



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA

FABIANA SILVA DOS SANTOS LINO

**PROSPECÇÃO DE NOVOS BLOQUEADORES DE CANAIS $K_v1.3$ NA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Hadrurus gertschi***

Uma nova perspectiva para o tratamento da esclerose múltipla

Fabiana Silva dos Santos Lino

**PROSPECÇÃO DE NOVOS BLOQUEADORES DE CANAIS K_v1.3 NA
PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Hadrurus gertschi***

Uma nova perspectiva para o tratamento da esclerose múltipla

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade de Brasília como requisito à
obtenção do título de bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth
Nogueira Ferroni Schwartz

Brasília, 27 de Junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz
(Orientadora)

Profa. Dra. Thalita Soares Camargos

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais e meu marido, pelo amor a mim dedicado e pelo apoio em todos os momentos de minha vida que culminaram neste;

À minha orientadora, Profa. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz, e à minha co-orientadora, Solange Rego, pelo acompanhamento, orientação e amizade;

À instituição de fomento que financiou esse trabalho, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Por fim, agradeço a todos os integrantes do grupo de pesquisa que me ajudaram, me apoiaram e sempre estiveram presentes em todas as etapas, nos bons e maus momentos;

RESUMO

Os escorpiões, presentes na terra há cerca de 430 milhões de anos, possuem na constituição de sua peçonha uma mistura altamente complexa de diversos compostos. Dentre eles estão as toxinas peptídicas, as quais, entre outros, ligam-se aos canais de K^+ e, em todas as identificadas em venenos escorpiônicos até o presente momento, bloqueiam o efluxo do íon e interferem na comunicação celular. Os canais de K^+ estão presentes em todos os seres vivos, sendo que nos humanos desempenham diversos papéis em processos fisiológicos, dentre eles na resposta imune. O canal voltagem-dependente $K_v1.3$ possui uma função crucial na proliferação de linfócitos autoreativos relacionados com doenças autoimunes, principalmente na esclerose múltipla, uma vez que, nos linfócitos contra a mielina, existe uma expressão aumentada desses. Uma vez que o tratamento atualmente utilizado gera uma imunossupressão generalizada, esse trabalho tem como objetivo identificar na peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi* peptídeos candidatos a bloqueadores do canal voltagem-dependente $K_v1.3$ como uma nova perspectiva para o tratamento da Esclerose Múltipla. Por meio de análises cromatográficas, em HPLC, e de massa molecular, em espectrômetro de massa molecular, foram identificados dois peptídeos, os quais, após sequenciamento, foram identificados como possivelmente o Hge024 e Hge024c, peptídeos oriundos do precursor HGE024|Contig2 previamente descrito no transcrito da glândula de peçonha desse escorpião. Como a diferença entre eles consiste somente na ausência ou presença de dois resíduos de aminoácidos N-terminais, é provável que o Hge024c consista de um peptídeo gerado após uma modificação pós-traducional de proteólise sofrida pelo Hge024. Assim, a expressão de dois peptídeos previamente previstos pela análise do transcrito da glândula de peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi* foi identificada no presente trabalho. Essas toxinas, as quais pertencem à subfamília de bloqueadores de canais de potássio α -KTx6, representam putativos candidatos no desenvolvimento de novos tratamentos para a esclerose múltipla.

Palavras chave: α KTx6, *Hadrurus gertschi*, Hge024, Hge024c, esclerose múltipla, toxinas escorpiônicas

ABSTRACT

Scorpions, present in the earth about 430 million years ago, have in the constitution of their venom a highly complex mixture of several compounds. Among them are the peptidic toxins, which, among others, bind to the K⁺ channels blocking the efflux of this ion and interfering in cellular communication. K⁺ channels are present in all living beings, and they play several roles in physiological processes, among them in the human immune response. The voltage-dependent K_v1.3 channel has a crucial role in the proliferation of autoreactive lymphocytes related to autoimmune diseases, especially in multiple sclerosis, since there is an increased expression of these channels in lymphocytes against myelin. Since the current treatment generates a generalized immunosuppression, this work aims to identify in the venom of the scorpion *Hadrurus gertschi* peptides candidates for blockers of the voltage-dependent channel K_v1.3 as a new perspective for the treatment of Multiple Sclerosis. Two peptides were identified through HPLC and mass spectrometric analysis, which, after sequencing, were identified as possibly the Hge024 and Hge024c, peptides derived from the HGE024|Contig2 precursor previously described in the transcriptome of the venom gland of this scorpion. As the difference between them consists only in the absence or presence of two N-terminal amino acid residues, it is probable that Hge024c consists of a peptide generated after a post-translational modification of Hge024 proteolysis. Thus, through this work the expression of two peptides previously only predicted by the analysis of the transcriptome in the scorpion *Hadrurus gertschi* was identified. These toxins, which belong to the α-KTx6 potassium-channel blocking subfamily, represent putative candidates in the development of novel treatments for multiple sclerosis.

Key words: α-KTx6, *Hadrurus gertschi*, Hge024, Hge024c, multiple sclerosis, scorpion toxins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. <i>Toxinas escorpiônicas</i>	7
1.1.1. <i>Componentes</i>	7
1.1.2. <i>Toxinas bloqueadoras de canais de K⁺</i>	9
1.2. <i>Escorpiões</i>	11
1.2.1. <i><u>Hadrurus gertschi</u></i>	12
1.3. <i>Canal de K⁺</i>	13
1.3.1. <i>Canal de K⁺ voltagem-dependente (K_v)</i>	13
1.3.2. <i>Canal K_v1.3</i>	15
1.4. <i>Linfócitos T</i>	15
1.4.1. <i>Ativação dos linfócitos T</i>	15
1.4.2. <i>Fenótipos diferenciados da expressão de canais de K⁺ em LT</i>	18
1.4.3. <i>Bloqueadores de K_v1.3 e imunossupressão</i>	18
1.5. <i>Esclerose múltipla</i>	19
1.5.1. <i>A Doença</i>	19
1.5.2. <i>Patogênese</i>	20
1.5.3. <i>Tratamento</i>	22
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.2. <i>Gerais</i>	26
3.3. <i>Específicos</i>	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. <i>Fracionamento e purificação dos peptídeos por meio de RP-HPLC.....</i>	27
4.2. <i>Espectrometria de massa molecular.....</i>	28
4.2.1. <i>Análises de massa molecular dos peptídeos.....</i>	28
4.2.2. <i>Sequenciamento dos peptídeos.....</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. <i>Obtenção dos peptídeos putativos oriundos do precursor HGE024</i>	30
5.2. <i>Sequenciamento dos peptídeos purificados</i>	42
6. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxinas escorpiônicas*

1.1.1. *Componentes*

Incidentes envolvendo escorpionismo representam, em vários países, um problema de saúde pública. No mundo, é registrado cerca de 1,4 milhão de picadas de escorpião por ano, resultando em cerca de 2600 mortes. Apesar de serem conhecidas 2231 espécies, apenas aproximadamente 30 são perigosas para os humanos (PRENDINI, 2011; CHIPPAUX, 2012). Estima-se que a maior incidência de picadas e óbitos ocorra na Ásia e norte da África (CHIPPAUX, 2012).

