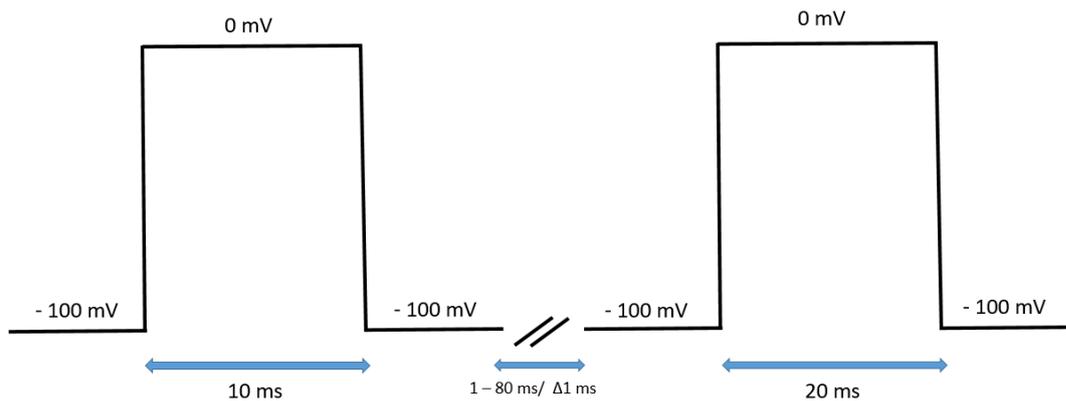


Figura 10. Protocolo de avaliação da recuperação da inativação lenta (Recovery from inactivation).

Os protocolos foram desenvolvidos para avaliar os parâmetros de probabilidade de abertura na ativação, disponibilidade dos canais no protocolo de inativação, recuperação da inativação rápida e relação corrente/voltagem tanto para os canais Nav1.2 com e sem variante patogênicas, quanto para os canais Nav1.1-Nav1.7 na presença e ausência da Tst2.

Para realizar a comparação entre o canal Nav1.2 com e sem as variantes e entre os subtipos de canais Nav1.1-Nav1.7 com e sem ação da toxina, foi analisado o $V_{1/2}$ na ativação e inativação e o tau (T) na recuperação da inativação. Para a probabilidade de abertura dos canais na ativação, o $V_{1/2}$ significa que naquela voltagem metade dos canais estão abertos e metade dos canais ainda estão fechados. Para a inativação o $V_{1/2}$ significa a voltagem onde metade dos canais se inativaram e metade dos canais estão abertos. Por fim, para a recuperação, o tau significa o tempo que o canal demora para sair do estado inativado e retornar para o estado fechado (estar apto para uma nova abertura). Vale ressaltar que a avaliação é realizada no modo *whole-cell* e, portanto, analisa a condutância ao sódio de todos os canais que estão expressos na célula em estudo.

Relacionando com a cinética do canal, os protocolos foram desenhados para simular o processo de fechamento, abertura e inativação (**Figura 8**) e a volta do estado inativado para o estado fechado dos canais (**Figura 10**). Para o protocolo da **figura 8**, o processo se inicia a -100 mV que é uma voltagem onde todos os canais de sódio dependentes de voltagem estão fechados (segmentos S4 de todos os domínios estão na porção intracelular). Em seguida o protocolo sai de -100 mV e vai gradualmente

aumentando (de 5 em 5 mV) até 65 mV visando avaliar a ativação (abertura) dos canais (segmentos S4 dos domínios DI-DIII estão completamente na porção extracelular, mas o segmento S4 do DIV ainda não). Visando o estudo da inativação, o protocolo possui um estímulo de -10 mV durante 10 ms. Na voltagem em questão, os canais estão abertos e em seguida iniciam o processo de inativação, quando o estímulo volta para -100 mV faz com que os canais retornem para o estado fechado.

Para o protocolo da **figura 10**, o processo se inicia em -100 mV com todos os canais no estado fechado (segmentos S4 de todos os domínios estão na porção intracelular), em seguida o protocolo eleva a voltagem para 0 mV e por fim retorna a voltagem para -100 mV. Dito isso, o canal se inativa e posteriormente retorna ao estado fechado. Para finalizar o protocolo, um estímulo igual ao descrito é novamente realizado. O tempo entre esses dois estímulos é gradualmente aumentado e o T é obtido.

O protocolo com pré-pulso (**Figura 9**) faz com que os segmentos S4 de todos os domínios fiquem voltados para a porção extracelular e visa avaliar se uma maior exposição de segmentos S4 modifica a interação da toxina com o canal. Se isso acontecer, quando os segmentos S4 forem retornar à porção intracelular, a toxina pode aprisioná-los em um estado pré-ativo e conseqüentemente tornar o canal ativo em voltagens mais negativas do que o esperado.

Para a obtenção do $V_{1/2}$ na probabilidade de abertura na ativação, os dados de corrente por voltagem conseguidos foram convertidos em condutância por voltagem (fórmula I):

$$g_{Na} = \left(\frac{INa}{(V - V_{Na})} \right) \quad (I)$$

Onde V significa a voltagem que deflagrou o pico de corrente (I) e V_{Na} o potencial de reversão de sódio. Para a obtenção do $V_{1/2}$ na inativação foi usado os dados de corrente por voltagem, sendo essa corrente normalizada. Para a ativação (fórmula II) e para a inativação (fórmula III) foi realizado posteriormente um ajuste por uma função de Boltzmann:

$$g = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/kh\}}} \quad (II)$$

$$i = \frac{1}{1 + e^{\{(V-V_{1/2})/kh\}}} \quad (III)$$

Onde g significa condutância, i significa corrente, V significa voltagem, V1/2 significa a voltagem onde metades dos canais se encontram abertos e K significa o valor de inclinação da reta (sensibilidade do canal). Para a análise de inibição de corrente foi avaliado o Fu (fração não inibida), sendo ela obtida utilizando os valores de corrente bruta adquiridos. Para o resultado foi realizado a divisão entre o pico de corrente após aplicação da toxina pelo pico de corrente do controle (fórmula IV):

$$\text{Fração não inibida (Fu)} = \left(\frac{I/I_{\max\text{Toxina}}}{I/I_{\max\text{Controle}}} \right) \quad (IV)$$

Para a obtenção do T na recuperação da inativação, os valores de corrente obtidos foram ajustados pela função exponencial (fórmula V):

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

Onde y0 e y1 significam a amplitude inicial e final de cada ponto da curva, respectivamente. O t é o tempo (cada ponto de inativação) e T é a constante de tempo. Por fim, para avaliar a inativação rápida, foi feito a sobreposição dos traços brutos do controle e após a aplicação da toxina, sendo verificado se os traços possuíam diferenças na sua curvatura.

O teste t pareado *two-tailed* foi utilizado para avaliar se existia diferença estatística significativa entre canal sem variante e canais contendo variante patogênica, além da diferença entre controle e após aplicação da toxina nos canais Nav1.1 – Nav1.7.

V. RESULTADOS

1. Plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet

1.1. Confirmação da integridade do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet

O plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet foi extraído da bactéria e sua integridade foi avaliada por meio de ensaio de enzima de restrição. O plasmídeo sem fragmentação possui 12.150 pares de base (pb) e, após o tratamento com a enzima de restrição Hind III, esperava-se a identificação de 3 fragmentos na eletroforese em gel de agarose (6.497 pb, 3.282 pb e 2.362 pb).

Os resultados obtidos na eletroforese confirmaram o tamanho esperado para o plasmídeo não fragmentado e os tamanhos esperados do plasmídeo com as fragmentações após o tratamento (**Figura 11**).

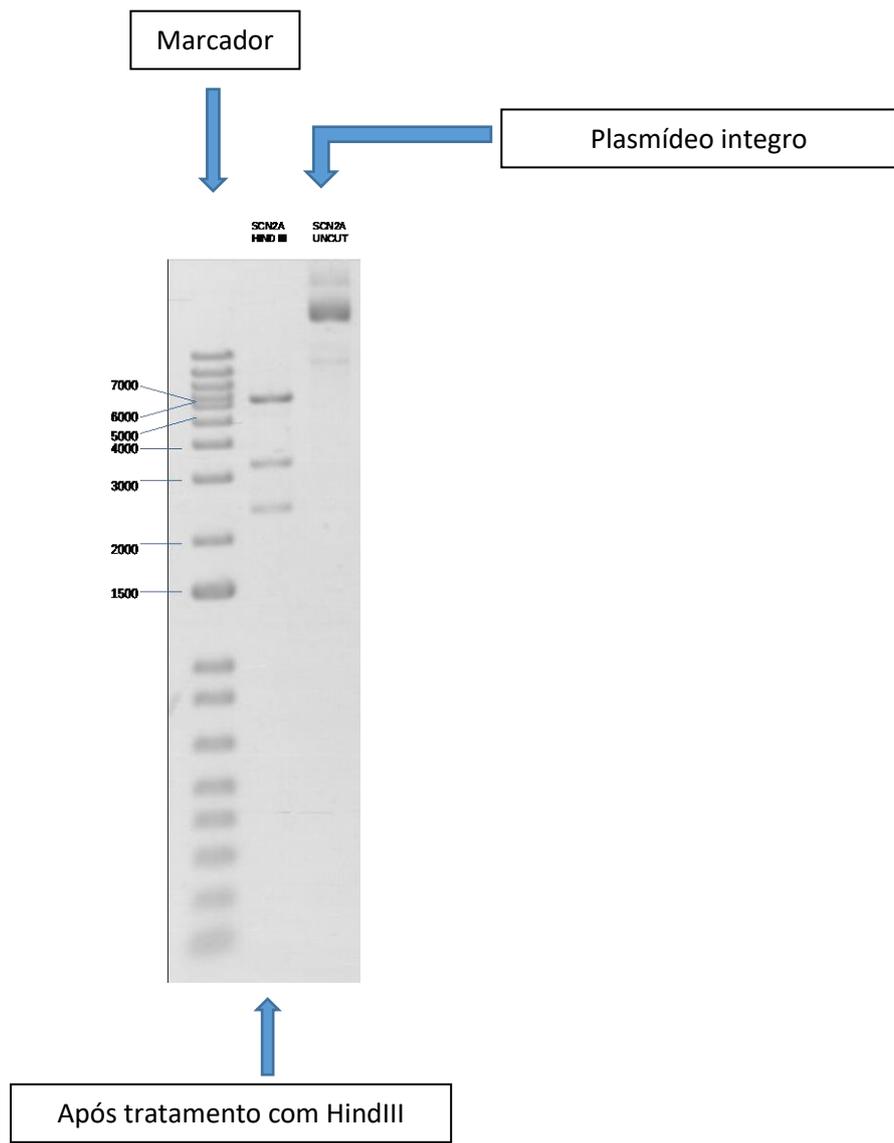


Figura 11. Fragmentos na eletroforese em gel de agarose. Primeira coluna: marcador-escada Invitrogen™ Trackit™ 1 KB Plus DNA Ladder; Segunda coluna: plasmídeo após tratamento com enzima de restrição HindIII; Terceira coluna: plasmídeo inteiro.

Pode-se confirmar que o plasmídeo extraído estava apto para a realização das próximas etapas (transfecções, mutagênese sítio dirigida e ensaios eletrofisiológicos).

1.2. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet

Inicialmente foi realizada a avaliação eletrofisiológica das células HEK 293T sem a realização de transfecção de plasmídeo. Essa análise teve como intuito verificar as macrocorrentes endógenas da célula HEK293T para descartar falsos positivos após a transfecção do plasmídeo mutado ou não mutado.

A verificação foi realizada por meio do traço bruto de corrente, sendo comparada às macrocorrentes da célula HEK293T sem transfecção e com transfecção do plasmídeo. Como resultado pode-se observar que as células não transfectadas possuem valor médio de macrocorrente de -140 pA e as células transfectadas com plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet possuem valor médio de -1,89 nA (**Figura 12**).

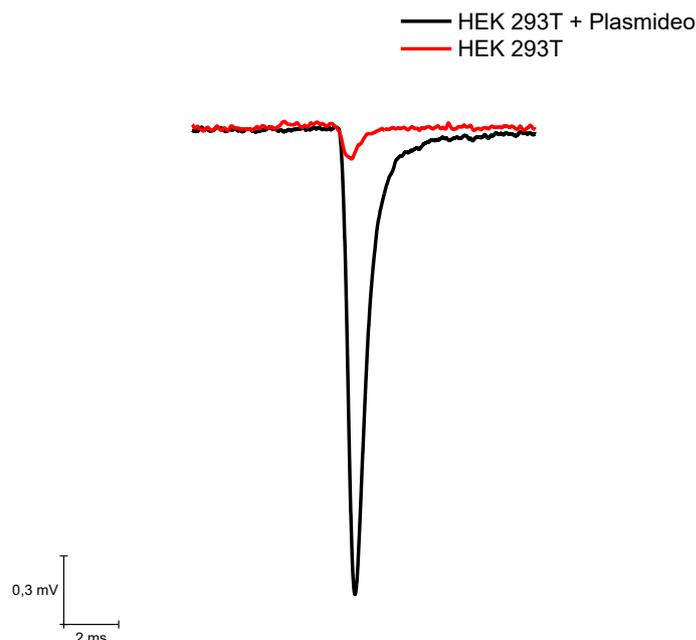


Figura 12. Traço bruto de corrente de células HEK293T sem transfecção (Vermelho) e após transfecção do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet (Preto).

Foi realizada a transfecção transiente do plasmídeo não mutado em células HEK 293T, e por fluorescência pode-se confirmar que o EGFP (controle positivo) e o pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet foram transfectados com sucesso. Para os ensaios eletrofisiológicos das células HEK293T expressando os canais Nav1.2 - pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet foram avaliados os parâmetros: probabilidade de abertura dos canais na fase de ativação, disponibilidade dos canais na fase de inativação, a recuperação lenta dos canais e a macrocorrente.

Os resultados demonstram que o canal Nav1.2 expresso a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet possui $V_{1/2}$ na ativação de $-21,47 \pm 0,71$ mV, $V_{1/2}$ na inativação de $-62,45 \pm 1,82$ mV, T na recuperação lenta de $3,06 \pm 0,30$ ms e macrocorrente média de $-1,89$ nA (**Figura 13**).

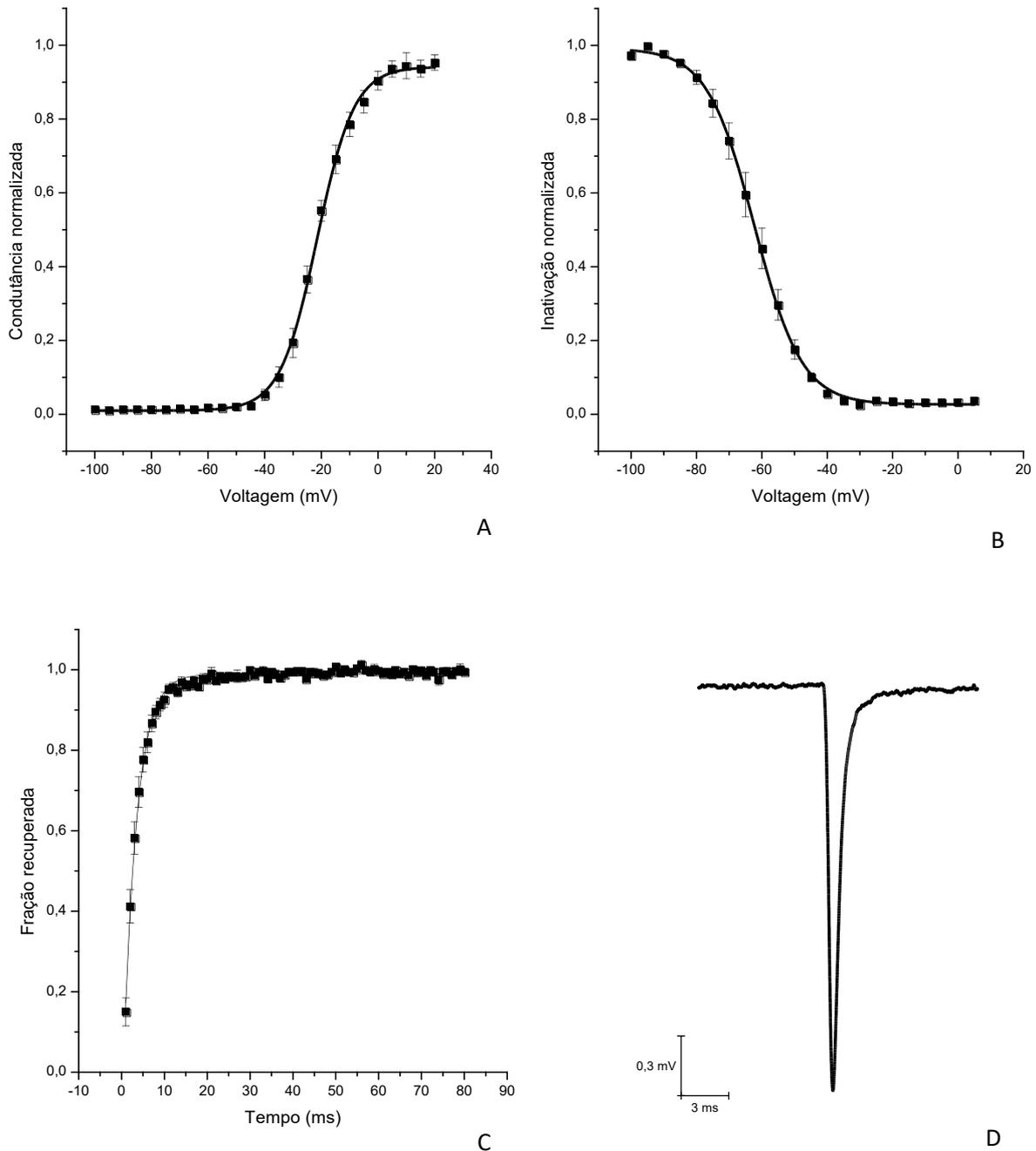


Figura 13. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet. (A) Probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na ativação. (B) Disponibilidade de canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na inativação. (C) Recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet. (D) Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet.