Milhões de anos de evolução e aperfeiçoamento da peçonha desses animais levaram à diversificação e seleção de proteínas com atividades enzimáticas e peptídeos específicos e seletivos que, em sua maioria, interferem na comunicação celular de suas vítimas levando a diversos efeitos, desde dor local à morte (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015; ORTIZ *et al.*, 2014). Um dos fatores determinantes para a gravidade do envenenamento é a presença de neurotoxinas, as quais podem bloquear ou modificar o funcionamento dos canais iônicos de células excitáveis, culminando em uma excitação autonômica (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013; ORTIZ *et al.*, 2014).

Cada escorpião possui, em sua peçonha, uma diversidade própria de componentes, sendo que eles podem variar, entre as espécies, de 72 a mais de 600 moléculas diferentes (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2007, OUKKACHE *et al.*, 2008; NEWTON *et al.*, 2007). A peçonha compreende uma mistura altamente complexa de diversos compostos, como enzimas, mucoproteínas, aminoácidos livres, nucleotídeos, aminas, lipídeos, componentes heterocíclicos, sais inorgânicos e peptídeos. Os últimos, denominados toxinas peptídicas, podem ser classificadas em peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBP) e peptídeos com pontes dissulfeto (DBP) (ZENG *et al.*, 2005; QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013); estes últimos, devido à sua relevância clínica e ação farmacológica sobre os canais iônicos, são os componentes escorpiônicos mais estudados (ORTIZ *et al.*, 2014).

As toxinas peptídicas que atuam sobre canais de Na⁺ apresentam entre 60 e 76 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, possuindo maior relevância

no envenenamento sobre mamíferos, incluindo os humanos. Toxinas que atuam em canais de K^+ , Cl^- e Ca^{2+} possuem na maioria cadeias mais curtas, de 29 a 41 resíduos de aminoácidos, com 3 a 4 pontes dissulfeto, e apresentam papel subsidiário nos envenenamentos, por meio de ações sinérgicas (ORTIZ *et al.*, 2014; POSSANI, 2000).

Esses compostos, após a síntese dos precursores na glândula de peçonha do escorpião, passam por transformações para a obtenção da molécula ativa (MARTIN-EAUCLEIRE *et al.*, 1922). No processo de maturação, o precursor tem o peptídeo sinal N-terminal clivado e, em alguns casos, podem ocorrer outras modificações pós-traducionais, como a remoção de resíduos C-terminais carregados positivamente, amidação C-terminal da glicina e conversão da glutamina N-terminal em piroglutamato (ZENG *et al.*, 2012; PISCIOTTA *et al.*, 2000; BAGDAANY, 2005).

Dentre os componentes peptídicos das peçonhas escorpiônicas, os principais encontrados e descritos são os que, ao se ligarem aos canais de Na^+ , modificam seu mecanismo de abertura e os que, ao se ligarem aos canais de K^+ , bloqueiam sua função (DE LA VEGA & POSSANI, 2004; DE LA VEGA & POSSANI, 2005; TYTGAT *et al.*, 1999). Além disso, a peçonha de escorpião representa a principal fonte de ligantes de canais de K^+ (KUZMENKOV *et al.*, 2015).

Entre as toxinas peptídicas, estão peptídeos que apresentam diversas funções, como: atividade antimicrobiana (Hadrurina, de *Hadrurus aztecus*) (TORRES-LARIOS *et al.*, 2000), anti-malária (Scorpina, de *Pandinus imperator*) (CONDE *et al.*, 2000), imunomoduladora (Vm24, de *Vaejovis mexicanus*) (VARGA *et al.*, 2012), anti-viral (Hp1090, de *Heterometrus petersii*) (Yan *et al.*, 2011) e potencializador de bradicinina (Peptídeo T, de *Tityus serrulatus*) (FERREIRA *et al.*, 1993;).

Os componentes obtidos das peçonhas de animais apresentam inúmeras atividades farmacológicas diferentes e, desta forma, podem ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos tratamentos de diversas enfermidades. Um exemplo é o captopril, um inibidor de enzima conversora de angiotensina derivado de um peptídeo da serpente *Bothrops jararaca*, e que é utilizado em todo o mundo para o tratamento de pacientes hipertensos (CAMARGO *et al.*, 2012). Assim sendo, devido à extensa variedade de componentes presentes na peçonha de escorpiões, esse representa um tesouro de putativos produtos farmacêuticos, devendo então, serem estudados e analisados (ORTIZ *et al.*, 2014).

1.1.2. Toxinas bloqueadoras de canais de K⁺

Existem diversos grupos de ligantes de canais de K⁺, porém, os três principais são os íons metálicos, as pequenas moléculas orgânicas e as toxinas polipeptídicas (HAGIWARA *et al.*, 1976; ROBERTSON & STEINBERG, 1990; MOCZYDLOWSKI *et al.*, 1988). Os primeiros, como o Cs⁺, Ba²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Co²⁺ e Ni²⁺, inibem de forma não seletiva e em concentrações milimolares tais canais (WULFF *et al.*, 2009). Os segundos, como a 4-aminopiridina (4-AP) e tetraetilamônio (TEA), inibem esses canais, também em concentrações milimolares, sem interferir significativamente nos canais de Ca²⁺ e Na⁺ (SHEN *et al.*, 1994; ZHENG & ZHANG, 1986). Já as toxinas polipeptídicas possuem alta seletividade e especificidade e podem atuar em baixas concentrações (de pM a μM) (KUZMENKOV *et al.*, 2015; GIANGIACOMO *et al.*, 2004).

Pode-se classificar os ligantes de canais de K⁺ como bloqueadores, os quais se ligam à região do poro impedindo a passagem do íon, e os moduladores, os quais se ligam a outras regiões afetando as propriedades funcionais do canal (MACKINNON & MILLER, 1989; SWARTZ, 2007). Entretanto, até o presente momento, todas as toxinas escorpiônicas descritas com atividade sobre canal de K⁺ são do tipo bloqueadora de poro (KUZMENKOV *et al.*, 2015).

As toxinas escorpiônicas bloqueadoras de canais de K⁺ (KTx's) afetam de forma predominante os canais de K⁺ dependentes de voltagem (K_v) e podem ser classificadas em cinco grupos de acordo com sua estrutura (KUZMENKOV *et al.*, 2015): peptídeos com α-hélice e folha-β estabilizadas por pontes dissulfeto (CSαβ) (MOUHAT *et al.*, 2004); peptídeos com duas α-hélices paralelas conectadas com duas pontes dissulfeto (CSα/α2(C-C)) (SRINIVASAN *et al.*, 2002); peptídeos com hélice-loop-hélice estabilizado com cisteína (CS α/α2) (SAUCEDO *et al.*, 2012); KTx com dobra do tipo Kunitz-type (CHEN *et al.*, 2012); e Ktx com dobra de nó inibidora de cistina (CHEN *et al.*, 2011).

Os membros do grupo CSαβ, os quais são os mais potentes e abundantes na peçonha de escorpiões apresentam, em sua sequência, dois motivos conservados, o CXXXXXC e CXC, no qual C representa uma cisteína e X qualquer resíduo de aminoácido (Figura 1) (KUZMENKOV *et al.*, 2015).

```

Hge024      ETLFTANCLDRKDCCKKHCKS-KGCKEMKCEQIIKPTWRCLCIMCSK
HsTX1      -----ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNR-----KCKCNRC--
HgeTx      ---TGTSCLISPKQCTEPCRA-KGCKHGKCMNR-----KCHCMLCL-
Anuroctoxin ---OKECTGPOHCTNFCRK-NKCTHGKCMNR-----KCKCFNCK-

```

FIGURA 1. Alinhamento da sequência primária de toxinas peptídicas bloqueadoras de canais de K⁺. Em destaque, encontra-se os motivos conservados CXXXXXC e CXC presentes nos peptídeos bloqueadores de canais de K⁺.

Além desses motivos, muitas KTx's possuem a "díade funcional" que, devido a sua interação com o canal, leva ao bloqueio de fluxo de íons K⁺ (DAUPLAIS *et al.*, 1997). Essa díade apresenta dois resíduos conservados: uma lisina e uma tirosina, fenilalanina ou leucina (DAUPLAIS *et al.*, 1997; SHAKKOTTAI *et al.*, 2001; GASPARINI *et al.*, 1998). O resíduo de lisina contém uma cadeia lateral positivamente carregada que entra no poro, em uma região circundada por quatro resíduos de aspartato ou glutamato carregados negativamente, um de cada subunidade do canal, e impede o fluxo do íon. Já os outros três resíduos parecem participar da formação do complexo toxina-canal (KUZMENKOV *et al* 2015). Porém, o modelo dessa interação carece de esclarecimentos, uma vez que algumas toxinas, embora não possuam tal díade, apresentam alta afinidade para isoformas específicas de canais de K⁺ (BATISTA *et al.*, 2002).

As KTx's com motivo CS $\alpha\beta$ são classificadas, de acordo com sua estrutura e propriedades funcionais, nas famílias α -KTx, β -KTx e γ -KTx. As β -KTx's possuem, devido a um fragmento N-terminal linear, cadeias longas com 45 a 68 resíduos de aminoácidos e seis cisteínas na porção C-terminal, responsáveis pela formação de três pontes dissulfeto. Já as γ -KTx's, que apresentam atividade seletiva para canais da família K_v1.1, possuem de 35 a 45 resíduos de aminoácidos com três a quatro pontes dissulfeto (DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2007a; KUZMENKOV *et al*, 2015).

Considerada a maior família de KTx's, com cerca de 160 peptídeos contidos em 31 subfamílias, as α -KTx's possuem de 23 a 42 resíduos de aminoácidos e, assim como as γ -KTx's, de três a quatro pontes dissulfeto (UNIPROT, 2017a; DE LA VEJA & POSSANI, 2004). Pertencente à essa família, a Hge024, que teve a sequência de seu precursor, HGE024|Contig2 (Figura 2), descrita por meio da obtenção e análise do transcriptoma da glândula de peçonha do escorpião *H. gertschi*, apresenta resíduos de aminoácidos em posições similares aos membros da subfamília α -KTx6 (Figura 3), sendo assim, classificada como tal (SCHWARTZ *et al.*, 2007).

- A. ATGAATACAAAAGTTGTCTTAATCATGTTGATGATCACTTCAGTGATTCTGGTTGTTGAA
GCAGAAACCCCTTTTACTGCCAATTGCCTCGATCGCAAAGATTGTAAAAACATTGCAAA
TCTAAAGGATGTAAGGAAATGAAATGCGAGCAAATAATTAACCAACTTGGCGTTGTCTC
TGTATCATGTGCAGTAAATAAGACACCCTAACAACTCCTTGCAATATTAATATGTACCGG
TGTTAAAAAGAATTGAATAAAGAATATTGTTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
- B. MNTKVVLIIMLITSVILVVEAETLFTANCLDRKDCKKHCKSKGCKEMKCEQIIKPTWRCL
CIMCSK

FIGURA 2. Sequências do precursor HGE024|Contig2 (A). Sequência de cDNA. (B) Sequência de resíduos de aminoácidos do transcrito.

Hge024	-ETLFTANCLDRKDCKKHCKSKGCKEMKCEQIIKPTWRCLCIM-CSK-
HgeTx1	----TGTSCISPKQCTEPCRAK-GCKHGKCMN-----RKCHCML-CL--
AnurocTx	-----QKECTGPGHCTNFCRKNK-CTHGKCMN-----RKCKCFN-CK--
OcKTx1	---AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMN-----RTCRCNR-C---
OcKTx2	---AEVIKCRTPKDCADPCRKQTGCPHGKCMN-----RTCRCNR-C---
OcKTx3	---AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHAKCMN-----KTCRCHR-C---
OcKTx4	---AEIIRCSGTRECYAPCQKLTGCLNAKCMN-----KACKCYG-CV--
OcKTx5	---AEVIRCSGSKQCYGPKQQTGCTNSKCMN-----CKCYG-C---
Spinoxin	-----IRCSGSRDCYSPCMKQTGCPNAKCIN-----KSCKCYG-C---
Pi1	-----VKCRGTSDCGRPQQQTGCPNSKCIN-----RMCKCYG-C---
MaurTx	-----VSTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCIN-----KSCKCYG-C---
HsTx1	-----ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMN-----RKCKCNR-C---
Pi4	---IEAIRCSGSRDCYRCPQKRTGCPNAKCIN-----KTCKCYG-CS--
Pi7	---DEAIRCTGTKDCYIPCRYITGCFNSRCIN-----KSCKCYG-CT--
IsTx	--VHTNIPCRGTSDCYEPCEKKTNCARAKCMN-----RHCNCYNNCPW-

FIGURA 3. Alinhamento da toxina Hge024 a outras toxinas pertencentes à subfamília α -KTx6. Observe que a Hge024 possui identidade em diversos resíduos de aminoácidos, em destaque, com os peptídeos pertencentes à essa subfamília.

1.2. Escorpiões

Dentre os exemplares mais antigos da classe Arachnida, encontram-se os pertencentes à ordem Scorpiones, a qual está presente na terra há aproximadamente 430 milhões de anos (DUNLOP & SELDEN, 2013; WADDINGTON *et al.*, 2015). Isso se deve, dentre outros fatores, à produção de potentes peçonhas utilizadas para proteção, contra predadores ou concorrentes, e predação, para paralisar ou matar suas presas (ORTIZ *et al.*, 2014).

Mesmo mantendo quase inalterados sua morfologia e o plano terrestre, os membros dessa ordem foram capazes de colonizar diversos ecossistemas, como, por exemplo, cavernas profundas, altos picos e dunas e desertos com temperaturas elevadas (BRIGGS, 1987; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, 2014; OCHOA *et al.*, 2011;

WILLIAMS, 1980; ZEH, 1990). Dessa forma, eles se encontram distribuídos em todo o globo terrestre, exceto em algumas ilhas oceânicas, regiões polares e Antártida (PRENDINI, 2005a), sendo que a diversidade diminui em áreas equatoriais e aumenta nas subtropicais (ZEH, 1990).

A sistemática e taxonomia dos escorpiões vêm mudando, porém, até o ano de 2015, eram reconhecidas 2231 espécies contidas em 208 gêneros de 20 famílias. Somente no México, é possível encontrar, respectivamente, 821 (36%), 38 (18%) e 8 (12%), o que representa 12% da diversidade mundial. Desta forma, a diversidade de escorpiões mexicanos tem sido reconhecida (PRENDINI 2011; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ *et al*, 2015).