2. Variantes patogênicas

2.1. Confirmação da integridade dos plasmídeos pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet após a realização das mutagêneses sítio dirigidas das variantes patogênicas

Para a realização do protocolo de mutagênese, *primers* contendo as mutações foram desenhados (**Quadro 4**). Dito isso, após a mutagênese sítio dirigida essas variantes patogênicas associadas à epilepsia foram confirmadas para posterior caracterização eletrofisiológica.

Após o tratamento com a enzima de restrição HindIII esperava-se que os plasmídeos pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet mutados (I1596S, V1627M e L1650P) apresentassem 3 fragmentos na eletroforese em gel de agarose (6.506 pb, 3.282 pb e 2.362 pb). Pode-se confirmar a obtenção das três bandas tanto para a variante I1596S quanto para a variante V1627M com os tamanhos esperados, mas para a variante L1650P obteve-se as três bandas, porém com uma delas com tamanho acima de 3.000 pb, diferente da esperada que seria de 2.362 pb (**Figura 14**).

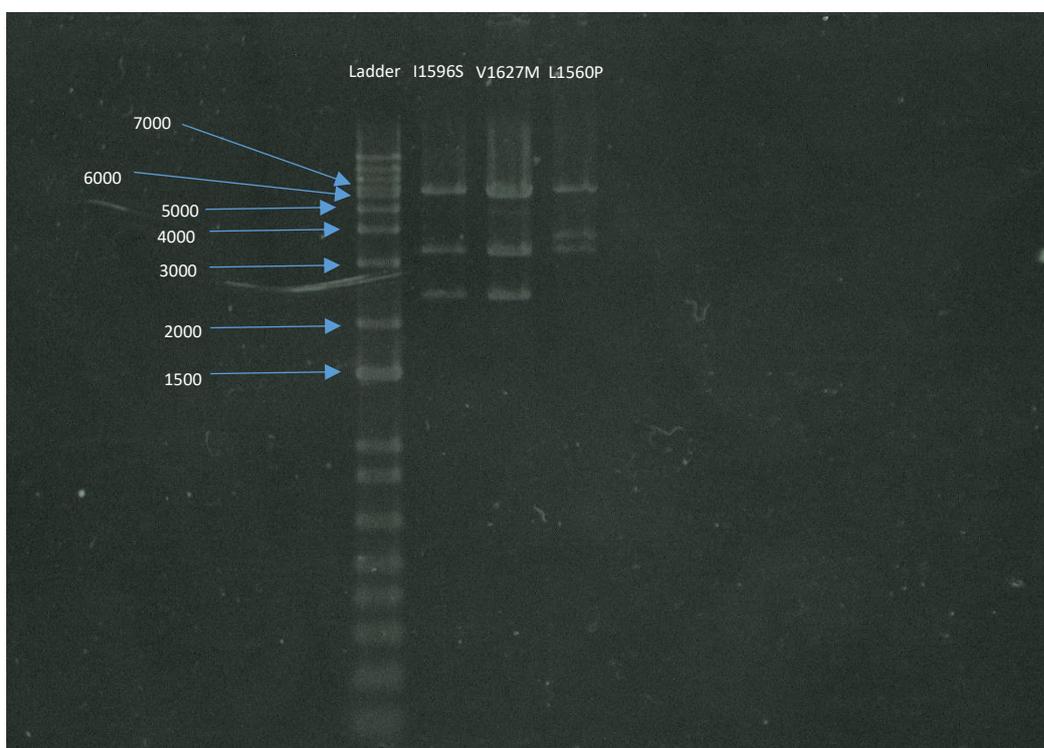


Figura 14. Fragmentos na eletroforese em gel de agarose. Primeira coluna: marcador-escada Invitrogen™ Trackit™ 1 KB Plus DNA Ladder; Segunda coluna: plasmídeo com a variante I1596S após tratamento com enzima de restrição HindIII; Terceira coluna: plasmídeo com a variante V1627M após tratamento com enzima de restrição HindIII; Quarta coluna: plasmídeo com a variante L1650P após tratamento com enzima de restrição HindIII.

Dito isso, as variantes I1596S e V1627M prosseguiram para a confirmação por sequenciamento e a caracterização eletrofisiológica de suas cinéticas. Contudo, para a variante L1650P será necessário a realização da mutagênese sítio dirigida novamente.

O sequenciamento das regiões contendo as variantes para confirmação da obtenção das mutações foi realizado pela empresa Exxtend/Omikka (local). Os resultados confirmam as mutagêneses sitio dirigidas para ambas as variantes (**Figura 15 e 16**). Para a confirmação da variante I1596S foi utilizado o primer de confirmação *reverse* e para a confirmação da variante V1627M foi utilizado o primer *forward*.

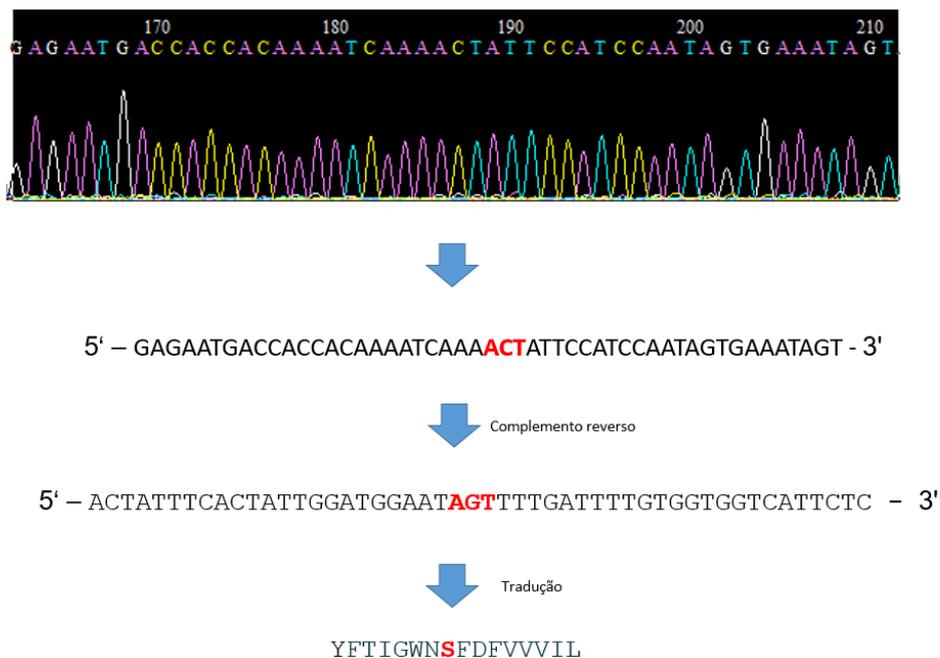
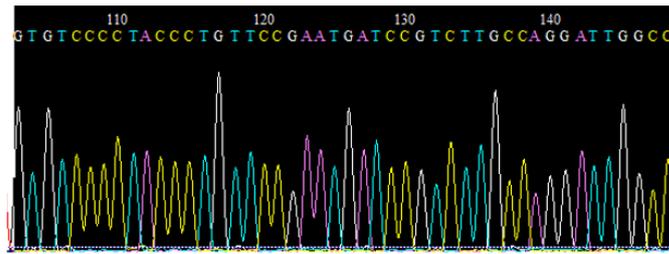


Figura 15. Confirmação por sequenciamento da variante I1596S.



5'-GTGTCCCCTACCCTGTTCCGA**ATG**ATCCGTCTTGCCAGGATTGGCC-3'



Tradução

VSPTLFR**M**IRLARIG

Figura 16. Confirmação por sequenciamento da variante V1627M.

2.2. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S

Após a caracterização da cinética do canal expresso a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S obteve-se o $V_{1/2}$ na ativação de $-24,84 \pm 0,51$ mV, o $V_{1/2}$ na inativação de $-56,66 \pm 0,90$ mV, o T na recuperação lenta de $1,92 \pm 0,53$ ms e a macrocorrente média de $-2,83$ nA (**Figura 17**). Foi observada diferença significativa entre o canal com a variante patogênica e o canal normal ($P < 0,05$) para os parâmetros de probabilidade de abertura na ativação e na inativação. Contudo, não foi observada diferença estatística para a recuperação lenta do canal. A variante demonstrou alterar a cinética do canal em relação ao controle, alterando sua probabilidade de abertura para potenciais mais negativos (abertura mais precoce) e a probabilidade de abertura na inativação para potenciais menos negativos.

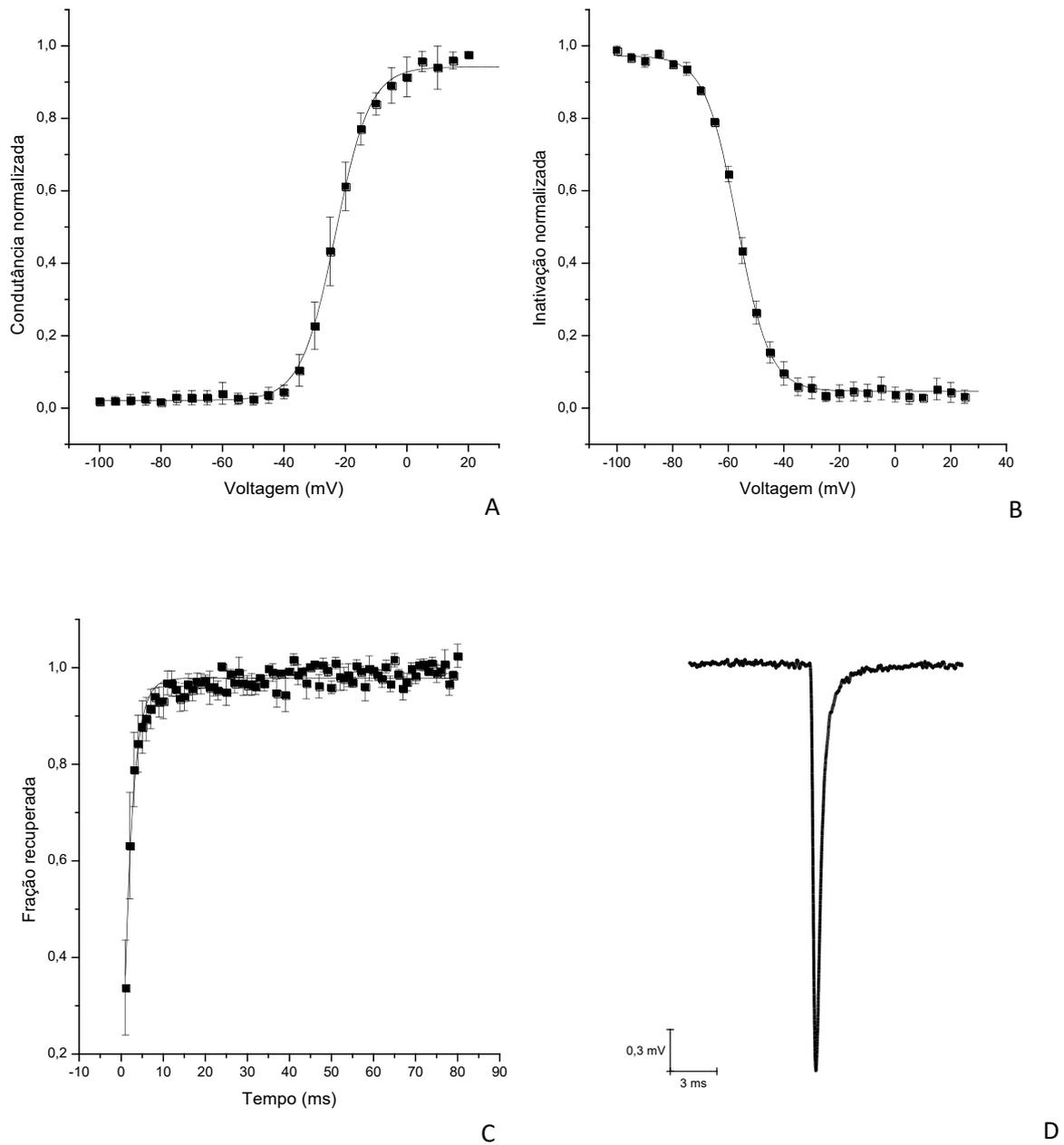


Figura 17. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S. (A) Probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na ativação com a variante I1596S. (B) Disponibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na inativação com a variante I1596S. (C) Recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S. (D) Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante I1596S.

2.3. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M

Após a caracterização da cinética do canal expresso a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M obteve-se o $V_{1/2}$ na ativação de $-25,16 \pm 1,39$ mV, o $V_{1/2}$ na inativação de $-64,32 \pm 1,62$ mV e o T na recuperação lenta de $1,83 \pm 0,24$ ms. Ademais, a macrocorrente média foi de $-0,86$ nA (**Figura 18**). Foi observada uma diferença significativa ($P < 0,05$) no parâmetro de recuperação lenta do canal entre o plasmídeo com e sem a variante. Entretanto, não foi observada uma diferença estatística nos parâmetros de probabilidade de abertura na ativação e inativação. Dito isso, o canal com essa variante demonstrou ter uma recuperação mais acelerada comparando-se a recuperação do canal sem mutação (controle).

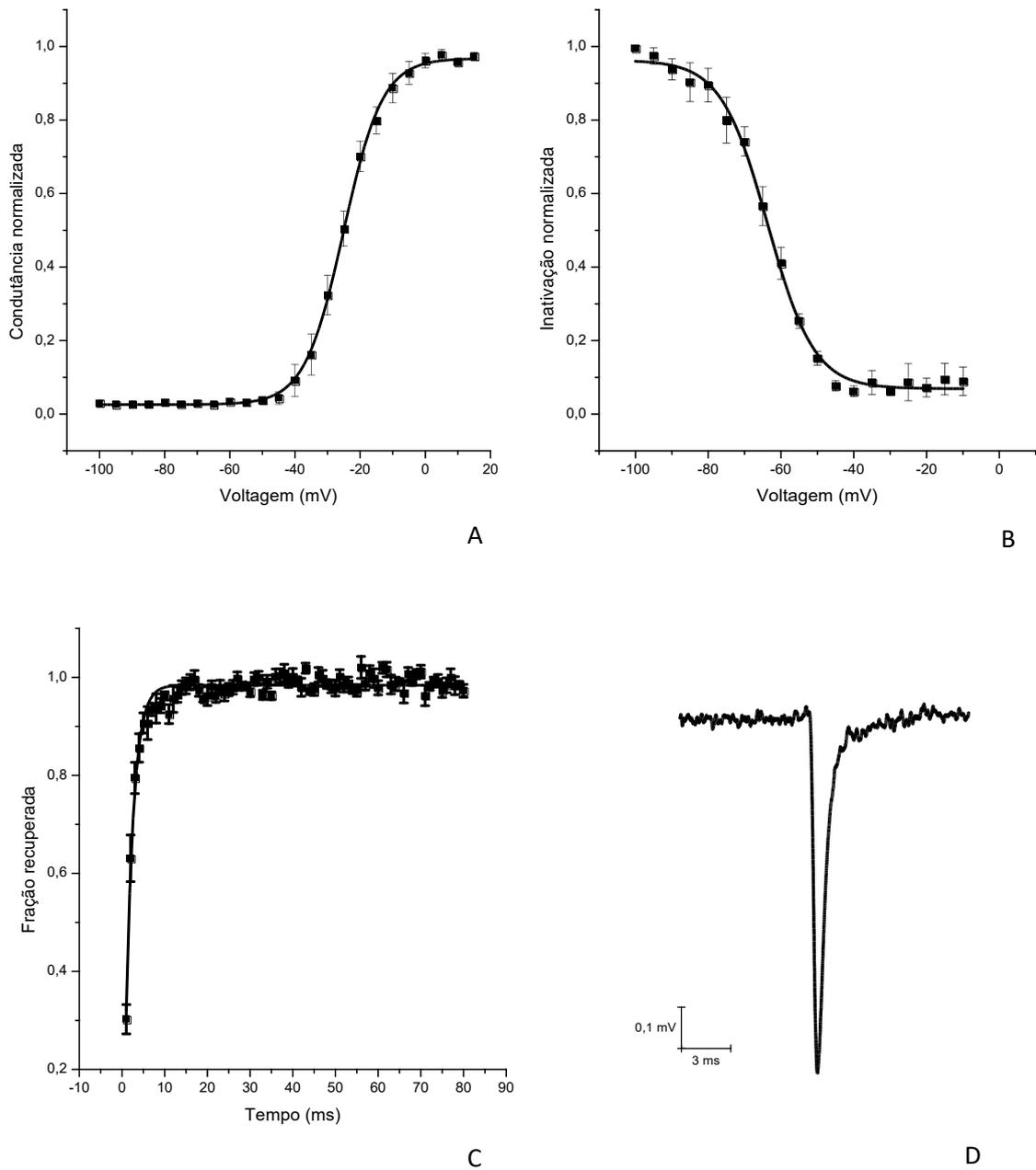


Figura 18. Caracterização eletrofisiológica da cinética do canal Nav1.2 expresso pelo plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M. (A) Probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na ativação com a variante V1627M. (B) Disponibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet na inativação com a variante V1627M. (C) Recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M. (D) Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com a variante V1627M.

3. Purificação da toxina Tst2 da peçonha do *Tityus stigmurus*

3.1. Cromatografia (HPLC)

Em estudo prévio, a Tst2 eluiu a 36,24% de acetonitrila (ACN) na etapa de cromatografia em fase reversa da peçonha bruta de *T. stigmurus* e apresenta a massa molecular de 6989,2 Da, determinada por *eletrospray* (BATISTA et al., 2007).

No presente trabalho, foram necessárias três etapas de separação cromatográfica. O fracionamento da peçonha bruta originou, em média, 52 frações cromatográficas (**Figura 19**). Após análise por espectrometria de massa do tipo MALDI TOF das frações coletadas no HPLC, o componente de massa molecular próxima à da esperada para a Tst2 foi encontrado na fração que eluía em 37,8% de ACN.