A ordem Scorpiones possui 20 famílias, dentre elas a Caraboctonidae Kraepelin, 1905 (PRENDINI & WHEELER, 2005), que inclui os maiores escorpiões da América do Norte, chegando a 150 mm, e que possui dois gêneros, *Caraboctonus* (Pocock, 1893) e *Hadrurus* (Thorell, 1876), sendo que o último contém 8 espécies, entre as quais, *Hadrurus gertschi* (Soleglad, 1976) (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ *et al*, 2015; UNIPROT, 2017b; SOWLEGLAD & FET, 2003).

1.2.1. *Hadrurus gertschi*

O escorpião *Hadrurus gertschi*, endêmico no México, ocorre predominantemente no estado de Guerrero, possui hábitos subterrâneos, vivendo, assim, em túneis escavados no solo (SCHWARTZ *et al.*, 2007). Essa espécie de aracnídeo não oferece risco aos humanos, uma vez que os escorpiões que o fazem pertencem à família Buthidae (CHIPPAUX & GOYFFON, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 2007).

Da peçonha do *H. gertschi* já foram isoladas e identificadas algumas toxinas, como a HgeTx1, pertencente à subfamília α -KTx6, uma toxina bloqueadora de canais de K⁺ do tipo Shaker B, de insetos, e Kv1.3, de mamíferos (SCHWARTZ *et al.*, 2007 SCHWARTZ *et al.*, em elaboração). Foi descoberta, também, a Hadrucalcina, um peptídeo com potencial farmacológico no tratamento de doenças arritmogênicas devido a sua ação ativadora sobre receptores de rianodina (SCHWARTZ *et al.*, 2009); e a Hadrurina, um NDBP que possui atividade antimicrobiana e citolítica sobre, ao menos, seis cepas bacterianas (TORRES-LARIOS *et al.*, 2000).

1.3. Canal de K^+

Os canais de K^+ , encontrados em todos os organismos vivos, de bactérias a animais multicelulares, são uma superfamília de proteínas transmembrânicas que permitem o transporte seletivo de K^+ , de forma passiva, através da membrana celular (KUZMENKOV *et al.*, 2015). Seus membros desempenham papéis cruciais em diversos processos fisiológicos por meio de regulação celular, como, por exemplo, na frequência cardíaca, secreção de insulina, excitabilidade neuronal, contração do músculo liso, regulação do volume celular, liberação de neurotransmissores e resposta imune (SHIEH *et al.*, 2000).

Conforme a estrutura de suas subunidades, eles podem ser subdivididos, em humanos, em cinco grupos: canais de K^+ retificadores internos (K_{ir}), canais de K^+ de dois domínios de poros (K_{2P}), canais de K^+ voltagem-dependentes (K_v) e canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutâncias grandes, intermediárias e pequenas ($BKCa$, $IKCa$ e $SKCa$, respectivamente) (KUZMENKOV *et al.*, 2015).

1.3.1. Canais de K^+ voltagem-dependente (K_v)

Os canais de K^+ voltagem-dependentes são, nos humanos, os mais abundantes dentre os 78 canais de K^+ descritos (IUPHAR/BPS, 2016; GUTMAN *et al.*, 2005). Sendo que, devido a sua ampla ocorrência, diversidade funcional e envolvimento em vários estados patológicos, esses representam um alvo farmacológico de grande relevância para o desenvolvimento de novos medicamentos (LEWIS & GARCIA, 2003; KUZMENKOV *et al.*, 2015).

Essas proteínas transmembrânicas são compostas por subunidades α e β , nas quais a primeira determina a estrutura e as principais funções e a segunda afeta a cinética do canal (KUZMENKOV *et al.*, 2015). Sua estrutura (Figura 4) é formada por quatro subunidades α , que são compostas por 6 segmentos α -hélices (S1 a S6) conectados por alças intra e extracelulares, com a região do poro condutor situada entre S5 e S6 e o sensor de voltagem, principalmente, no segmento S4 (SHIEH *et al.*, 2000; PANYI *et al.*, 2005). Já a subunidade β , quando co-expressa, representa uma proteína citoplasmática ligada à porção N-terminal da subunidade α (SHIEH *et al.*, 2000). NH_3^+

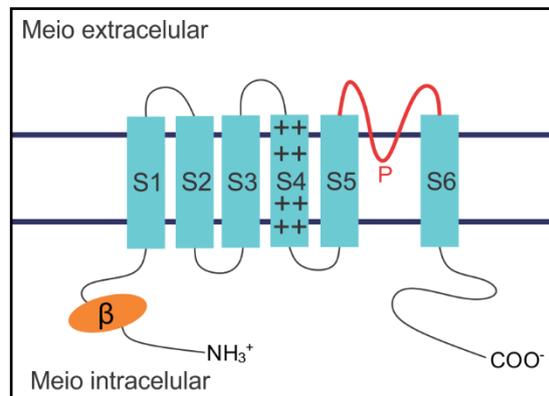


FIGURA 4. Canal de K⁺ voltagem-dependente. Representando a subunidade α, os segmentos transmembranares S1 à 6 (em azul) e a alça responsável pela formação do poro (P) (em vermelho), e a subunidade β (em laranja). No segmento S4 está presente o sensor de voltagem, o qual é constituído por resíduos de aminoácidos positivamente carregados, os quais são responsáveis pela abertura do poro e a consequente passagem dos íons. (Baseado em SHIEH *et al.*, 2000).

O poro de condução do íon (P), que permite um fluxo de K⁺ de 10⁶ a 10⁸ íons/segundo, possui como elementos estruturais principais o filtro de seletividade, próximo à região extracelular, uma cavidade com água e a porta de ativação, voltado para a região intracelular, formada pelo encontro dos segmentos transmembrânicos S6 das quatro subunidades (CORRY *et al.*, 2011; DOYLE *et al.*, 1998). O filtro de seletividade contém uma sequência de assinatura altamente conservada, TTVGYGD, a qual, por meio dos oxigênios das carbonilas criticamente localizadas, substituem a camada de água dos íons K⁺, estabilizando-os, e os conduzindo pelo poro, onde, ao chegar na cavidade aquosa do canal, são reidratados e adentram no citoplasma (DOYLE *et al.*, 1998; HEGINBOTHAM *et al.*, 1994; MACKINNON, 2003).

Já o sensor de voltagem, essencial para a resposta do K_v às alterações no potencial da membrana, é composto principalmente pelo segmento transmembrânico S4 (KUZMENKOV *et al.*, 2015). Esse possui, aproximadamente, a cada três posições, lisinas ou argininas, resíduos de aminoácidos positivamente carregados, resultando em um posicionamento espacial regular das cargas positivas no segmento (MANNUZZU *ET AL.*, 1996). Quando ocorre um aumento no potencial de membrana, ainda que pequeno, as cargas positivas do S4 de todas as quatro subunidades α interagem com resíduos de aminoácidos próximos, do segmento S5, levando a alterações conformacionais que resultam na abertura do poro e na passagem do íon

(SIGWORTH, 1994; BENZANILLA, 2000; ZAGOTTA, 1994; SCHOPPA *et al.*, 1992; MANNUZZU *et al.*, 1996).

Nos canais K_v ativados, podem ocorrer, no vestíbulo externo do poro e na região próxima ao S6, dois tipos de inativação, a rápida, por meio do tipo N, e a lenta, pelo tipo P/C (DEMO & YELLEN, 1991; HOSHI *et al.*, 1991). No tipo N, o poro é bloqueado pela região intracelular por um fragmento N-terminal da subunidade α ainda com o canal no estado aberto (DEMO & YELLEN, 1991). Já na lenta, decorrente da despolarização, ocorre um colapso ou constrição do filtro de seletividade por meio de duas etapas conformacionais sequenciais (LIU *et al.*, 1996, LOOTS & ISACOFF, 1998 DE BIASI *et al.*, 1993, OCLESE *et al.*, 1997, YANG *et al.*, 1997, HARRIS *et al.*, 1998). Na inativação do tipo P, a primeira etapa, ocorre o colapso do filtro de seletividade levando a uma alteração da permeabilidade ao íon e ao fechamento da extremidade intracelular do canal (STARKUS *et al.*, 1997). Essa é seguida pelo tipo C, a segunda etapa, na qual o estado não condutor é estabilizado por alterações conformacionais adicionais na região do poro e do sensor de voltagem (OCLESE *et al.*, 1997).

1.3.2. Canais $K_v1.3$

Os canais voltagem-dependentes pertencentes à subfamília 1.3 ($K_v1.3$) são expressos no rim, pulmão, cérebro, linfa, medula espinhal e, de forma predominante, em linfócitos humanos (COETZEE *et al.*, 1999; SHIEH *et al.*, 2000).

Tais canais, após a despolarização da membrana entre -40 e -30mV, abrem-se rapidamente, seguido de um pequeno incremento na corrente de K^+ e, após atingir de -60 a -70mV, uma lenta e prolongada despolarização (PANYI, 2005). Essa inativação lenta decorre da ausência da bola N-terminal responsável pelo tipo-N, dessa forma, esse canal é inativado somente pelo mecanismo P/C (PANYI, 2005).

1.4. Linfócitos T

1.4.1. Ativação dos linfócitos T

Para que a resposta imune ocorra de forma eficiente é indispensável a expansão clonal dos linfócitos T (LT) que reconhecem, de forma específica, o antígeno imunogênico. Para tanto, é necessária a interação entre o antígeno, que está acoplado ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC) da célula apresentadora de

antígeno (APC) e o complexo de receptores TCR/CD3. Essa interação leva à ativação de diversas vias de sinalização transmembranares relacionadas com tirosina-kinases não receptoras, as quais desencadeiam diversos processos intracelulares (PANYI, 2005).

Dentre as vias de ativação envolvidas na proliferação dos linfócitos, destaca-se a via de ativação da fosfolipase C- γ (PLC- γ), a qual cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, um fosfolípido de membrana, em dois compostos, o diacilglicerol e o 1,4,5-inositol trifosfato (IP3). O primeiro leva, por meio da proteína kinase θ , à ativação da via da proteína kinase C (PKC), que fosforila diversos substratos citosólicos, ativando o fator de transcrição NF κ B, o qual desencadeia a transcrição de genes específicos (PANYI, 2005).

O IP3, por sua vez, é responsável pelo aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citosol (PANYI, 2005). Esse composto é capaz de ligar-se a receptores específicos no retículo endoplasmático e liberar o estoque intracelular de Ca^{2+} no interior do LT (LEWIS, 2001). Uma vez que a reserva do íon se extingue, são ativados canais iônicos de membrana específicos para Ca^{2+} , o canal de Ca^{2+} ativado por liberação de cálcio (CRAC), o qual levará ao influxo do íon e ao aumento de sua concentração intracelular (ZWEIFACH & LEWIS, 1993). Com o incremento da quantidade do íon, ele liga-se à calmodulina, formando o complexo calmodulina- Ca^{2+} , o qual ativa a calcineurina fosfatase dependente de calmodulina- Ca^{2+} , que desfosforila o fator de transcrição NF-AT. Esse, ao se acumular no núcleo, liga-se ao promotor gênico da interleucina-2 (IL-2), a qual é transcrita e leva à proliferação do LT mesmo na ausência do antígeno (Figura 5) (PANYI, 2005).

Porém, para que ocorra o influxo de Ca^{2+} através do CRAC e a consequente indução da expansão clonal do LT, é necessária a manutenção do potencial de membrana. Uma vez que, após abertos, a corrente de íons através do CRAC é determinada pela força do gradiente eletroquímico, de forma que a magnitude do influxo será influenciada pelo potencial da membrana (ZWEIFACH & LEWIS, 1993). Assim sendo, para que a força eletromotriz seja mantida e a concentração intracelular de Ca^{2+} aumente, a despolarização causada pela entrada do íon através do CRAC deve ser neutralizada pela saída de cátions por meio de canais de K^+ (Figura 5) (CAHALAN *et al.*, 2001; PANYI, 2004).

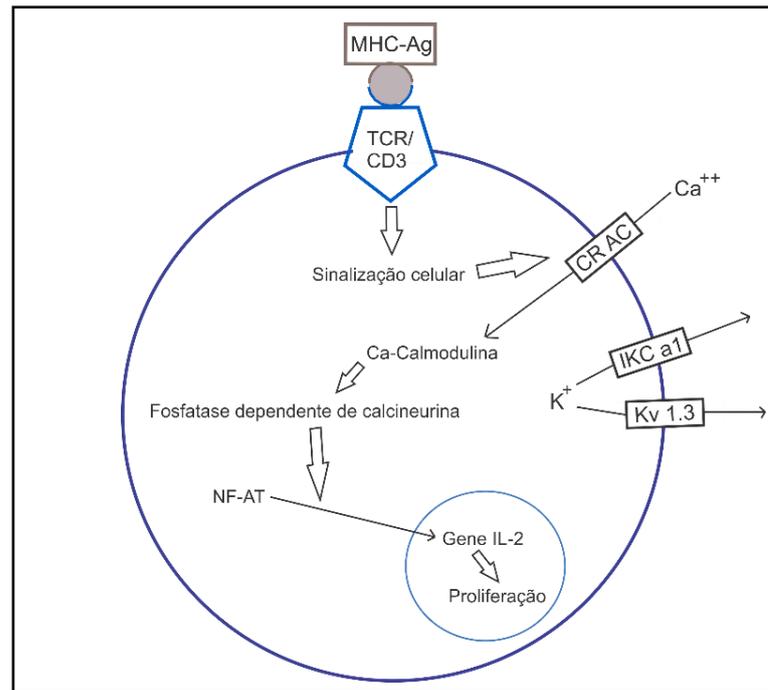


FIGURA 5. Vias de sinalização para ativação do Linfócito T. No qual, através da cascata de fosforilação e consequente sinalização celular gerada pela ligação do complexo antígeno-MHC ao receptor TCR/CD3, ativa-se os canais CRAC na membrana do linfócito, levando ao influxo de Ca^{2+} , o qual liga-se à calmodulina, que ativa a enzima fosfatase dependente de calmodulina, ativa o fator de transcrição NF-AT e leva à expressão dos genes da IL-2 e à proliferação celular. Porém, para que o influxo do cátion seja mantido, é necessário manter o potencial de membrana, para isso, são ativados os canais de K^+ , IKCa1 e $\text{K}_v 1.3$, através dos quais ocorre o efluxo de K^+ , mantendo a manutenção do influxo de Ca^{2+} e a decorrente ativação dos linfócitos. (Baseado em PANYI, 2005)

Devido à relação entre a magnitude da corrente de Ca^{2+} pelo CRAC e a manutenção do potencial de membrana pelo canal de K^+ , a proliferação dos LT é passível de interferência farmacológica por meio de moléculas que interajam com os canais de K^+ (PANYI, 2005).