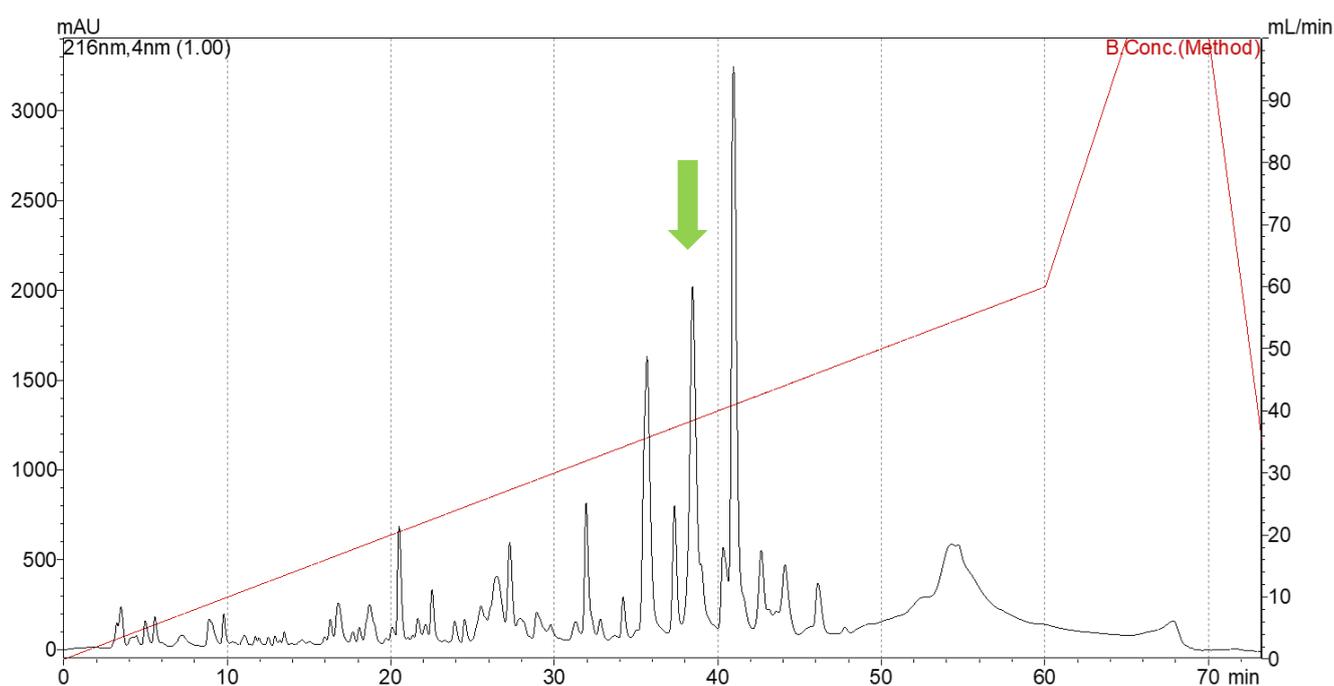


Figura 19. Perfil cromatográfico de 1 mg de peçonha bruta do escorpião *Tityus stigmurus* por HPLC em fase reversa. A fração destacada (seta) possui percentagem de ACN de 37,8%. Fluxo de 1 mL/min e comprimento de absorção de 216nm.

A fração selecionada, conforme indicado na figura 9, foi submetida à segunda etapa cromatográfica e resultou em três frações, das quais, a que eluiu em 25,11% de ACN continha o peptídeo esperado (**Figura 20**).

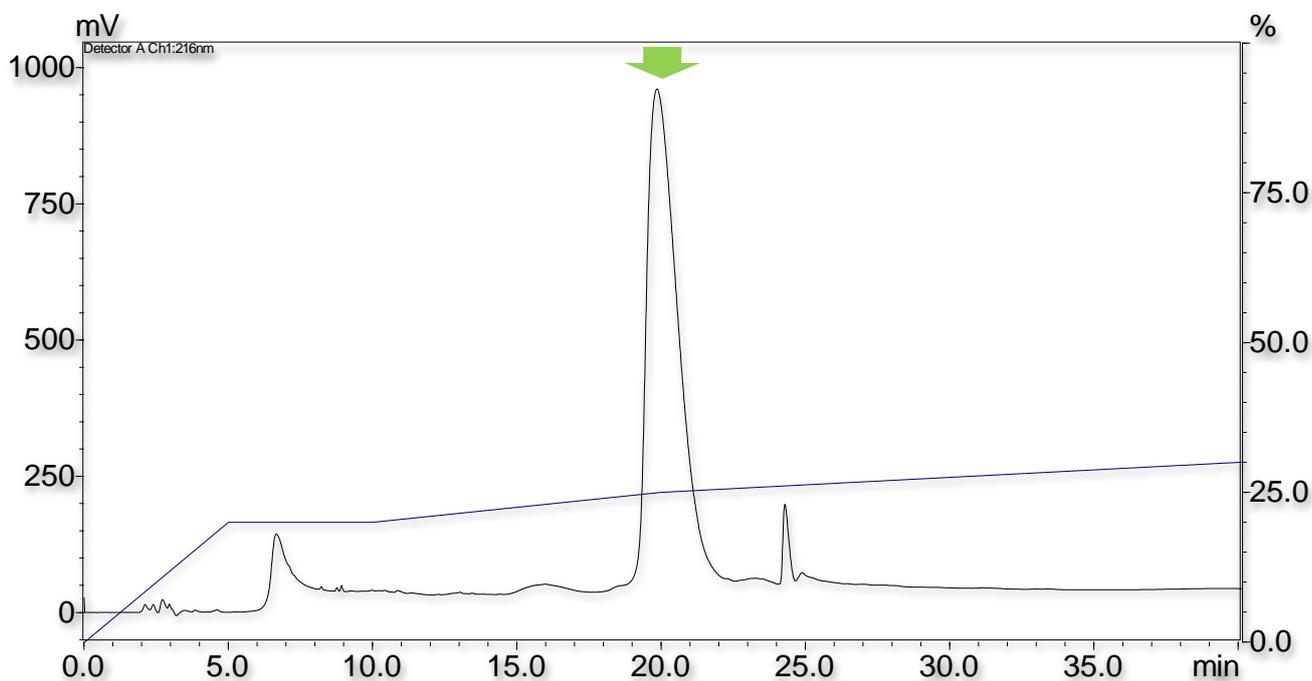


Figura 20. Perfil cromatográfico do segundo método cromatográfico obtido no HPLC em fase reversa. A fração destacada (seta) possui porcentagem de ACN de 25,11%. Fluxo de 1 mL/min e comprimento de absorção de 216nm.

Um terceiro método cromatográfico com a fração selecionada, conforme indicado na **figura 21**, foi realizado com o intuito de se obter a toxina com maior grau de pureza. Foram obtidas diversas frações de pequena absorbância e apenas uma fração abundante com eluição em 26,42% de ACN, contendo nessa fração o componente com a massa molecular próxima à esperada para a Tst2 (**Figura 21**).

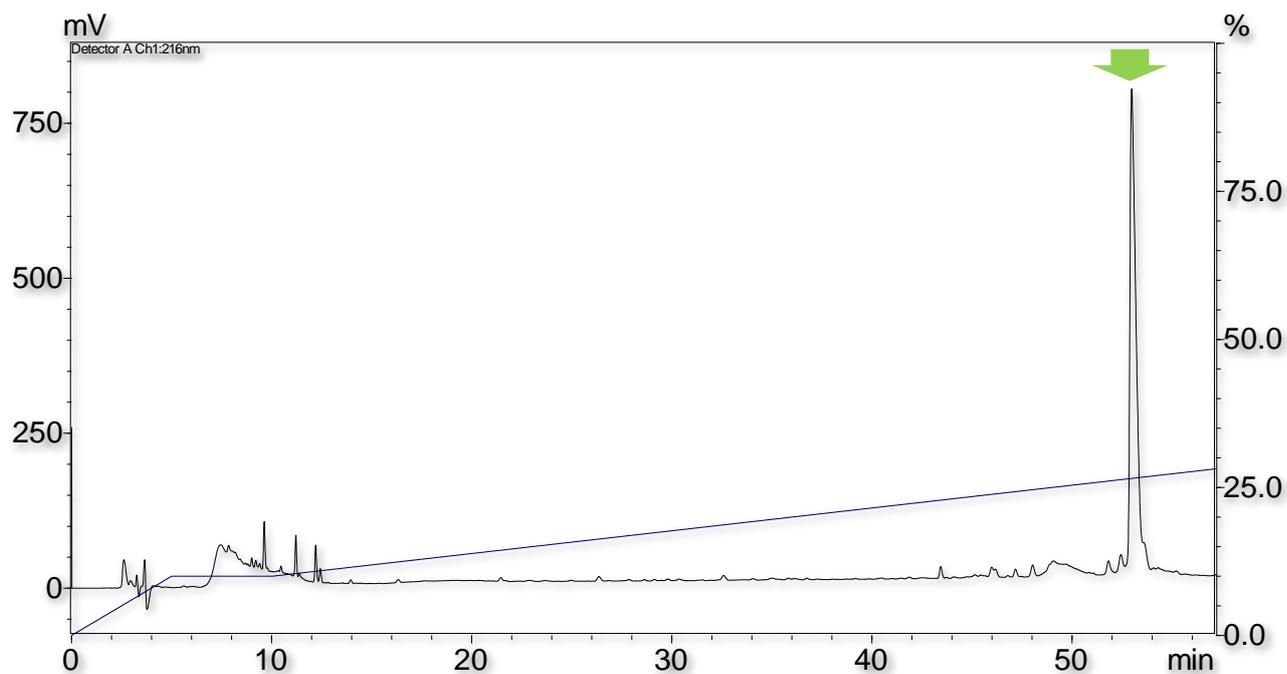


Figura 21. Perfil cromatográfico do terceiro método cromatográfico obtido no HPLC em fase reversa. A fração destacada (seta) possui porcentagem de ACN de 26,42%. Fluxo de 1 mL/min e comprimento de absorção de 216nm.

3.2. Massa Molecular e Sequenciamento parcial

A fração de interesse, coletada utilizando o último método cromatográfico (figura 11), foi analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF obtendo-se, no modo linear, a massa molecular média de $[M+H]^+$ 6988,23 Da, $[M+2H]^{2+}$ de 3492,55 Da e $[M+3H]^{3+}$ de 2327,00 Da (**Figura 22**).

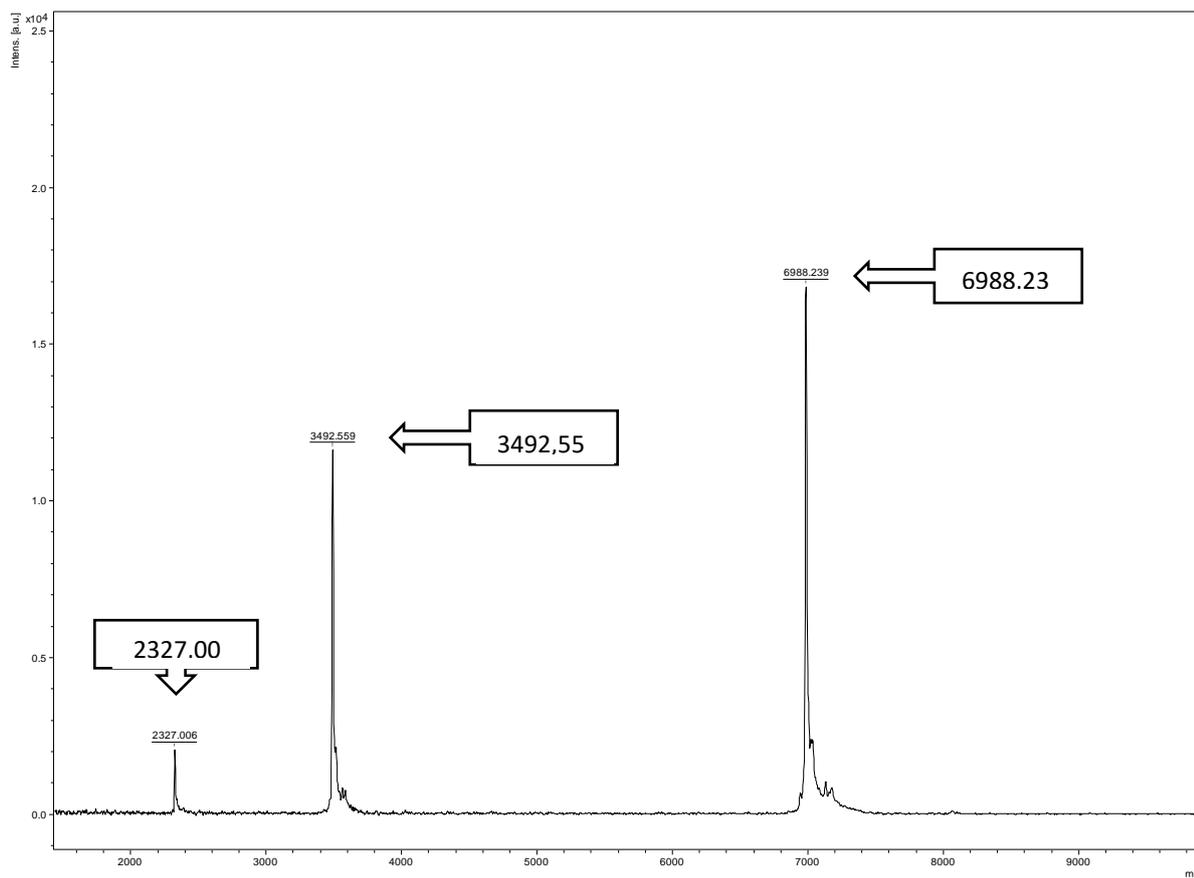


Figura 22. Espectro de massa média do íon molecular da amostra purificada. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidroxicinâmico (HCCA).

Para uma maior precisão da massa, a amostra foi analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF no modo refletivo, sendo determinada a massa molecular monoisotópica $[M+2H]^{2+}$ de 3492,87 Da (**Figura 23**) e por consequência a massa monoisotópica $[M+H]^+$ de 6984,74 Da.

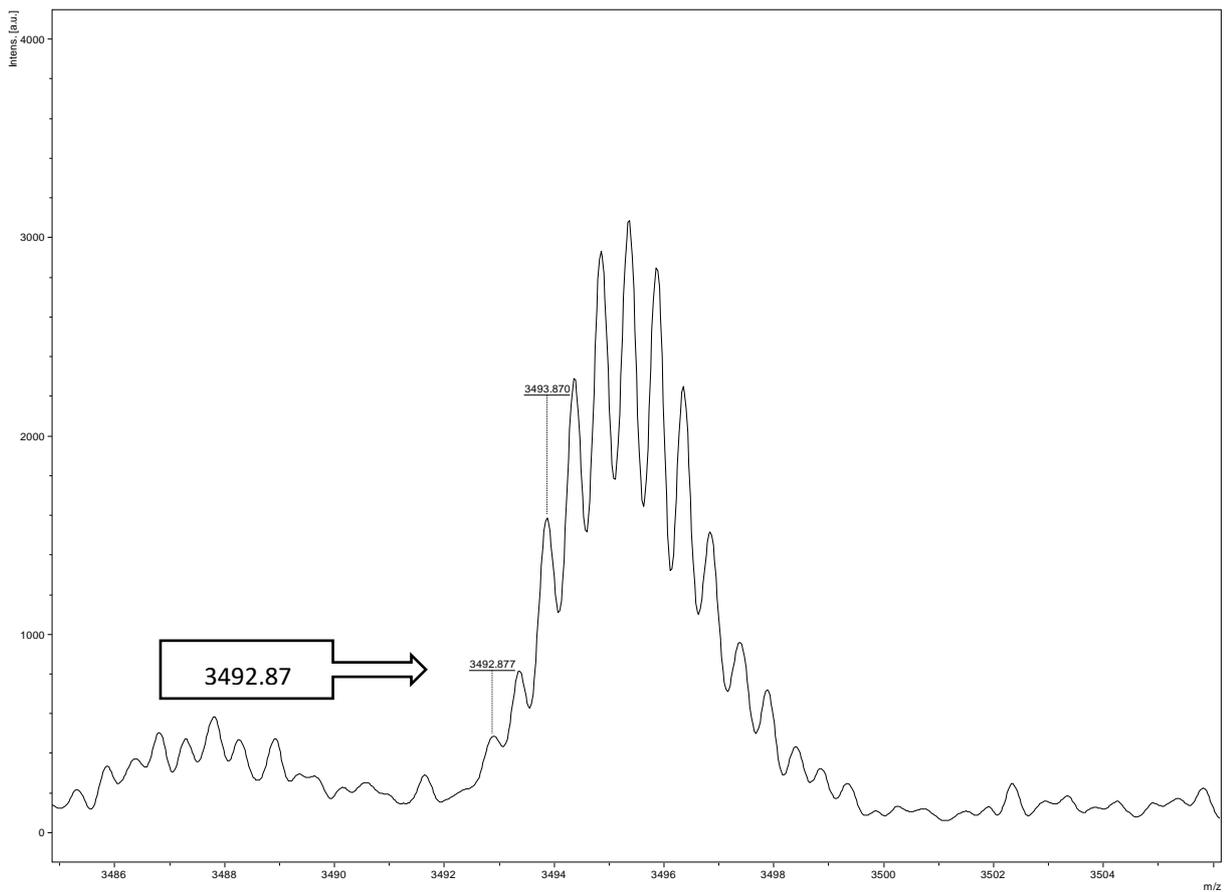


Figura 23. Espectro de massa molecular monoisotópica $[M+2H]^{2+}$ da amostra purificada. Matriz: ácido 4-alfa-ciano hidrocínâmico (HCCA)

Batista e colaboradores (2007) descreve a massa molecular da Tst2 de 6989,2 Da (eletrospray), sendo este valor muito próximo ao da massa molecular média de $[M+H]^+$ 6988,23 Da encontrada. Ademais, após realizar o cálculo da massa monoisotópica teórica da Tst2 pelo *software* Compass IsotopePattern (Bruker Daltonics, Alemanha) foi calculado em $[M+H]^+$ 6984,99 Da. Dito isso, a massa monoisotópica teórica foi similar a massa monoisotópica encontrada, tendo uma diferença de apenas 0,25 Da.

Com isso, pode-se confirmar que a amostra possui massa monoisotópica bem próxima da esperada para o peptídeo Tst2. Contudo, se faz necessária a realização do sequenciamento parcial para uma confirmação mais embasada.

A quantificação do peptídeo foi realizada no FlexStation utilizando-se a metodologia de quantificação BCA-Pierce™ (BCA Protein Assay Kit). Para a realização deste trabalho, foram obtidos 178,64 µg da toxina purificada. Alíquotas de 100 nM foram separadas para realização dos experimentos eletrofisiológicos e o restante foi mantido seco e armazenado a -80° C.