Dois canais são responsáveis pela determinação do potencial de membrana dos linfócitos T, o canal de K^+ voltagem-dependente 1.3 ($\text{K}_v 1.3$) e o canal de K^+ ativado por Ca^{2+} 1 (IKCa1) (GRISSMER *et al.*, 1993; MATTESON & DEUTSCH, 1984; DE COURSEY *et al.*, 1984).

Entretanto, a contribuição de cada canal difere entre subtipo e estado de ativação do LT, sendo que, no estado de repouso dessas células, o controle sobre a condutância de K^+ é realizado pelo $\text{K}_v 1.3$, uma vez que são expressos aproximadamente de 200 a 300 canais por célula em contraste com os menos de 30 de IKCa1 (PANYI, 2004; CAHALAN *et al.*, 2001; PANYI, 2005).

Após a ativação do LT pela APC, o fenótipo de canais iônicos é alterado de forma que a expressão de IKCa1 aumenta para cerca de 500 canais por célula e o de Kv1.3 é alterado em menor magnitude, apenas 1,5 vezes (GHANSHANI *et al.*, 2000).

1.4.2. Fenótipos diferenciados na expressão de canais de K⁺ em LT

A descoberta de um novo subtipo de linfócito T, a célula efetora de memória (TEM), a qual está relacionada com o desenvolvimento de doenças autoimunes, impactou de forma significativa os estudos de seletividade e afinidade de inibidores de Kv1.3 (WULFF *et al.*, 2003).

Isso se deve à diferença no fenótipo de canais de K⁺ no TEM e nas células naive e efectoras centrais (TCM). O primeiro, como não necessita se dirigir aos órgãos linfoides para ser ativado pela APC, é responsável pela execução de funções efectoras imediatas em órgãos periféricos por meio da citotoxicidade imediata e liberação de citocinas (WULFF *et al.*, 2003; PANYI, 2005). Já a segunda e a terceira, as quais necessitam de ativação em órgãos linfoides, são, respectivamente, células ainda não-ativadas pela APC e células estagnadas em estágios intermediários anteriores à TEM (SALLUSTO *et al.*, 2004).

Os LT naives e TCMs, após ativação pelo antígeno, apresentam o fenótipo de Kv1.3 baixo e IKCa1 alto, uma vez que ocorre um aumento mais significativo da expressão de IKCa1, para mais de 30000 canais por célula, e um baixo aumento de Kv1.3. Em contrapartida, o fenótipo apresentado pelas TEM possui características opostas, Kv1.3 alto e IKCa1 baixo, uma vez que ocorre um incremento elevado da expressão de Kv1.3 na membrana, para cerca 1500 canais por célula, e a manutenção da expressão de IKCa1, o qual se mantém constante (WULFF *et al.*, 2003).

1.4.3. Bloqueadores de Kv1.3 e imunossupressão

Em 1984, Decousey e colaboradores propuseram que os canais voltagem-dependentes seriam alvos para a imunossupressão, uma vez que a 4-aminopiridina, uma bloqueadora de K_v, inibiu a proliferação de LT e a secreção de IL-2 (DE COURSEY *et al.*, 1984; SHEN *et al.*, 1994). Por meio da análise posterior da atividade da margatoxina, uma toxina escorpiônica bloqueadora de Kv1.3, essa hipótese foi

confirmada, uma vez que ela foi capaz de suprimir uma resposta imune *in vivo*, a hipersensibilidade do tipo tardio (KOO *et al.*, 1997).

Além disso, já foi descrito que a despolarização causada pelos bloqueadores de K_v1.3 diminui o influxo de Ca²⁺ e inibe a proliferação dos LT, assim como gera imunossupressão *in vivo* (CAHALAN & CHANDY, 1997).

Nos últimos anos, vários estudos foram dedicados ao assunto, nos quais foi demonstrada a melhora nos sintomas de doenças autoimunes em modelos animais experimentais e a atividade de prevenção de reação de hipersensibilidade tardia (BEETON *et al.*, 2001a, 2001b, 2006; VALVERDE *et al.*, 2004).

Da peçonha de escorpiões, já foram isolados diversos peptídeos com potente atividade bloqueadora de canais K_v1.3 (SHIEH *et al.*, 2000), como a Vm24, que possui atividade em concentrações na ordem de picomolar (K_d de 2,9 pM) (VARGA *et al.*, 2012). Essa toxina, em concentrações picomolares, foi capaz de atenuar as reações de hipersensibilidade tardias *in vivo* e inibir a sinalização por Ca²⁺ e a proliferação de LT humanos *in vitro*. Assim sendo, esse peptídeo representa um potencial composto para a terapêutica de esclerose múltipla, artrite reumatoide, psoríase, diabetes do tipo 1, entre outras doenças autoimunes mediadas por LT (VARGA *et al.*, 2012).

Dessa forma, as toxinas peptídicas escorpiônicas demonstram-se promissoras para o desenvolvimento de biofármacos com o objetivo de tratar doenças autoimunes (QUINTERO-HERNÁNDEZ, 2013).

1.5. Esclerose múltipla

1.5.1. A Doença

Encontrada em 2,3 milhões de pessoas, em todas as regiões do mundo, a Esclerose Múltipla (EM), uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso central (SNC), possui a maior prevalência dentre as deficiências neurológicas, chegando, em alguns locais, a 120 casos a cada 100.000 pessoas (GHASEMI *et al.*, 2016; HOLLOWMAN *et al.*, 2013; MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION, 2013). Além disso, ela acomete com maior frequência as mulheres (KHAN *et al.*, 2008).

Essa enfermidade decorre de infiltrações focais de LT e macrófagos e da morte de oligodendrócitos, as quais levam à destruição da bainha de mielina e à formação de zonas multifocais de inflamação (LOMA & HEYMAN, 2011). A partir desse

processo, desenvolvem-se placas de células inflamatórias e seus produtos no SNC, morte de astroglia e axônios transecionados e dismielinizados tanto na massa cinzenta quanto na branca (COMPSTON & COLES, 2002). Conseqüentemente, tais lesões podem prejudicar as transmissões nervosas, desencadeando uma disfunção neuronal, como problemas emocionais, distúrbios visuais, fadiga, ataxia e defeitos autonômicos e sensoriais (COMPSTON & COLES, 2002).

Uma vez que essa doença pode afetar qualquer região cerebral, os seus sintomas neurológicos são incertos, imprevisíveis e vastos (GHASEMI *et al.*, 2016). Alguns dos sintomas primários mais comuns são distúrbios sensoriais, como dormência e prurido, disfunção intestinal e urinária, deficiência cognitiva e emocional, como depressão, dificuldade de andar, problemas de visão, tonturas e problemas sexuais. Já os secundários são depressão, complicações psicológicas e sociais, inatividade, imobilidade e infecções do trato urinário. Os terciários, por sua vez, consistem em implicações sociais, depressão e complicações profissionais e psicológicas (GELFAND *et al.*, 2014).