4. Alinhamento Tst2

A partir da sequência da Tst2 obtida por Becerril e colaboradores (1996), foi realizado um alinhamento com outras sequências atualmente descritas e depositadas no banco de dados BLAST. Pode-se inferir que se trata de uma NaScTx por possuir características estruturais similares a outras toxinas de mesma ação.

Comparando sua sequência a de outros peptídeos, pode-se observar uma alta identidade com as toxinas Ts2 e Ts1 de *Tityus serrulatus*, Tf2 e Tf1a de *Tityus fasciulatus*, Tb1, Tb2 e Tb2 II de *Tityus bahiensis*, To12 de *Tityus obscurus* e Tst1 de *Tityus stigmurus* (**Figura 24**). A toxina Tst2 possui uma similaridade tanto com α -toxinas quanto com β -toxinas. Dito isso, projetou-se a possibilidade de uma dupla atividade (α e β). Por exemplo, a Ts2 (100% de identidade com a Tst2) apresenta esse

efeito (α -toxina nos canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 e de β -toxina no canal Nav1.3).

		Aa	% Id	Atividade
sp P56611	-KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGSECKIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	61	75.41	β
sp P0DQH5	-KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGSECKIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWERATNRC	61	72.13	β
sp P56612	GKEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECTLK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	62	73.77	β
sp P15226	-KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIK-KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	61	73.77	α/β
sp H1ZZI1	-KEGYPMDEHGCKFSCFIRPSGFCERYCKTHLSASTGYCAWPACYCYGVPANOKVVDYNNKC	62	82.26	β
sp P68411 Tst2	-KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVVDYATNKC	62	100.00	
sp P68410	-KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVVDYATNKC	62	100.00	α/β
sp C0HJM9	-KEGYAMDHEGCKFSCFIRPSGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVVDYATNKC	62	95.16	β
sp P60276	-KEGYAMDHEGCKFSCFIRPSGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVVDYATNKC	62	95.16	β
sp P56609	-KEGYAMDHEGCKFSCFPRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPSNIKVVDYATNKC	62	95.16	β
	**** *****.* **.* * : ..*.*****.* **.* : *.*			

Figura 24. Alinhamento entre a Tst2 e toxinas com alta porcentagem de identidade. Aa: aminoácidos; Id: identidade e atividade (α -toxina ou β -toxina). P56611: Tb1; P0DQH5: Tf1a; P56612: Tst1; P15226: Ts1; H1ZZI1: To12; P68410: Ts2; C0HJM9: Tf2; P60276: Tb2-II; P56609: Tb2.

5. Caracterização eletrofisiológica da toxina Tst2 nos canais Nav1.1 a Nav1.7

Os experimentos foram realizados na concentração final de 100 nM do peptídeo purificado para todos os subtipos (Nav1.1 – Nav1.7). Foram avaliadas a fração não inibida da corrente (FU) com e sem pré pulso, ativação com e sem pré pulso, inativação, recuperação da inativação lenta (*Recovery from inactivation*) e inativação rápida.

Nas células, a abertura de todos os canais não ocorre de maneira simultânea. Dito isso, para avaliação dos parâmetros de ativação e inativação foi calculado o $V_{1/2}$, voltagem em que metade dos canais se encontram abertos e a outra metade fechados em um determinado tempo (GOLDSCHEN-OHM et al., 2013).

5.1. Fração não inibida da corrente e I/V

A avaliação da fração não inibida de corrente (Fu) foi analisada na fase de ativação para todos os subtipos (Nav1.1-Nav1.7). Na presença do peptídeo, os subtipos Nav1.1 e Nav1.3 foram os mais afetados para os experimentos com pré pulso com valores de Fu de 0,70 e 0,77, respectivamente (**Tabela 1**). Para os experimentos sem pré pulso, os subtipos Nav1.1 e Nav1.4 foram os mais afetados tendo Fu de 0,75 e 0,83, respectivamente (**Tabela 2**). Assim, as macrocorrentes nos canais Nav1.1 e

Nav1.3 foram mais inibidas com pré-pulso e Nav1.1 e Nav1.4 sem pré-pulso (**Figura 25 e 26**).

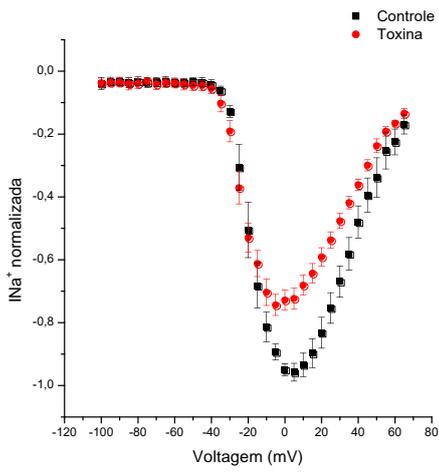
Tabela 1. Fração não inibida da corrente (Fu) com pré-pulso. Médias das células por subtipo (valor de corrente máxima) e seu respectivo erro padrão.

Fração não inibida da corrente INa (Fu)		
	Média	n
hNav1.1	0,70 ± 0,02	6
hNav1.2	0,80 ± 0,05	4
hNav1.3	0,77 ± 0,03	3
hNav1.4	0,79 ± 0,08	5
hNav1.5	0,84 ± 0,03	6
hNav1.6	0,86 ± 0,04	6
hNav1.7	0,91 ± 0,04	4

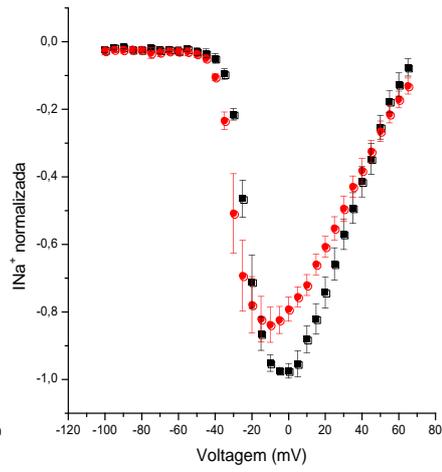
Tabela 2. Fração não inibida da corrente (Fu) sem pré-pulso. Médias das células por subtipo (valor de corrente máxima) e seu respectivo erro padrão.

Fração não inibida da corrente INa (Fu)		
	Média	n
hNav1.1	0,75 ± 0,03	6
hNav1.2	0,88 ± 0,07	4
hNav1.3	0,94 ± 0,06	3
hNav1.4	0,83 ± 0,08	5
hNav1.5	0,88 ± 0,06	6
hNav1.6	0,85 ± 0,03	6
hNav1.7	1,03 ± 0,12	4

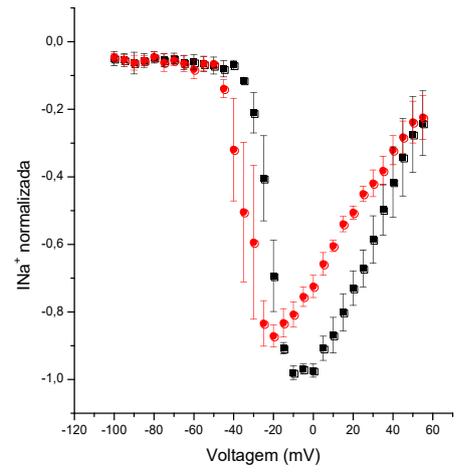
Na_v1.1



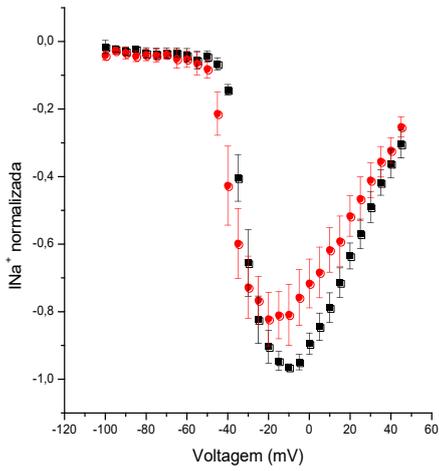
Na_v1.2



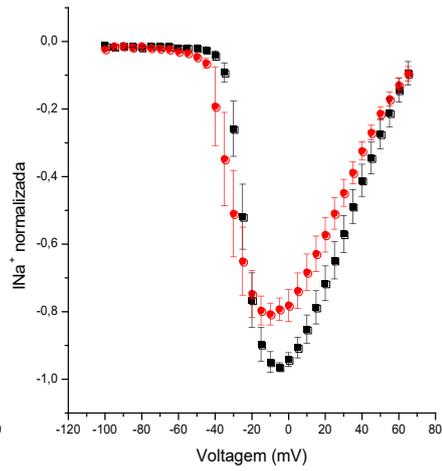
Na_v1.3



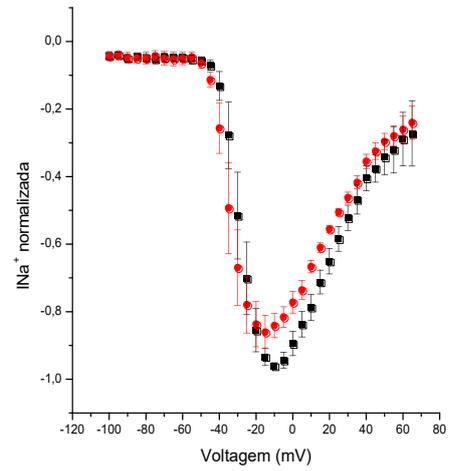
Na_v1.4



Na_v1.5



Na_v1.6



Na_v1.7

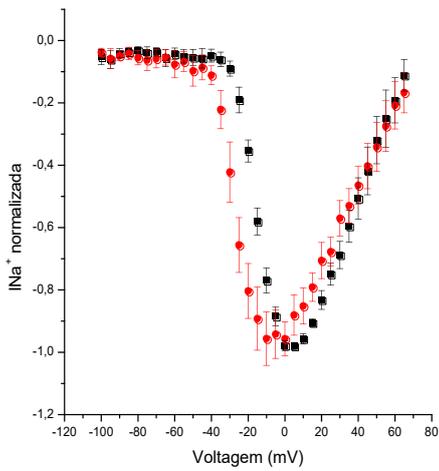


Figura 25. Gráficos de corrente/voltagem (I/V) com pré-pulso. Média das células com corrente normalizada. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

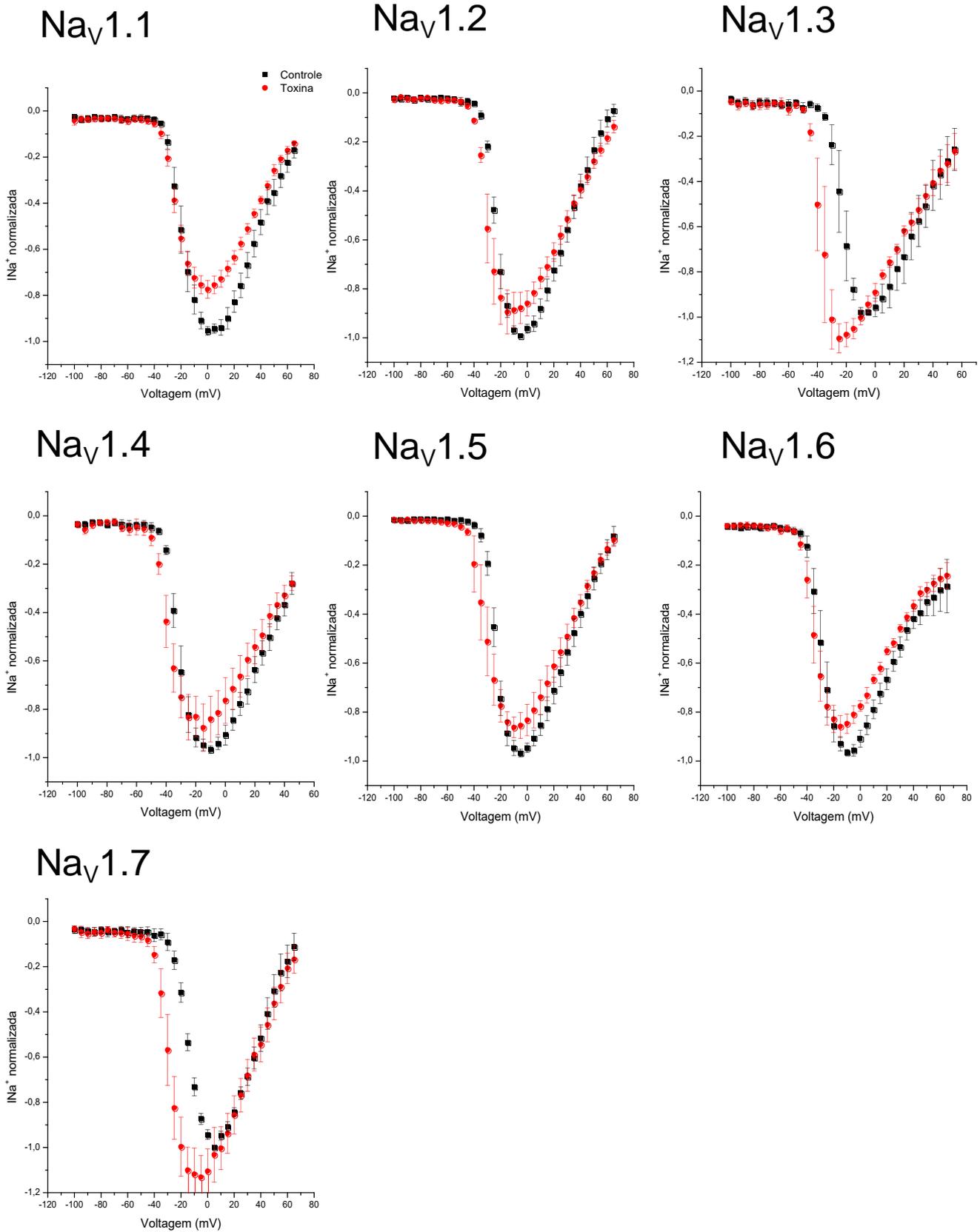


Figura 26. Gráficos de corrente/voltagem (I/V) sem pré-pulso. Média das células com corrente normalizada. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

5.2. Avaliação da probabilidade de abertura na ativação e da disponibilidade dos canais na inativação)

Por meio do $V_{1/2}$ gerado pela função de Boltzmann, foi avaliado o deslocamento da curva de probabilidade de abertura dos canais com e sem a aplicação da toxina para a ativação e a disponibilidade dos canais no protocolo de inativação. A toxina alterou a cinética em todos os subtipos de canais de sódio. As curvas de probabilidade de ativação e inativação de todos os subtipos foram deslocadas para esquerda, consequentemente para potenciais mais negativos (**Figuras 27, 28 e 29**).

Para a ativação com pré-pulso, a variação de deslocamento foi de 3,71 mV a 10,34 mV. O subtipo Nav1.1 foi o de maior alteração ($10,34 \pm 1,17$ mV), seguido do Nav1.7 ($9,44 \pm 2,31$ mV), Nav1.4 ($8,96 \pm 0,85$ mV), Nav1.2 ($8,09 \pm 1,53$ mV), Nav1.3 ($7,99 \pm 4,08$ mV), Nav1.6 ($4,81 \pm 1,40$ mV) e o de menor efeito Nav1.5 ($3,71 \pm 0,25$ mV) (**Tabela 3**) (**Figura 27**). Para a ativação sem pré-pulso, o subtipo mais afetado foi o Nav1.7 com valor de $13,23 \pm 1,11$ mV, seguido por Nav1.3, Nav1.1, Nav1.4, Nav1.2, Nav1.6, Nav1.5, com valores de $11,45 \pm 0,98$ mV, $10,44 \pm 1,07$ mV, $9,39 \pm 1,16$ mV, $7,93 \pm 1,45$ mV, $5,04 \pm 1,45$ mV e $3,54 \pm 0,14$, respectivamente (**Tabela 4**) (**Figura 28**). Todos os subtipos demonstraram diferença significativa ($P < 0,05$) entre controle e toxina tanto para ativação com pré-pulso quanto para ativação sem pré-pulso.