1.5.2. Patogênese

A patogênese da EM ainda não foi completamente elucidada, entretanto, a proposta aceita atualmente indica que essa doença afeta indivíduos com predisposição genética que foram afetados por algum patógeno (KENEALY *et al.*, 2003).

A combinação da predisposição genética com influências ambientais representa um importante papel do desenvolvimento da EM (GHASEMI *et al.*, 2016). Dentre os fatores ambientais, pode-se citar a exposição à radiação UV, hábito de fumar, dieta, deficiência de vitamina e exposição a vírus e bactérias, como o Epstein Barr, Herpesvírus Humano tipo 6 e *Mycoplasma pneumoniae* (SLOKA *et al.*, 2011; O'GORMAN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2000; BÄÄRNHIELM *et al.*, 2014; FUJINAMI *et al.*, 2006; SPEER, 2013).

Os agentes exógenos podem conter antígenos nucleares homólogos estruturalmente aos componentes da bainha de mielina, de forma que as células imunitárias são ativadas e decorre-se as lesões (GHASEMI *et al.*, 2016).

Muitos estudos propõem que as células T auxiliares (Th), os LT CD4+, desempenham um papel crucial na iniciação e progressão da EM (KASPER &

SHOEMAKER, 2010). As moléculas associadas aos agentes externos ligam-se a receptores tipo toll em APCs e levam à produção de interleucinas específicas (IL-12, 23 e 4). Essas, por sua vez, induzem a diferenciação do LT CD4+ em Th1, Th2 ou Th17, as quais liberarão citocinas específicas (KASPER & SHOEMAKER, 2010).

A célula Th1 produz interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que representam citocinas pró-inflamatórias importantes tanto para a resposta imune inata quanto para a adaptativa (SCHOENBORN & WILSON, 2007). Além disso, essas citocinas são capazes de promover a inflamação por meio da supressão da diferenciação da Th2, uma célula que secreta citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e 13 (SCHOENBORN & WILSON, 2007; ZHU & PAUL, 2008; MINTY *et al.*, 1993). Já a Th17, assim como a Th1, produz citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17, 21, 22 e 26 (OUYANG *et al.*, 2008).

Outros fatores podem estar presentes na patogênese da EM, como o linfócito B (LB), o qual libera fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e TNF- α , citocinas que promovem a inflamação. Além disso, essa célula também produz a IL-10, uma molécula antiinflamatória, de forma que o LB apresenta impactos positivos e negativos sobre desenvolvimento da doença (DUDDY *et al.*, 2007).

Os LT CD8+, os quais já foram encontrados em lesões de EM, levam à supressão e inativação de LT CD4+, destruição das células da glia, aumento da permeabilidade vascular e morte de oligodendrócitos, a qual prejudica a reparação e síntese da bainha de mielina (KOUCHAKI *et al.*, 2014; KASPER & SHOEMAKER, 2010).

Além disso, funcionalmente, os LT específicos de mielina encontrados em lesões de EM consistem em TEM terminalmente diferenciados (KIVISÄKK *et al.*, 2004). Wulff e colaboradores, em 2003, demonstraram que, sobre estimulação aguda *in vitro* com o antígeno da mielina, o TEM reativo à mielina isolado de pacientes portadores da EM apresentam a expressão de Kv1.3 seletivamente aumentada, levando ao fenótipo Kv1.3 alto e IKCa1 baixo (WULFF *et al.*, 2003).

Beeton e colaboradores, em 2003, proporcionaram importantes correlações entre a expressão de canais iônicos em TEM e a patogênese da EM. A primeira delas mostra que, por meio do estímulo com antígenos irrelevantes (insulina, ovoalbumina ou mitógenos convencionais), os LT de pacientes portadores da EM não expressaram o fenótipo Kv1.3 alto e IKCa1 baixo. Já na segunda delas, os LT *short-term* ativados pelo antígeno de mielina expressam uma quantidade significativamente mais elevada

de Kv1.3 que as células de controles saudáveis. Na terceira, por sua vez, células TEM de controle saudáveis adquiriram tal fenótipo ao serem estimuladas repetidamente (7 a 10 vezes) por antígenos mielínicos. Na última, em um modelo de rato para a EM, o de encefalomielite autoimune experimental (EAE), foram encontradas células T com fenótipo semelhante ao acima citado (BEETON *et al.*, 2001a, BEETON *et al.*, 2001b).

1.5.3. Tratamento

O tratamento hoje preconizado (GHASEMI *et al.*, 2017) para a fase inicial da EM é baseado em fármacos modificadores da doença, como o interferon- β e o acetato de glatirâmer (DE ANDRÉS, *et al.*, 2007; HAAS *et al.*, 2009). Seu objetivo é o alívio dos sintomas, uma vez que esse não é capaz de inibir a neurodegeneração em curso (KHAN *et al.*, 2008).

Entretanto, os medicamentos atualmente utilizados, ao invés de regular especificamente as células imunitárias alvo, suprimem a resposta imune de forma geral. Tal propriedade acarreta o desenvolvimento de infecções oportunistas e, como consequência, complicações para os pacientes (AHMED & TERUNA, 2012).

No Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla, publicado pelo Ministério da Saúde, são recomendados sete fármacos (BRASIL, 2015):

- Beta interferona e Glatirâmer: Consistem em imunomoduladores utilizados como um dos fármacos de primeira escolha. Esses agentes podem amenizar a sintomática da doença ao inibirem a ativação de células imunitárias, diminuir a produção de citocinas próinflamatórias, induzirem a secreção de citocinas antiinflamatórias, reduzirem a atividade de metaloproteases de matriz e aumentar a expressão de Foxp3 em Treg CD4+ e CD25+ (COMI *et al.*, 2012; SINGER *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2013; DHIB-JALBUT & MARKS, 2009; RACKE *et al.*, 2009).
- Azitioprima: Um imunossupressor, é utilizado quando há problema de adesão com as vias parenterais (CASSETTA *et al.*, 2007).
- Mitoxantrona: Um corticoesteróide que vêm caindo em desuso devido ao seu baixo perfil de segurança.
- Natalizumabe: Indicado nos casos de falha terapêutica com os fármacos de primeira escolha (GOODMAN *et al.*, 2009).

- Fingolimode: Utilizado quando o paciente está com surto incapacitante em tratamento com os medicamentos de primeira escolha e possui contraindicação para o uso do natalizumabe.
- Metilpredinisolona: Fármaco de escolha para o tratamento do surto com duração de tratamento de 3 a 5 dias.

Além dos medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde, podem ser utilizados também o metotrexato, o qual reduz a inflamação (GRAY *et al.*, 2004); a ciclofosfamida, a qual aumenta as células Th2 (LAMANTIA *et al.*, 2009;) e o micofenolato, que inibe a migração e ativação das células imunitárias pela barreira hematoencefálica (VOLLMER *et al.*, 2009).

Breland e Currier, em 1983, observaram que as picadas de escorpião possuíam a capacidade de inibir o desenvolvimento da EM (BRELAND & CURRIER., 1983). Posteriormente, após a elucidação de alguns mecanismos moleculares dessa enfermidade, foi proposta, como agentes terapêuticos da EM, a utilização dos bloqueadores de canais de K⁺ presentes nas peçonhas de animais (CASTAÑEDA *et al.*, 1995; LEWIS & GARCIA., 2003).