Tabela 3. V_{half} na fase de ativação com pré pulso dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	N
hNav1.1	$-12,34 \pm 1,88$	$-22,68 \pm 1,69$	$10,34 \pm 1,17$	4*
hNav1.2	$-20,51 \pm 1,43$	$-28,61 \pm 2,17$	$8,09 \pm 1,53$	6*
hNav1.3	$-28,02 \pm 4,08$	$-36,01 \pm 3,31$	$7,99 \pm 4,08$	5*
hNav1.4	$-28,04 \pm 2,66$	$-37,01 \pm 2,44$	$8,96 \pm 0,85$	4*
hNav1.5	$-19,80 \pm 2,51$	$-23,52 \pm 2,68$	$3,71 \pm 0,25$	4*
hNav1.6	$-28,69 \pm 3,52$	$-33,51 \pm 2,26$	$4,81 \pm 1,40$	4*
hNav1.7	$-8,25 \pm 1,95$	$-17,69 \pm 3,01$	$9,44 \pm 2,31$	4*

Tabela 4. $V_{1/2}$ na fase de ativação sem pré pulso dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	N
hNav1.1	$-9,88 \pm 2,34$	$-20,33 \pm 1,73$	$10,44 \pm 1,07$	3*
hNav1.2	$-20,79 \pm 1,74$	$-28,72 \pm 2,25$	$7,93 \pm 1,45$	6*
hNav1.3	$-27,42 \pm 4,25$	$-38,88 \pm 4,00$	$11,45 \pm 0,98$	5*
hNav1.4	$-27,63 \pm 2,59$	$-37,03 \pm 2,23$	$9,39 \pm 1,16$	4*
hNav1.5	$-19,33 \pm 2,24$	$-22,87 \pm 2,16$	$3,54 \pm 0,14$	4*
hNav1.6	$-27,07 \pm 2,69$	$-32,12 \pm 2,76$	$5,04 \pm 1,45$	6*
hNav1.7	$-8,42 \pm 2,45$	$-21,65 \pm 2,56$	$13,23 \pm 1,11$	3*

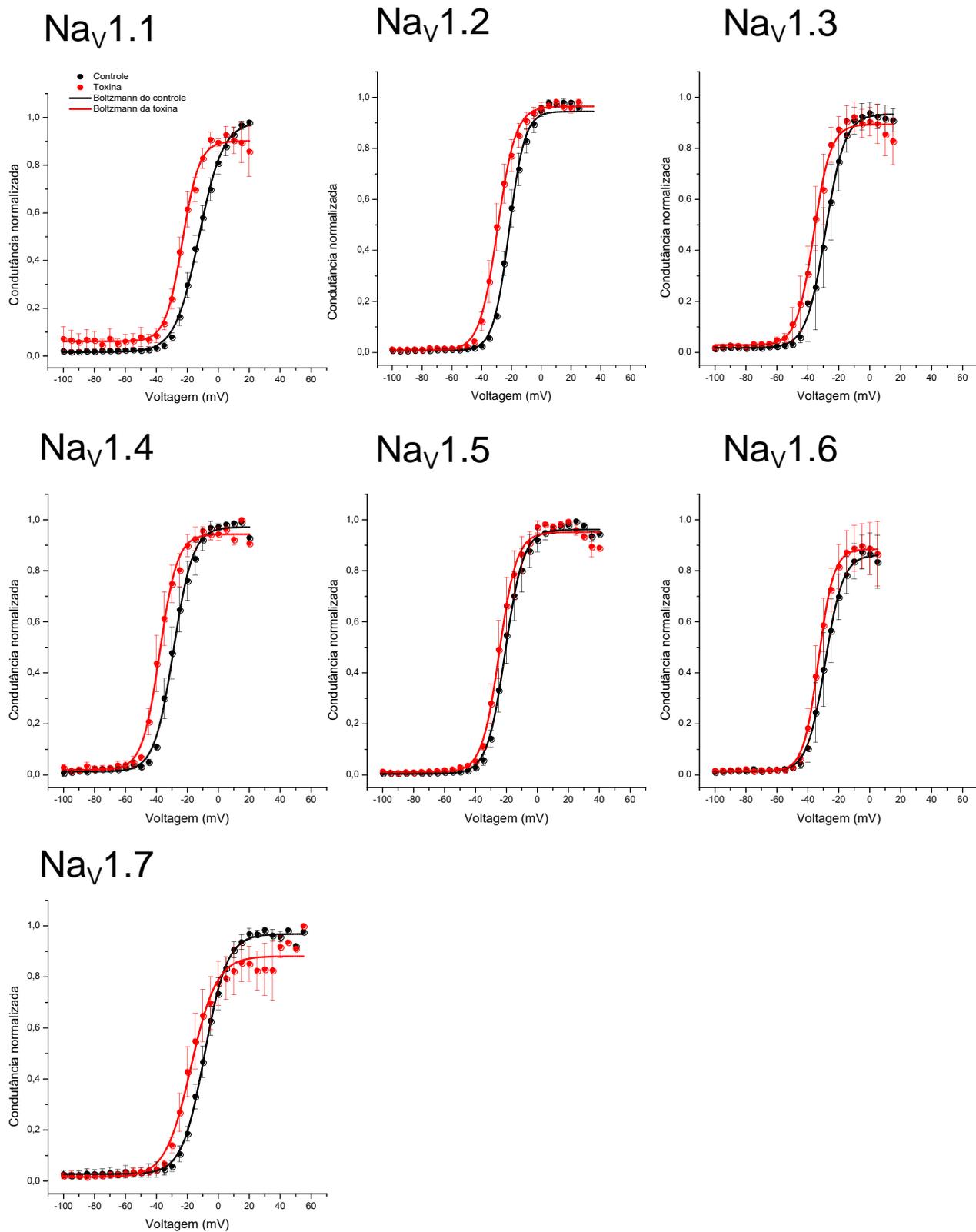


Figura 27. Gráficos da probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem na ativação com pré-pulso. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

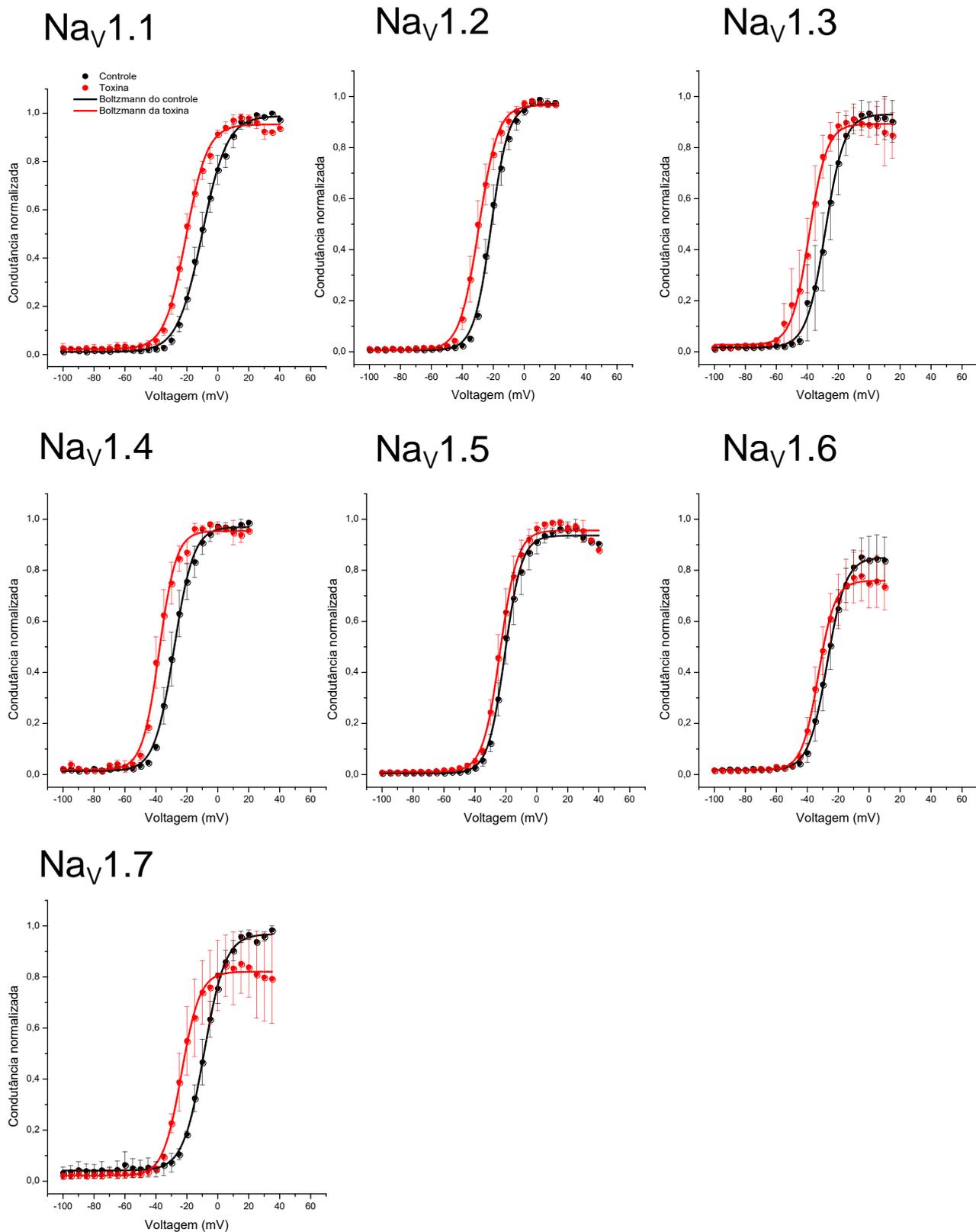


Figura 28. Gráficos da probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem na ativação sem pré-pulso. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

Para a voltagem onde metade dos canais ainda estão abertos e metade já inativaram foi observada uma variação de 7,76 mV até 3,60 mV, sendo o subtipo mais afetado o Nav1.4 ($7,76 \pm 1,18$ mV) e o subtipo menos afetado o Nav1.1 ($3,60 \pm 0,65$ mV) (**Tabela 5**) (**Figura 29**). Todos os subtipos demonstraram diferença significativa ($P < 0,05$) entre controle e toxina.

Tabela 5. V_{half} na fase de inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	N
hNav1.1	$-52,94 \pm 2,22$	$-56,54 \pm 2,62$	$3,60 \pm 0,65$	6*
hNav1.2	$-52,09 \pm 1,87$	$-58,88 \pm 1,92$	$6,79 \pm 1,09$	6*
hNav1.3	$-55,91 \pm 1,32$	$-62,26 \pm 2,25$	$6,34 \pm 1,08$	4*
hNav1.4	$-71,42 \pm 2,41$	$-79,18 \pm 2,45$	$7,76 \pm 1,18$	5*
hNav1.5	$-51,51 \pm 2,76$	$-55,13 \pm 3,32$	$3,61 \pm 0,81$	6*
hNav1.6	$-60,26 \pm 1,99$	$-64,99 \pm 1,69$	$4,72 \pm 0,94$	6*
hNav1.7	$-47,57 \pm 2,37$	$-54,84 \pm 1,59$	$7,27 \pm 1,32$	6*

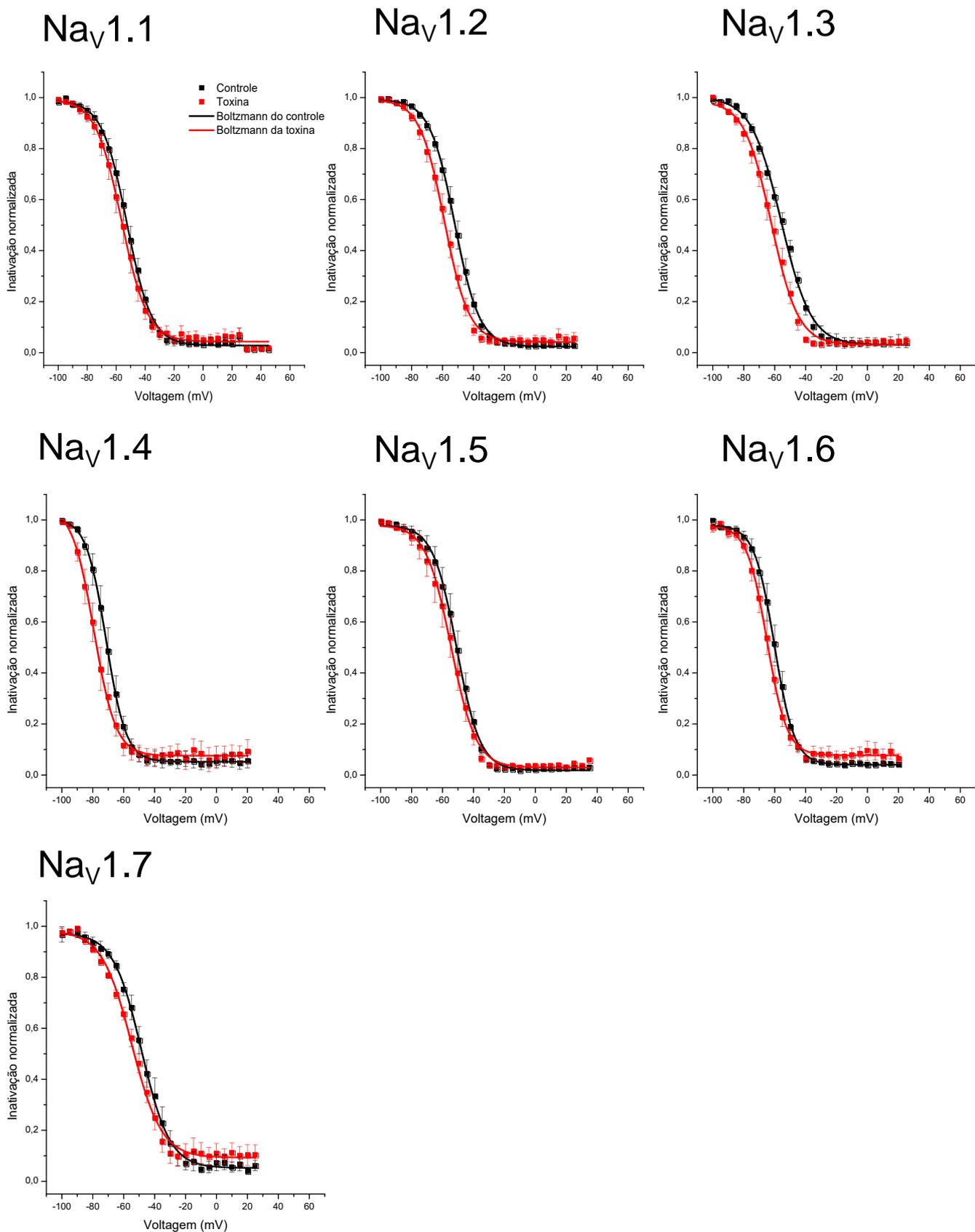


Figura 29. Gráficos da probabilidade de abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem na inativação. Gráficos construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

Em relação à sensibilidade do canal à voltagem (Δk), não foi observada uma influência do peptídeo, tanto na ativação com pré-pulso quanto para a ativação sem pré-pulso. Todos os subtipos não tiveram diferença significativa ($P < 0,05$). Para a inativação, apenas os subtipos Nav1.1, Nav1.3 e Nav1.4 apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre controle e toxina (**Tabelas 6, 7 e 8**).

Tabela 6. Sensibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem a voltagem na ativação com pré-pulso. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	k Controle	k Toxina	Δk	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	5,40 ± 1,40	6,19 ± 1,00	0,80 ± 0,64	3
hNav1.2	5,45 ± 0,73	5,48 ± 0,81	0,03 ± 0,33	6
hNav1.3	3,22 ± 0,62	4,42 ± 0,57	1,19 ± 0,79	4
hNav1.4	5,19 ± 1,04	5,40 ± 0,92	0,20 ± 0,73	5
hNav1.5	4,80 ± 1,08	4,01 ± 0,98	-0,79 ± 0,34	6
hNav1.6	4,17 ± 0,34	4,22 ± 0,71	0,05 ± 0,47	4
hNav1.7	6,86 ± 0,85	6,70 ± 0,98	-0,15 ± 0,77	5

Tabela 7. Sensibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem a voltagem na ativação sem pré-pulso. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	k Controle	k Toxina	Δk	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	4,79 ± 1,01	6,26 ± 1,08	1,47 ± 0,10	3
hNav1.2	5,25 ± 0,72	5,40 ± 0,80	0,15 ± 0,20	6
hNav1.3	3,25 ± 0,67	3,60 ± 0,59	0,35 ± 0,46	4
hNav1.4	5,14 ± 1,03	5,28 ± 0,89	0,14 ± 0,89	5
hNav1.5	3,91 ± 0,52	4,00 ± 0,76	0,09 ± 0,37	6
hNav1.6	4,60 ± 0,40	4,66 ± 0,64	0,06 ± 0,31	5
hNav1.7	6,29 ± 0,31	6,30 ± 0,90	0,00 ± 0,61	5

Tabela 8. Sensibilidade dos canais de sódio dependentes de voltagem a voltagem na inativação. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	k Controle	k Toxina	Δk	
	Média	Média	Média	n
hNav1.1	7,72 ± 0,43	8,12 ± 0,47	0,40 ± 0,05	3*
hNav1.2	7,43 ± 0,23	7,65 ± 0,30	0,22 ± 0,18	5
hNav1.3	9,07 ± 0,56	7,67 ± 0,57	-1,40 ± 0,91	6*
hNav1.4	5,69 ± 0,16	6,32 ± 0,27	0,62 ± 0,17	6*
hNav1.5	7,02 ± 0,42	7,16 ± 0,32	0,13 ± 0,17	6
hNav1.6	5,88 ± 0,13	5,98 ± 0,36	0,10 ± 0,24	6
hNav1.7	8,57 ± 0,41	9,56 ± 0,72	0,98 ± 0,84	6

5.3. Recuperação da inativação lenta

Como já mencionado na introdução, os canais de sódio dependentes de voltagem precisam de um tempo de recuperação para retornarem do estado inativo para o fechado após um estímulo. Dito isso, foi avaliado o tempo de recuperação da inativação lenta dos canais para avaliar a influência que a toxina tem nesse processo por meio do ΔT .

A variação de tempo entre o controle e após aplicação da toxina foi de 0,72 ms a 3,69 ms. O subtipo mais afetado foi o Nav1.7 (3,24 ± 0,59 ms), seguido pelo Nav1.3 (3,69 ± 0,66 ms), Nav1.4 (2,68 ± 0,63 ms), Nav1.5 (1,81 ± 1,08 ms), Nav1.2 (1,37 ± 0,23 ms), Nav1.1 (1,10 ± 0,29 ms) e Nav1.6 (0,72 ± 0,20 ms) (**Tabela 9**) (**Figura 30**). Todos os subtipos, com exceção do Nav1.5, apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre controle e toxina.

Tabela 9. Valores de tau da recuperação da inativação lenta dos canais de sódio dependentes de voltagem e seu respectivo erro padrão. Concentração de toxina testada: 100 nM. (*) Possui diferença estatística.

	T Controle (ms)	T Toxina (ms)	ΔT (ms)	
	Média	Média	Média	N
hNav1.1	2,43 ± 0,25	3,53 ± 0,39	1,10 ± 0,29	6*
hNav1.2	1,86 ± 0,08	3,23 ± 0,21	1,37 ± 0,23	6*
hNav1.3	4,92 ± 0,62	8,62 ± 0,90	3,69 ± 0,66	6*
hNav1.4	2,68 ± 0,39	5,37 ± 0,86	2,68 ± 0,63	6*
hNav1.5	2,58 ± 0,75	4,40 ± 1,83	1,81 ± 1,08	6
hNav1.6	2,63 ± 0,28	3,36 ± 0,31	0,72 ± 0,20	6*
hNav1.7	5,50 ± 0,84	8,74 ± 1,38	3,24 ± 0,59	6*

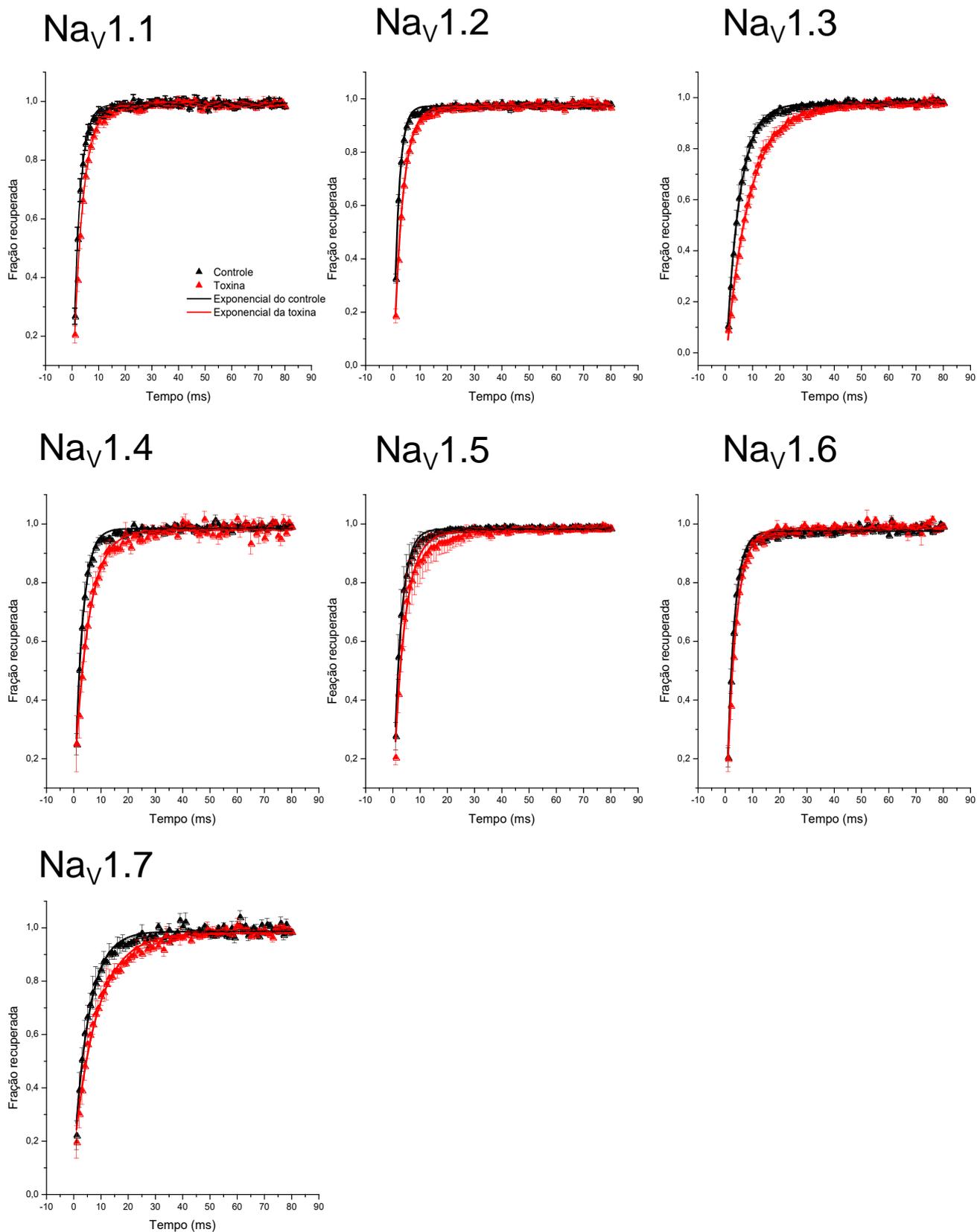


Figura 30. Gráficos da recuperação lenta da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Gráfico construído a partir da função $ExpDec1$. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

5.4. Inativação rápida

Para avaliar o efeito da toxina na inativação rápida, foram observados os traços brutos de corrente de cada subtipo de canal testado. Pode-se observar que não ocorreu efeito na inativação rápida de nenhum dos canais. Dito isso, o efeito de α -toxina não foi observado para o peptídeo em estudo (**Figuras 31 e 32**).

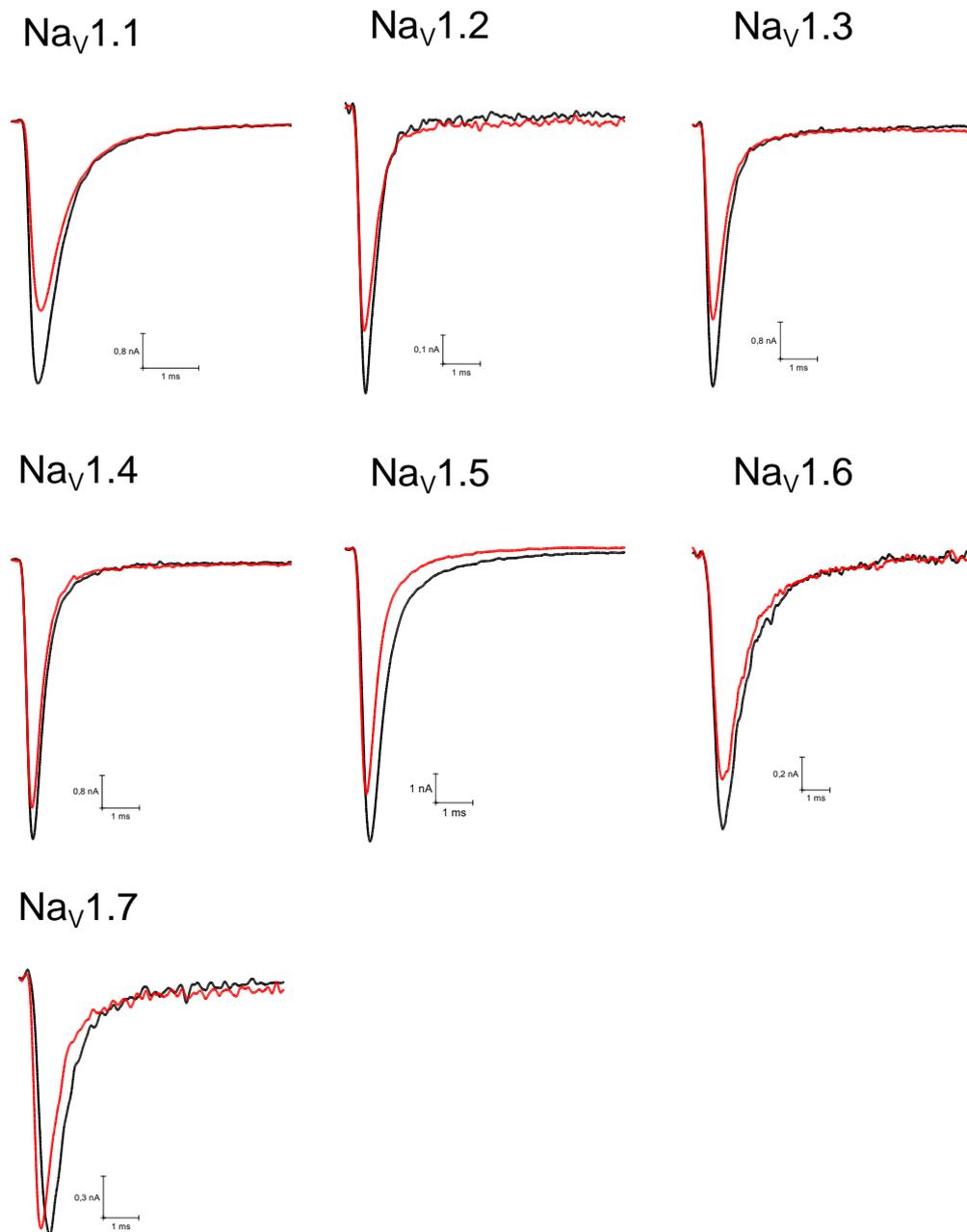
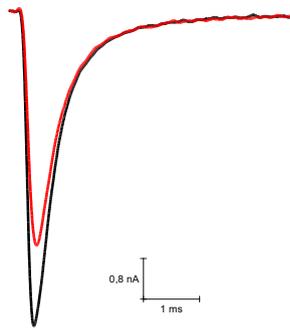
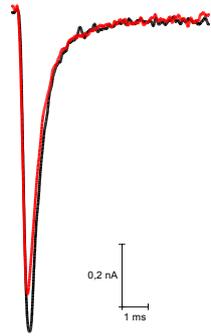


Figura 31. Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem com pré-pulso. Valores de corrente máxima. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

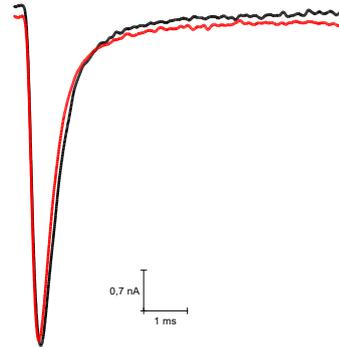
Na_v1.1



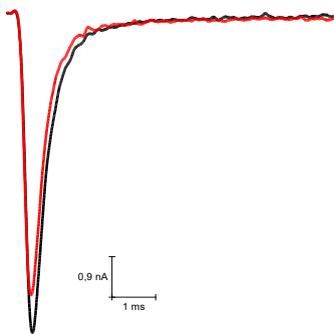
Na_v1.2



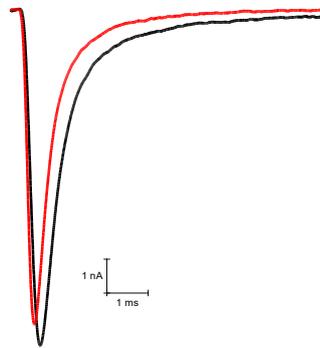
Na_v1.3



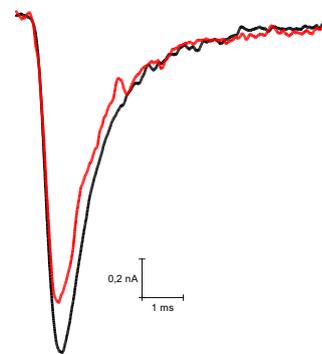
Na_v1.4



Na_v1.5



Na_v1.6



Na_v1.7

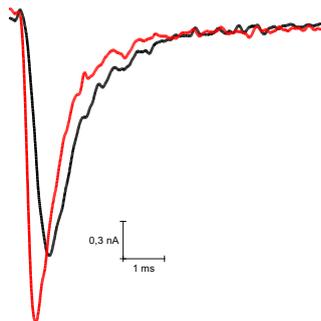


Figura 32. Traço bruto de corrente dos canais de sódio dependentes de voltagem sem pré-pulso. Valores de corrente máxima. Preto: controle; Vermelho: toxina (concentração: 100 nM).

VI. DISCUSSÃO

A variante I1596S possui uma mutação na posição 1596 do canal Nav1.2, ocorrendo a troca do aminoácido isoleucina, com cadeia lateral alifática e característica hidrofóbica, por uma serina, um aminoácido contendo grupo hidroxila e hidrofílica, portanto, polar. A variante V1627M possui uma mutação na posição 1627 ocorrendo uma troca do aminoácido valina por uma metionina. Apesar da metionina ter menor polaridade quando comparada à serina, este aminoácido pode realizar ligações de hidrogênio com outros sítios ácidos, diferentemente da valina, que é um aminoácido apolar.

Tanto a mudança de isoleucina para serina quanto a mudança de valina para metionina fazem com que as cadeias laterais tenham um heteroátomo (oxigênio na serina e enxofre na metionina) com pares de elétrons não ligantes que podem se coordenar a outros aminoácidos com carga positiva na cadeia lateral, como lisina e histidina. Essas interações podem se dar com moléculas de água presentes no meio. Devido a essas possibilidades de ligações uma perturbação estrutural pode ocorrer no canal (**Figura 33**).

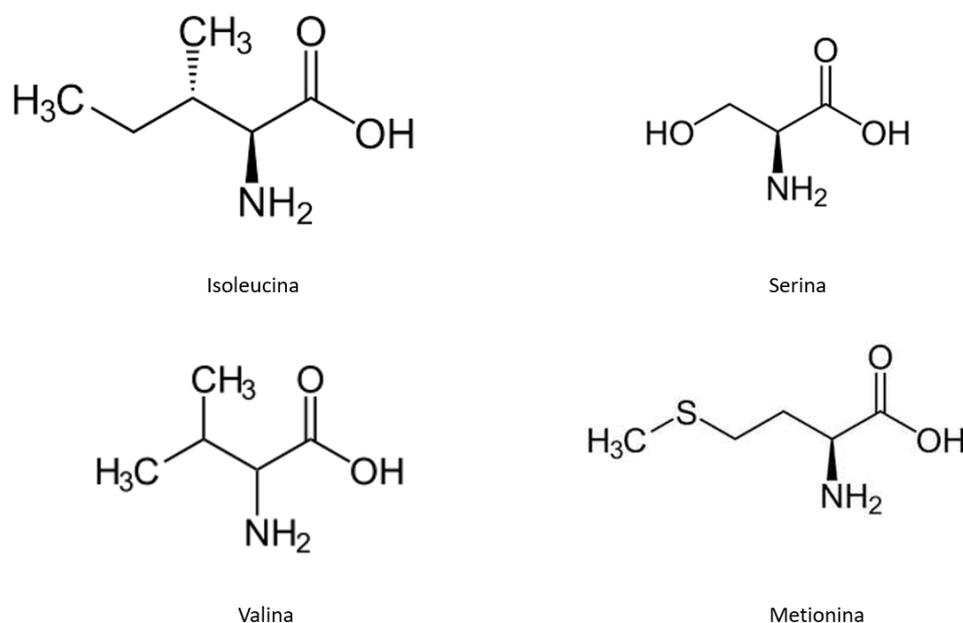


Figura 33. Estrutura dos aminoácidos isoleucina, serina, valina e metionina.

Em decorrência dessas alterações, pode haver uma modificação na densidade da nuvem eletrônica nessas regiões onde os aminoácidos foram trocados. Essas variações provavelmente geraram um rearranjo na estrutura tridimensional diferente do original, alterando assim a cinética do canal Nav1.2. Ademais, por estarem próximas ao segmento S4 (sensor de voltagem) essas perturbações podem explicar as alterações na probabilidade de abertura (I1596S) e na recuperação dos canais (V1627M) observadas (**Figura 34**).

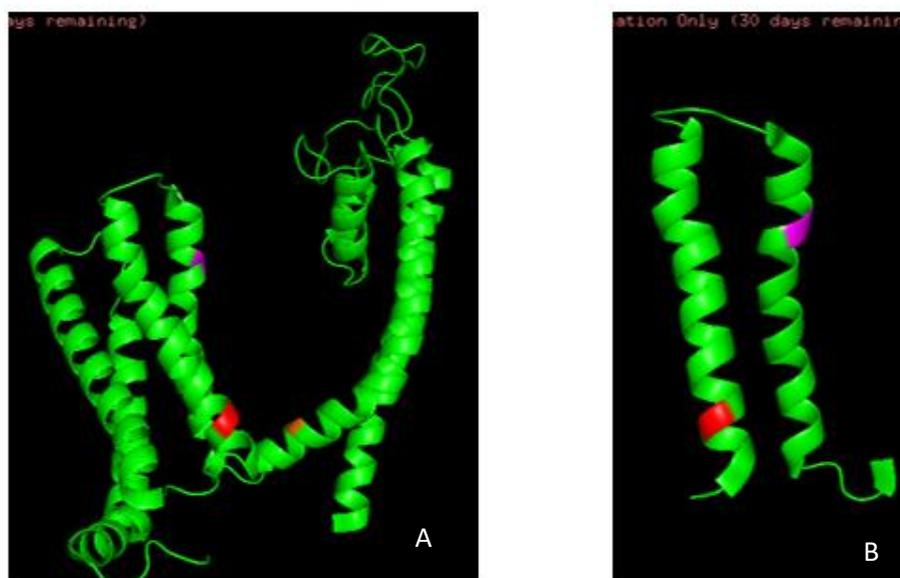


Figura 34. Estrutura tridimensional do domínio IV do canal de sódio dependente de voltagem (A) e destaque dos segmentos S3 e S4 desse domínio (B). Estrutura obtida pelo banco de dados PDB - código 6j8e (Human Nav1.2-beta2-KIIIA ternary complex) e visualizada pelo software Pymol. Posição 1596 (vermelho); posição 1627 (Roxo) e posição 1650 (Laranja).

Uma hipótese é que a variante I1596S provoque um efeito semelhante ao que as beta toxinas provocam no DII. A perturbação causada por novas interações estabelecidas pela substituição de aminoácidos pode tornar o canal pré-ativado e, conseqüentemente, desencadeando sua abertura em voltagens mais hiperpolarizantes (CESTÈLE et al., 1998). Ademais, diversos estudos já demonstraram a influência que o DIV possui na inativação do canal (BRAKE et al., 2022; CAPES et al., 2013). Por fim, estudos com as toxinas que atuam no sítio 3 podem auxiliar em uma possível explicação para a recuperação da inativação mais acelerada da variante V1627M. Essas toxinas atuam no domínio IV fazendo com que o S4-DIV iniba o

movimento externo do sensor, consequentemente tornando a recuperação da inativação mais rápida (HANCK; SHEETS, 2007).

Devido à sua alta expressão em neurônios glutamatérgicos (SANDERS et al., 2018; SYRBE et al., 2016), mutações no gene *SCN2A*, que codifica o canal Nav1.2, associadas à epilepsia estão geralmente relacionadas a ganho de função. Dito isso, alterações na cinética do canal, como aumento da densidade de corrente, deslocamento da ativação para potenciais mais negativos, deslocamento da inativação para potenciais mais positivos e recuperação da inativação mais aceleradamente podem ocorrer (MENEZES et al., 2020).

Com a caracterização da cinética dos canais com as variantes patogênicas escolhidas pode-se observar que ambas as mutações avaliadas apresentaram cinéticas que geraram ganho de função para o canal (**Tabela 10**).

Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos com a caracterização da cinética dos canais Nav1.2 expressos a partir do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet sem mutação e com as variantes I1596S e V1627M. () Possui diferença estatística. Valores entre parênteses: número de células caracterizadas.*

	Nav1.2	Nav1.2 – I1596S	Nav1.2 – V1627M
Probabilidade de abertura na ativação	-21,47 ± 0,71 mV (4)	-24,84 ± 0,51 mV (3)*	-25,16 ± 1,39 mV (4)
<i>Steady-State inactivation</i>	-62,45 ± 1,82 mV (5)	-56,66 ± 0,90 mV (3)*	-64,32 ± 1,62 mV (4)
Recuperação da inativação	3,06 ± 0,30 ms (6)	1,92 ± 0,53 ms (4)	1,83 ± 0,24 ms (5)*

A variante I1596S alterou a probabilidade de abertura na ativação e a disponibilidade de canais na inativação e não alterou a recuperação lenta do canal. A probabilidade de abertura na ativação teve um $V_{1/2}$ deslocado para a esquerda em comparação a cinética do canal não mutado, consequentemente ativando-o em voltagens menores que o controle. A disponibilidade de canais na inativação teve seu $V_{1/2}$ deslocada para potenciais mais positivos (para direita), consequentemente

fazendo com que o canal inative em voltagens maiores. Devido aos parâmetros de cinética alterados pela I1596S, células que expressam esse canal mutado terão um limiar de disparo menor para a despolarização e uma duração maior que o normal. Na literatura temos exemplos de variantes associadas a epilepsia que alteraram a cinética do canal nos mesmos parâmetros. Por exemplo, pode-se citar o trabalho de Schwarz e colaboradores (2016) com a variante R1882G que demonstrou eletrofisiologicamente que a mutação associada a um paciente com epilepsia alterou a probabilidade de abertura do canal Nav1.2 na ativação para potenciais mais hiperpolarizados (~3,6 mV). Ademais, Scalmani e colaboradores caracterização a cinética do canal Nav1.2 com as variantes R223Q e R1319Q, sendo observada um deslocamento da probabilidade de abertura na inativação deslocada positivamente (~3,5 mV para R223Q e 3,8 mV para R1319Q).

A variante V1627M não alterou a probabilidade de abertura na ativação nem na inativação. Entretanto, acelerou a recuperação lentas do canal. Com a recuperação lenta acelerada, o canal está apto a despolarizar novamente mais rapidamente em comparação ao controle, conseqüentemente, a frequência de potenciais de ação pode ser maior caso haja estímulo para isso. Pode-se citar o exemplo o trabalho realizado por Liao e colaboradores (2010) realizado com a variante M252V.

Em relação aos traços brutos, pode-se observar um aumento das macrocorrentes para a variante I1596S (**Figura 17D**), sendo esse efeito possível de ser explicado pelo aumento da janela entre a ativação e a inativação, conseqüentemente aumentando o intervalo de influxo do íon sódio. Para a variante V1627M foi observado uma diminuição das macrocorrentes (**Figura 18D**), isso pode ser explicado devido à relação do aumento na frequência de despolarização com a diminuição de corrente (CARTER; BEAN, 2009). Contudo, vale ressaltar que, ao mensurar a amplitude de corrente, temos que levar em consideração o tamanho das células analisadas e a eficiência na transfecção. Sendo assim, a variação de amplitude entre os traços pode se dar devido à cinética do canal alterada, porém também pode ser devido a fatores experimentais.

Novos compostos obtidos a partir de peçonhas e venenos também podem se tornar potenciais alternativas de tratamento. Estudos como de Zhao e colaboradores (2011), Zhao e colaboradores (2008) e Wang e colaboradores (2001) já demonstraram

atividade de peptídeos do escorpião *Mesobuthus martensi Karsch* com potencial antiepilético. O peptídeo BmK-AEP demonstrou efeito em um modelo de epilepsia induzida por lactona coriaria (WANG et al., 2001), o peptídeo BmK IT2 demonstrou atividade antiepilética em convulsões induzida por pentilenotetrazol (PTZ), reduzindo a gravidade do estado de mal epilético (ZHAO et al., 2008) e o peptídeo BMK AS demonstrou atividade antiepilética por inibição de convulsões induzidas por PTZ e reduzindo a gravidade de convulsões por pilocarpina (ZHAO et al., 2011).

Além do potencial biotecnológico, o uso de toxinas de escorpião como ferramenta pode ser uma alternativa interessante visando a associação entre as variantes e os peptídeos na cinética do canal. As α -toxinas prolongam a inativação rápida dos canais (GoF) (CAMPOS et al., 2008). Entretanto, essa desaceleração faz com que o canal tenda a diminuir a frequência de disparos de potenciais de ação (LoF), pois demanda mais tempo para estar apto a uma nova despolarização. As β -Toxinas alteram a probabilidade de abertura para potenciais mais hiperpolarizados (GoF) e podem reduzir a macrocorrente (LoF) (MENEZES et al., 2023).

Mata e colaboradores (2018) caracterizaram um peptídeo chamado Tf1a obtido do escorpião *Tityus fasciolatus* na concentração de 100 nM. Esse peptídeo alterou a disponibilidade de canais na inativação do canal Nav1.2 em 5,37 mV para esquerda (potenciais mais hiperpolarizados) e retardou a recuperação do canal Nav1.2 em 1,48 ms. A aplicação da Tf1a no canal Nav1.2-I1596S e no canal Nav1.2-V1627M pode ser interessante como uma ferramenta visto que ela pode alterar a cinética deles fazendo com que a disponibilidade de canais na inativação retorne para valores mais próximos ao canal controle ($-62,45 \pm 1,82$ mV) para a variante I1596S ($-56,66 \pm 0,90$ mV) e retarde a recuperação lenta para valores similares ao canal sem mutação ($3,06 \pm 0,30$ ms) para a variante V1627M ($1,83 \pm 0,24$ ms). Ademais, o peptídeo Tst2 também demonstrou ser uma possível ferramenta de estudo, pois retarda a recuperação da inativação do canal Nav1.2 e desloca o $V_{1/2}$ da inativação para potenciais mais hiperpolarizados (**Tabela 11**).

Tabela 11. Variação do $V_{1/2}$ da probabilidade de abertura na inativação e variação do T da recuperação lenta do canal após aplicação da toxina Tf1a, Tst2 e após mutação do plasmídeo pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet com as variantes I1596S e V1627M. (x): Não foi adicionado devido a não diferença estatística entre a variante e o controle.

	Tf1a	Tst2	I1596S	V1627M
$\Delta V_{1/2}$ Inativação (mV)	-5,37	-6,79	5,79	x
ΔT Recuperação lenta (ms)	1,48	1,37	x	-1,23

Considerando-se a análise da sequência precursora da Tst2 e a massa monoisotópica encontrada, pode-se dizer que a Tst2 possui amidação na região C-Terminal. Toxinas de escorpiões são descritas na literatura por possuírem modificações pós-traducionais (COELHO et al., 2014). Possivelmente, essa modificação visa uma melhor atividade biológica (maior estabilidade contra agentes externos e um aumento de toxicidade).

Considerando-se a massa monoisotópica encontrada, ainda não é possível confirmar que o peptídeo em estudo se trata da Tst2. A massa encontrada no artigo de Batista e colaboradores (2007) é bem próxima da massa molecular média obtida. Contudo, pelo fato do artigo não especificar se a massa descrita se trata da massa molecular média ou massa monoisotópica, não é possível realizar uma comparação adequada. Entretanto, quando utilizado o *software* Compass IsotopePattern (Bruker Daltonics, Alemanha) para calcular a massa monoisotópica teórica da Tst2, observou-se que a massa monoisotópica do peptídeo em estudo obtida por espectrometria de massa foi bem similar ao previsto pelo *software*. Após o sequenciamento parcial, será possível confirmar com maior embasamento.

Após o alinhamento também pode-se observar que a Tst2 possuía 100% de identidade com a Ts2. Na literatura, tem-se descrito a atividade da Ts2 como uma toxina de atividade α e β NaScTxS. Esse peptídeo inibe a inativação rápida dos canais Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (ação de α -NaScTxS) e altera a probabilidade de abertura na ativação do canal Nav1.3. Ademais, para os canais NaV1.4, NaV1.8 e DmNav1 não foi observado efeito. Contudo, após a realização da caracterização do peptídeo Tst2 foi observada apenas atividade de β -toxina (deslocamento da probabilidade de abertura para potenciais mais hiperpolarizados e

redução da macrocorrente). A maior atividade foi no canal Nav1.1 deslocando sua probabilidade de abertura na ativação com pré pulso em 10,34 mV, no canal Nav1.7 deslocando sua probabilidade de abertura na ativação sem pré pulso em 13,23 mV e no canal Nav1.4 deslocando sua probabilidade de abertura na inativação em 7,76 mV. Em relação à redução da macrocorrente, o canal Nav1.1 foi o mais afetado, tendo uma redução de 30% e 25% de sua corrente com e sem pré pulso respectivamente. Vale ressaltar que a comparação entre as caracterizações da Ts2 e Tst2 não se dá da forma mais adequada possível, visto que a Ts2 foi caracterizada a 1 μ M em Nav expressos em ovócitos de *Xenopus laevis* e a Tst2 foi caracterizada a 100 nM em Nav expressos em células HEK e CHO.

Considerando a estrutura tridimensional das α -toxinas e das β -toxinas, pode-se observar uma alta conservação entre os grupos. Ambas possuem três ou quatro folhas beta antiparalelas e uma alfa-hélice, além de cisteínas conservadas. Ademais, Chen e colaboradores (2012) demonstraram que existe uma orientação de ligação comum entre α -NaScTxS e β -NaScTxS. Dito isso, apenas por meio da análise da estrutura primária das NaScTxS não é possível fazer a classificação entre α -toxinas e β -toxinas, sendo necessária a caracterização eletrofisiológica. Discordâncias entre a classificação baseada na sequência primária e a baseada na farmacologia já foram descritas para outras NaScTxS. O peptídeo Cn12 possui alta percentagem de identidade com β -toxinas, mas apresenta atividade de α -toxina (DEL RÍO-PORTILLA et al., 2004). Ts17 apresenta alta porcentagem de identidade com α -toxinas, mas possui atividade de β -toxina (MENEZES et al., 2023). Para a toxina em estudo, pode-se observar algo parecido, visto que após o alinhamento pode-se inferir que a Tst2 possuía atividade dupla (tanto α -toxina quanto β -toxina), mas com a caracterização eletrofisiológica pode-se observar apenas atividade de β -toxina.

O deslocamento da probabilidade de abertura dos canais na ativação e na inativação ocorrem devido ao aprisionamento do sensor de voltagem do domínio II em um estado pré ativado, conseqüentemente tornando a abertura do canal mais precoce (CESTÈLE et al., 1998). Além disso, ao aprisionar o sensor de voltagem na porção extracelular, alguns canais podem passar do estado fechado diretamente para o estado inativado. Sendo assim, ao mensurar as macrocorrentes das células (todos os canais contidos na célula) pode-se observar uma redução de amplitude de corrente (CESTÈLE et al., 1998). A interação das β -NaScTxS se dá pela região farmacofórica,

uma região entre as fitas $\beta 2$ e $\beta 3$, a região *N-groove* e a região C-terminal. Além disso, as cisteínas são conservadas (C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7), sendo essa uma característica da NaScTxS (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

β -toxinas de escorpião podem ter atividade nos canais de sódio intensificada quando protocolo de estimulação inclui um pré pulso (MORAES et al., 2011), como foi observado para o peptídeo Tz1 obtido do escorpião *Tityus zulianus* (LEIPOLD et al., 2006). Dito isso, foram realizados experimentos visando verificar se a atividade da Tst2 era ampliada nos registros precedidos desse estímulo. Foi observado que a utilização do pré-pulso não alterou a atividade da Tst2. Resultados similares a esse já foram descritos em outros trabalhos como Menezes e colaboradores (2023) utilizando o peptídeo Ts17, e no estudo de Mata e colaboradores (2018) com o peptídeo Tf1a.

VII. CONCLUSÃO

A mutagênese sítio dirigida das variantes I1596S e V1627M foram verificadas por gel de agarose e apresentaram as três bandas esperadas no gel. Com isso, as caracterizações eletrofisiológicas de suas cinéticas foram realizadas. Devido aos cortes não esperados obtidos após o tratamento com a enzima de restrição Hind III obtido após corrida de gel de agarose, a variante L1650P não foi caracterizada, sendo necessária refazer a mutagênese sítio dirigida, além de uma nova confirmação. Ademais, a confirmação por sequenciamento das variantes I1596S e V1627M foi realizada pela empresa Exxtend/Omikka.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que as mutações no gene *SCN2A* associadas à epilepsia estudadas geraram ganho de função para o canal Nav1.2, alterando sua cinética. A variante Nav1.2-I1596S teve a probabilidade de abertura do canal na ativação alterada para potenciais mais hiperpolarizados e a probabilidade de abertura na inativação alterada para potenciais menos hiperpolarizados. Com isso o canal tem uma ativação mais cedo e inativação mais tardia que o controle, consequentemente as células que expressam esse canal mutado terão uma fase de despolarização mais precoce e com uma duração maior que o normal. A variante V1627M alterou a recuperação lenta do canal, fazendo com que o Nav1.2-V1627M se recupere mais rápido que o controle. Para a recuperação lenta na variante I1596S e a probabilidade de abertura tanto na ativação quanto na inativação na variante V1627M não foram observadas diferenças estatísticas quando estes parâmetros de

cinética foram comparados aos do canal sem mutação. Dito isso, as células que expressão esse canal mutado terão um período refratário menor e conseqüentemente estarão aptos para uma nova despolarização antes do que o canal sem mutação.

A purificação e a avaliação eletrofisiológica do peptídeo em estudo, isolado da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*, foram realizadas. O peptídeo apresentou atividade de β -NaScTxS, sendo sua atividade maior no canal Nav1.1 (ativação com pré pulso), no canal Nav1.7 (ativação sem pré pulso), no canal Nav1.4 (inativação) e no canal Nav1.3 (recuperação lentas dos canais). Todos os subtipos de canal apresentaram diferença significativa na ativação e na inativação. Já para a recuperação lenta dos canais, apenas o canal Nav1.5 não apresentou diferença significativa. Dito isso, esse deslocamento da probabilidade de abertura se dá devido ao aprisionamento do sensor de voltagem do domínio II fazendo com que o canal se torne pré ativado, conseqüentemente alterando sua probabilidade de abertura para potenciais mais hiperpolarizados. Para confirmar se o peptídeo estudado é a Tst2 o sequenciamento parcial se faz necessário, contudo a massa monoisotópica encontrada é similar a esperada para a toxina.

VIII.PERSPECTIVAS

Diante do que foi obtido, a toxina Tst2 não seria um bom composto visando a busca de um novo fármaco para a epilepsia devido a sua atividade, mas pode-se utilizá-la como uma ferramenta de estudo.

Dentre as perspectivas do trabalho objetiva-se a trabalhar com os peptídeos Tst2 e Tf1a, ambos na concentração de 100 nM, visando avaliar seus efeitos na cinética dos canais Nav1.2-I1596S e Nav1.2-V1627M (principalmente nos parâmetros alterados pelas variantes). Além disso, realizar novamente a mutagênese sitio dirigida da variante L1650P e em seguida caracterizar sua cinética, e avaliar o efeito de fármacos já comercializados, por exemplo a carbamazepina, nos canais mutados. Ademais, a avaliação estrutural por dinâmica molecular se faz interessante visto que esses resultados podem trazer um maior embasamento estrutural que as variantes causam no canal Nav1.2 e com isso relacioná-las com as alterações das cinéticas. Por fim, realização do sequenciamento parcial do peptídeo visando uma confirmação de se tratar da Tst2, realização do estudo eletrofisiológico em canais de inseto e a realização do dicróismo circular.

IX.REFERÊNCIAS

- AHERN, C. A. et al. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. **The Journal of General Physiology**, v. 147, n. 1, p. 1–24, 28 jan. 2016.
- ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, jan. 2014.
- ALMEIDA, D. D. et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 362, 1 dez. 2012.
- AMORIM-CARMO, B. et al. Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Analogs from the Scorpion Peptide Stigmurin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 623, 31 jan. 2019.
- AUVIN, S. Paediatric epilepsy and cognition. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 64, n. 12, p. 1444–1452, 8 dez. 2022.
- BAGAL, S. K. et al. Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 360–366, 2015.
- BARBER, A. F. et al. Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 9, p. 2120–2125, set. 2012.
- BARTMANN, A. P.; SANDER, J. W. Epilepsy treatment : a paradigm shift is urgently need. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 3, p. 180–182, 2013.
- BATISTA, C. V. F. et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 803, n. 1, p. 55–66, 2004.
- BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1–2, p. 147–157, jul. 2007.
- BECERRIL, B. et al. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the

Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **The Biochemical journal**, v. 313 (Pt 3, p. 753–60, 1 fev. 1996.

BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 821–835, jun. 1997.

BERECKI, G. et al. Dynamic action potential clamp predicts functional separation in mild familial and severe de novo forms of SCN2A epilepsy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 24, p. E5516–E5525, 12 jun. 2018.

BILLEN, B.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 24, p. 2492–2502, 2008.

BOSMANS, F. Four Novel Tarantula Toxins as Selective Modulators of Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 419–429, 2005.

BOSMANS, F.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; TYTGAT, J. Differential effects of five “classical” scorpion β -toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 218, n. 1, p. 45–51, 2007.

BRAAKMAN, H. M. et al. Phenytoin as a last-resort treatment in SCN8A encephalopathy. **Epilepsia Open**, v. 2, n. 3, p. 343–344, 1 set. 2017.

BRAKE, N. et al. Closed-state inactivation of cardiac, skeletal, and neuronal sodium channels is isoform specific. **Journal of General Physiology**, v. 154, n. 7, 4 jul. 2022.

CALDWELL, J. H. et al. Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5616–5620, 9 maio 2000.

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

CAMPOS, F. V. et al. β -Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel. **The Journal of General Physiology**, v. 130, n. 3, p. 257–268, 2007.

CAMPOS, F. V et al. Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. **The Journal of general physiology**, v. 132, n. 2, p. 251–63, 2008.

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

CAPES, D. L. et al. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. **Journal of General Physiology**, v. 142, n. 2, p. 101–112, 1 ago. 2013.

CARNEIRO, L.; MORTARI, M. Neuroprotective effect of peptide neurovespina after pilocarpine-induced status epilepticus in mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 405, p. 158, out. 2019.

CARTER, B. C.; BEAN, B. P. Sodium Entry during Action Potentials of Mammalian Neurons: Incomplete Inactivation and Reduced Metabolic Efficiency in Fast-Spiking Neurons. **Neuron**, v. 64, n. 6, p. 898–909, dez. 2009.

CARVILL, G. L. et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. **Nature Genetics**, v. 45, n. 7, p. 825–830, 26 jul. 2013.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124–141, 2007.

CATTERALL, W. A. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms : The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron**, v. 26, p. 13–25, 2000.

CEN, Z. et al. Q10R mutation in SCN9A gene is associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus. **Seizure**, v. 50, p. 186–188, ago. 2017.

CESTÈLE, S. et al. Voltage Sensor–Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by beta-Scorpion Toxin Bound to the S3–S4 Loop in Domain II. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 919–931, out. 1998.

CHEN, T.-S. et al. Immunity, Ion Channels and Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6446, 9 jun. 2022.

CLARE, J. J. et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 11, p. 506–520, 2000.

COELHO, V. A. et al. Functional and structural study comparing the C-terminal amidated β -neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v. 83, p. 15–21, 2014.

COLOGNA, C. T. et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. **FEBS Journal**, v. 279, n. 8, p. 1495–1504, 2012.

COVARRUBIAS, M. et al. Mechanistic Insights into the Modulation of Voltage-Gated Ion Channels by Inhalational Anesthetics. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 10, p. 2003–2011, nov. 2015.

CUNHA NETO, R. DOS S. et al. Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 50, 2015.

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

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

DEL RÍO-PORTILLA, F. et al. NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* with a typical β -toxin sequence but with α -like physiological activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 12, p. 2504–2516, 2004.

DEVINSKY, O. et al. Recognizing and preventing epilepsy-related mortality. **Neurology**, v. 86, n. 8, p. 779–786, 23 fev. 2016a.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 3, p. 270–278, mar. 2016b.

- DEVINSKY, O. et al. Epilepsy. **NATURE REVIEWS**, v. 3, n. 18024, p. 1–24, 2018.
- DIEGO-GARCÍA, E. et al. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 1, p. 187–200, 20 jan. 2008.
- DOTY, C. SCN9A: another sodium channel excited to play a role in human epilepsies. **Clinical Genetics**, v. 77, n. 4, p. 326–328, abr. 2010.
- DUQUE, H. M. et al. To4, the first Tityus obscurus β -toxin fully electrophysiologically characterized on human sodium channel isoforms Harry. **Peptides**, v. 95, p. 106–115, 2017.
- EIJKELKAMP, N. et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. **Brain**, v. 135, n. 9, p. 2585–2612, 2012.
- ESCAYG, A.; GOLDIN, A. L. Sodium channel SCN1A and epilepsy : Mutations and mechanisms. **Epilepsia**, v. 51, n. 9, p. 1650–1658, 2010.
- ESTACION, M. et al. Nav1.7 Gain-of-Function Mutations as a Continuum: A1632E Displays Physiological Changes Associated with Erythromelalgia and Paroxysmal Extreme Pain Disorder Mutations and Produces Symptoms of Both Disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 43, p. 11079–11088, 2008.
- ESTACION, M. et al. A sodium channel mutation linked to epilepsy increases ramp and persistent current of Nav1.3 and induces hyperexcitability in hippocampal neurons. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 2, p. 362–368, ago. 2010.
- FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 139, n. July 2017, p. 73–79, jan. 2018.
- FELTS, P. A. et al. Sodium channel α -subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 45, n. 1, p. 71–82, abr. 1997.
- FERNANDES, J. R. C.; BLEICHER, L.; BEIRÃO, P. S. L. Closed- and open-state models of human skeletal muscle sodium channel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 506, n. 4, p. 826–832, 2018.

FISHER, R. S. et al. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FUJIWARA, T. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. **Brain**, v. 126, n. 3, p. 531–546, 1 mar. 2003.

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

GARDELLA, E. et al. The phenotype of SCN8A developmental and epileptic encephalopathy. **Neurology**, v. 91, n. 12, p. E1112–E1124, 18 set. 2018.

GIAMBARBERI, L.; MUNGER CLARY, H. M. Suicide and Epilepsy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 22, n. 8, p. 441–450, 17 ago. 2022.

GOLDIN, A. L. et al. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365–368, 2000.

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

GRIDER, M. H.; JESSU, R.; KABIR, R. **Physiology, Action Potential**. [s.l.: s.n.].

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

HAMMER, M. F. et al. **SCN8A-Related Epilepsy with Encephalopathy**. 1^o ed. Seattle, WA.: GeneReviews®, 2016.

HAMMOND, C. The voltage-gated channels of Na⁺ action potentials. In: **Cellular and Molecular Neurophysiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 55–91.

HAN, C. et al. Early- and late-onset inherited erythromelalgia: genotype-phenotype correlation. **Brain**, v. 132, n. 7, p. 1711–1722, jul. 2009.

HANCK, D. A.; SHEETS, M. F. Site-3 toxins and cardiac sodium channels. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 181–193, fev. 2007.

HERLENIUS, E. et al. SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: The phenotypic spectrum. **Epilepsia**, v. 48, n. 6, p. 1138–1142, jun. 2007.

HERNANDEZ, C. M.; RICHARDS, J. R. **Physiology, Sodium Channels**. [s.l: s.n.].

HOLLAND, K. D. et al. Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. **Neuroscience Letters**, v. 433, n. 1, p. 65–70, 5 mar. 2008.

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

HÜBNER, C. A.; JENTSCH, T. J. Ion channel diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 20, p. 2435–2445, 2002.

INUZUKA-NAKAHARADA, L. M. Dieta cetogênica e dieta de Atkins modificada no tratamento da epilepsia refratária em crianças e adultos. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, n. 2, p. 65–69, jun. 2008.

INUZUKA, L. M. et al. Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature. **Brain and Development**, v. 42, n. 2, p. 211–216, fev. 2019.

INUZUKA, L. M. et al. Parental germline mosaicism in SCN3A-related severe developmental disorder. **Brain and Development**, v. 43, n. 5, p. 669–670, maio 2021.

JENTSCH, T. J.; HÜBNER, C. A.; FUHRMANN, J. C. Ion channels : Function unravelled by dysfunction. **Nature cell biology**, v. 6, n. 11, p. 1039–1047, 2004.

JOHANNESSEN, K. M. et al. Early mortality in SCN8A -related epilepsies. **Epilepsy Research**, v. 143, n. April, p. 79–81, jul. 2018.

KANNER, A. M.; BICCHI, M. M. Antiseizure Medications for Adults With Epilepsy. **JAMA**, v. 327, n. 13, p. 1269, 5 abr. 2022.

KATZ, E. et al. Role of sodium channel subtype in action potential generation by neocortical pyramidal neurons. 2018.

KIRKPATRICK, M.; O'CALLAGHAN, F. Epilepsy and cannabis: so near, yet so far.

Developmental Medicine & Child Neurology, v. 64, n. 2, p. 162–167, 8 fev. 2022.

KNUPP, K. G.; WIRRELL, E. C. Treatment Strategies for Dravet Syndrome. **CNS Drugs**, v. 32, n. 4, p. 335–350, 2018.

LAUXMANN, S. et al. An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na⁺ current. **Epilepsia**, v. 54, n. 9, p. e117–e121, set. 2013.

LEAGUE, I.; EPILEPSY, A.; PRIMARY, P. Partial-onset seizures Generalized-onset seizures. **Britannica Academic**, p. 1–2, 2011.

LEIPOLD, E. et al. Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 340–347, 2006.

LENAEUS, M. J. et al. Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1–10, 2017.

LIN, Y.-C. et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4767, 3 dez. 2014.

LINDY, A. S. et al. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. **Epilepsia**, v. 59, n. 5, p. 1062–1071, 14 maio 2018.

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

LOPES-CENDES, I.; OLIVEIRA RIBEIRO, P. A. Aspectos genéticos das epilepsias: uma visão atual. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 24, n. 6, p. 903–908, nov. 2013.

LÖSCHER, W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 757–776, 20 out. 2013.

LOSSIN, C. et al. Epilepsy-Associated Dysfunction in the Voltage-Gated Neuronal

Sodium Channel SCN1A. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 36, p. 11289–11295, 2003.

MALAGÓN-VALDEZ, J. The new antiepileptic drugs: their indications and side effects. **Revista de neurologia**, v. 39, n. 6, p. 570–5, 2004.

MANTEGAZZA, M. et al. Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 18177–18182, 13 dez. 2005.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 1, p. 69–85, 2007.

MENEZES, L. F. S. et al. Epilepsy-Related Voltage-Gated Sodium Channelopathies: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 18 ago. 2020.

MENEZES, L. F. S. et al. Ts17, a Tityus serrulatus β -toxin structurally related to α -scorpion toxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1865, n. 1, p. 184057, jan. 2023.

MENG, H. et al. The SCN1A Mutation Database: Updating Information and Analysis of the Relationships among Genotype, Functional Alteration, and Phenotype. **Human Mutation**, v. 36, n. 6, p. 573–580, 2015.

MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S. et al. Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. **Epilepsia**, v. 56, n. 5, p. 707–716, maio 2015.

MILLIGAN, T. A. Epilepsy: A Clinical Overview. **The American Journal of Medicine**, v. 134, n. 7, p. 840–847, jul. 2021.

MONGE-FUENTES, V. et al. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 31, 8 dez. 2015.

MORAES, E. R. et al. Differential Effects of Tityus bahiensis Scorpion Venom on Tetrodotoxin-Sensitive and Tetrodotoxin-Resistant Sodium Currents. **Neurotox Res**, v. 19, p. 102–114, 2011.

MUSTO, E.; GARDELLA, E.; MØLLER, R. S. Recent advances in treatment of epilepsy-related sodium channelopathies. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 24, p. 123–128, jan. 2020.

NAMADURAI, S. et al. A new look at sodium channel Beta subunits. **Open Biology**, v. 5, n. 1, p. 140192–140192, 2015.

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

NICITA, F. et al. Genotype-phenotype correlations in a group of 15 SCN1A-mutated italian patients with GEFS+ spectrum (seizures plus, classical and borderline severe myoclonic epilepsy of infancy). **Journal of Child Neurology**, v. 25, n. 11, p. 1369–1376, 20 nov. 2010.

OHBA, C. et al. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. **Epilepsia**, v. 55, n. 7, p. 994–1000, 1 jul. 2014.

OLIVA, M.; BERKOVIC, S. F.; PETROU, S. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1849–1859, 1 nov. 2012.

OLIVEIRA DA MATA, D. et al. Modulation of hNav by Tst1, a β -toxin purified from the scorpion *Tityus stigmurus*. **Biochimie**, n. January, p. 113260, set. 2022.

ORSINI, A.; ZARA, F.; STRIANO, P. **Recent advances in epilepsy genetics** *Neuroscience Letters* Elsevier Ireland Ltd, , 22 fev. 2018.

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

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

PATEL, R. R. et al. Aberrant epilepsy-associated mutant Nav1.6 sodium channel activity can be targeted with cannabidiol. **Brain**, v. 139, n. 8, p. 2164–2181, 2016.

PAYANDEH, J. et al. The Crystal Structure of a Voltage-Gated Sodium Channel. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 353–358, 2012.

- PETRELLI, C. et al. Early clinical features in Dravet syndrome patients with and without SCN1A mutations. **Epilepsy Research**, v. 99, n. 1–2, p. 21–27, mar. 2012.
- POSSANI, L. D. et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 287–300, 1999.
- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328–342, 2013.
- RATES, B. et al. Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 611–618, 2008.
- RAUCH, A. et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: An exome sequencing study. **The Lancet**, v. 380, n. 9854, p. 1674–1682, 10 nov. 2012.
- REYES, I. S. et al. Alleged Cases of Vaccine Encephalopathy Rediagnosed Years Later as Dravet Syndrome. **PEDIATRICS**, v. 128, n. 3, 15 ago. 2011.
- RHODES, T. H. et al. Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. **The Journal of Physiology**, v. 569, n. 2, p. 433–445, dez. 2005.
- RIBAN, V.; FITZSIMONS, H. L.; DURING, M. J. Gene therapy in epilepsy. **Epilepsia**, v. 50, n. 1, p. 24–32, jan. 2009.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 831–844, 2005.
- ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W.; RHO, J. M. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 5, p. a022780, maio 2016.
- SANDERS, S. J. et al. Progress in Understanding and Treating SCN2A -Mediated Disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 41, n. 7, p. 442–456, jul. 2018.
- SAXENA, S.; LI, S. Defeating epilepsy: A global public health commitment. **Epilepsia Open**, v. 2, n. 2, p. 153–155, jun. 2017.
- SCALMANI, P. et al. Effects in neocortical neurons of mutations of the Nav1.2 Na⁺

channel causing benign familial neonatal-infantile seizures. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40, p. 10100–10109, 4 out. 2006.

SIMONIAN, M. H. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. **Current Protocols in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 639–643, ago. 2004.

SINGH, N. A. et al. A Role of SCN9A in Human Epilepsies, As a Cause of Febrile Seizures and As a Potential Modifier of Dravet Syndrome. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 9, p. e1000649, 18 set. 2009.

SOKOLOV, S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 76–78, 2007.

SOUZA, C. S.; AMARAL, C.; TREPTOW, W. Electric fingerprint of voltage sensor domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 49, p. 17510–17515, 9 dez. 2014.

SPRISSLER, R. S. et al. Altered gene expression profile in a mouse model of SCN8A encephalopathy. **Experimental Neurology**, v. 288, p. 134–141, fev. 2017.

SYRBE, S. et al. Phenotypic Variability from Benign Infantile Epilepsy to Ohtahara Syndrome Associated with a Novel Mutation in **SCN2A**. **Molecular Syndromology**, v. 7, n. 4, p. 182–188, 2016.

TAI, C. et al. Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of Dravet syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 30, p. 3139–3148, 2014.

TAN, N. N. et al. Epigenetic Downregulation of Scn3a Expression by Valproate: a Possible Role in Its Anticonvulsant Activity. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 2831–2842, 1 maio 2017.

TFELT-HANSEN, J. et al. Inherited cardiac diseases caused by mutations in the nav1.5 sodium channel. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 21, n. 1, p. 107–115, 2010.

THIJS, R. D. et al. Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689–701, fev. 2019.

TONIOLO, S.; ROMOLI, M.; SEN, A. Epilepsy in Older Persons. **Neurologic Clinics**, v. 40, n. 4, p. 891–905, nov. 2022.

TREPTOW, W.; KLEIN, M. L. Computer Simulations of Voltage-Gated Cation Channels. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 8, p. 1017–1023, 19 abr. 2012.

TRUJILLANO, D. et al. Clinical exome sequencing: Results from 2819 samples reflecting 1000 families. **European Journal of Human Genetics**, v. 25, n. 2, p. 176–182, 16 fev. 2017.

TRUMP, N. et al. Improving diagnosis and broadening the phenotypes in early-onset seizure and severe developmental delay disorders through gene panel analysis. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 5, p. 310–317, 1 maio 2016.

TSAI, C. et al. Two Alternative Conformations of a Voltage-Gated Sodium Channel. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 4074–4088, 2013.

VANOYE, C. G. et al. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. **Neurobiology of Disease**, v. 62, p. 313–322, fev. 2014.

VASCONCELOS, F. et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 85–92, 2005.

VEERAMAH, K. R. et al. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. **Epilepsia**, v. 54, n. 7, p. 1270–1281, jul. 2013.

VERBEEK, N. E. et al. Prevalence of SCN1A-Related Dravet Syndrome among Children Reported with Seizures following Vaccination: A Population-Based Ten-Year Cohort Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65758, 6 jun. 2013.

VERRET, L. et al. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 708–721, 2012.

WAGNON, J. L. et al. Pathogenic mechanism of recurrent mutations of SCN8A in epileptic encephalopathy. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 3, n. 2, p. 114–123, fev. 2016.

WANG, C. et al. Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 8, p. 2480–2485, 2001.

WANG, J. et al. Epilepsy-associated genes. **Seizure**, v. 44, p. 11–20, jan. 2017.

WEI, F. et al. Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 455–477, 9 ago. 2017.

WENGERT, E. R. et al. Biallelic inherited SCN8A variants, a rare cause of SCN8A - related developmental and epileptic encephalopathy. **Epilepsia**, v. 60, n. 11, p. 2277–2285, 17 nov. 2019.

WOLFF, M. et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. **Brain**, v. 140, n. 5, p. 1316–1336, 1 maio 2017.

YAN, Z. et al. Structure of the Na v 1.4-β1 Complex from Electric Eel. **Cell**, p. 1–13, 2017.

YANG, C. et al. Variable epilepsy phenotypes associated with heterozygous mutation in the SCN9A gene: report of two cases. **Neurological Sciences**, v. 39, n. 6, p. 1113–1115, 2 jun. 2018.

YE, M. et al. Differential roles of NaV1.2 and NaV1.6 in regulating neuronal excitability at febrile temperature and distinct contributions to febrile seizures. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 753, 15 dez. 2018.

YU, F. H. et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 1142–1149, 2006.

YUAN, R. et al. Two Novel SCN9A Gene Heterozygous Mutations May Cause Partial Deletion of Pain Perception. **Pain Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1510–1514, 2011.

ZAMAN, T. et al. Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. **Annals of Neurology**, v. 83, n. 4, p. 703–717, abr. 2018.

ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide

bridges. **IUBMB Life**, v. 57, n. 1, p. 13–21, 2005.

ZHANG, S. et al. Ion Channels in Epilepsy: Blasting Fuse for Neuronal Hyperexcitability. In: **Epilepsy - Advances in Diagnosis and Therapy**. [s.l.] IntechOpen, 2019. v. ip. 13.

ZHANG, S. et al. SCN9A Epileptic Encephalopathy Mutations Display a Gain-of-function Phenotype and Distinct Sensitivity to Oxcarbazepine. **Neuroscience Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 11–24, 1 jan. 2020a.

ZHANG, T. et al. Novel mutation of SCN9A gene causing generalized epilepsy with febrile seizures plus in a Chinese family. **Neurological Sciences**, v. 41, n. 7, p. 1913–1917, 15 jul. 2020b.

ZHAO, R. et al. Anticonvulsant effect of BmK IT2, a sodium channel-specific neurotoxin, in rat models of epilepsy. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 5, p. 1116–1124, jul. 2008.

ZHAO, R. et al. Anticonvulsant activity of BmK AS, a sodium channel site 4-specific modulator. **Epilepsy & Behavior**, v. 20, n. 2, p. 267–276, fev. 2011.

ZIOBRO, J. et al. Current Treatment Strategies and Future Treatment Options for Dravet Syndrome. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 20, n. 12, 2018.

ZUCCA, C. et al. Cryptogenic Epileptic Syndromes Related to SCN1A. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 4, p. 489, 1 abr. 2008.