Dessa forma, bloqueadores específicos de canais Kv1.3 representam um potencial terapêutico para o tratamento da EM ao inibirem, de forma seletiva, a proliferação dos TEM sem afetar as dos linfócitos naive e TCM, uma vez que ocorre, nesses últimos, uma regulação positiva da expressão de IKCa1 (WULFF *et al.*, 2003; GHANSHANI *et al.*, 2000).

Como as toxinas específicas para esse canal apresentam a vantagem de inibir seletivamente a proliferação das células envolvidas nas reações autoimunes sem comprometer a resposta imune normal, elas representam um imunossupressor ideal (PANYI, 2005).

Além disso, diversos estudos têm demonstrado as vantagens de utilizar essa estratégia de tratamento para a EM. Beeton e colaboradores observaram que, utilizando inibidores seletivos de Kv1.3, os quais não apresentaram toxicidade, os sintomas da encefalomielite autoimune experimental (EME) foram melhorados de forma significativa (BEETON *et al.*, 2001a, BEETON *et al.*, 2001b, BEETON *et al.*, 2005). Esses dados permitem a inserção de tais moléculas em uma posição de prestígio no campo de aplicações clínicas da imunossupressão seletiva (PANYI, 2005).

A partir da toxina ShK, da anêmona do mar *Stichodactyla helianthus*, foram desenvolvidos diversos bloqueadores de K_v1.3, nos quais foram obtidos os maiores avanços, uma vez que o ShK-186 já foi testado em ensaios clínicos de fase I (CHI *et al.*, 2012; PENNINGTON *et al.*, 2009; BEETON *et al.*, 2011).

Além disso, algumas toxinas escorpiônicas, como MgTx, OSK1 e ChTX e seus derivados estão em estudo e representam promissores candidatos para o tratamento em modelos de doenças auto-imunes (MOUHAT *et al.*, 2005; KOO *et al.*, 1997; LEONARD *et al.*, 1992).

Dessa forma, devido à carência de tratamentos para EM que apresentem efeitos adversos menos significativos e eficácia ideal, é necessário o empenho para a prospecção e desenvolvimento de novos fármacos com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes que convivem com a doença.

2. JUSTIFICATIVA

A esclerose múltipla consiste em uma doença autoimune do sistema nervoso central. Os fármacos utilizados como tratamento para tal enfermidade suprimem a resposta imune de forma geral ao invés de regular somente as células imunitárias específicas envolvidas na fisiologia da doença, o que leva a infecções oportunistas e, conseqüentemente, a complicações. Dessa forma, é necessário desenvolver novos tratamentos eficazes contra a doença, porém, que não gerem imunossupressão generalizada.

As peçonhas de escorpião compostas por misturas complexas de diversos componentes, dentre os quais se encontram os peptídeos neuroativos, que modulam a permeabilidade da membrana celular aos íons Na^+ , K^+ , Cl^- ou Ca^{++} afetando, assim, a comunicação celular. Comunicação esta necessária para a resposta imune, em especial as autoimunes, podendo, desta forma, serem utilizados como pilotos no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças autoimunes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar na peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi* peptídeos candidatos a bloqueadores do canal dependente de voltagem Kv1.3 como uma nova perspectiva para o tratamento da Esclerose Múltipla.

3.2. Objetivo Específico

Identificar e purificar na peçonha do escorpião *H. gertschi* os peptídeos oriundos do precursor HGE024|Contig2;

4. METODOLOGIA

4.1. Fracionamento e purificação dos peptídeos por meio de RP-HPLC

A purificação dos peptídeos foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa – RP-HPLC (Shimadzu LC 20-AD), composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), uma interface de conexão (CBM-20A), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-20A). A detecção foi realizada a 216 e 280nm. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex C18 Synergi Fusion-RP (250 x 4,60 mm, partícula de 4 µm, poro de 80 Å). As fases móveis consistiram em água deionizada (A) (Mili-Q®) e acetonitrila (B) (VETEC®) acrescidos de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich®) a 0,12% e 0,1%, respectivamente. O gradiente de cada método, realizado a um fluxo constante de 1mL/min, está descrito na tabela 1.

TABELA 1. Métodos utilizados no processo de fracionamento e purificação dos peptídeos por meio de RP-HPLC.

Tempo (min)	% A	% B
Cromatografia 1 (CM1)		
0	100	0
60	40	60
Recromatografia A (RCM A)		
0	95	5
5	85	15
65	70	30
70	50	50
Recromatografia B (RCM B)		
0	95	5
12	83	17
42	68	32
44	5	95
Recromatografia C (RCM C)		
0	95	5
10	80	20
30	75	25
35	0	100
Recromatografia D (RCM D)		
0	95	5
10	77,5	22,5
30	72,5	27,5
35	0	100
Recromatografia E (RCM E)		

0	100	0
10	90	10
20	85	15
25	85	15
65	75	25
Recromatografia F (RCM F)		
0	100	0
10	90	10
24	83	17
29	83	17
49	73	27
59	63	37
Recromatografia G (RCM G)		
0	100	0
5	80	20
15	80	20
67	70	30

4.2. *Espectrometria de massa molecular*

Os espectros de massa molecular (MS e MS/MS) foram adquiridos utilizando o equipamento MALDI Autoflex Speed TOF/TOF (Bruker Daltronics) operado no modo positivo refletivo. Uma mistura de peptídeos foi empregada na calibração externa do espectrômetro (Peptide Calibration Standard III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). O equipamento foi controlado utilizando o software Flex Control versão 3.4 e as análises foram realizadas utilizando o software Flex Analysis (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics). O cálculo das massas moleculares teóricas foi realizado utilizando o software Isotope Partern (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics).

4.2.1. *Análises de massa molecular dos peptídeos*

As análises foram realizadas a partir de um volume correspondente a 1 uL do peptídeo purificado, na molaridade de 30 pM (solução contendo 5% de acetonitrila em água), misturado a 3 uL de uma solução de α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). A mistura foi adicionada em duplicata diretamente na placa MALDI target plate MTP Ground Steel.

4.2.2. Sequenciamento dos peptídeos

Espectros de fragmentação (MS/MS) foram adquiridos visando o sequenciamento de peptídeos. A fragmentação dos íons precursores foi realizada por ISD. As análises foram realizadas a partir de um volume correspondente a 2 uL do peptídeo purificado, na molaridade de 30 pM (solução contendo 5% de acetonitrila em água), misturado a 2 uL de uma solução de 1,5-diaminonaftaleno (DAN).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos peptídeos putativos oriundos do precursor HGE024

A sequência do precursor HGE024|Contig2 (SCHWARTZ *et al.*,2007), encontrado no transcrito da glândula de peçonha do escorpião *H. gertschi*, foi analisada por meio do servidor SignalP 4.1 (Technical University of Denmark) com o objetivo de prever a sequência dos resíduos de aminoácidos dos putativos peptídeos maduros. A partir de tal análise foram obtidas as duas sequências mais prováveis (Figura 6), a Hge024 e Hge024c, as quais tiveram as suas massas moleculares[M+H]⁺ calculadas em 5.271,53Da e 5.041,44 Da, respectivamente.

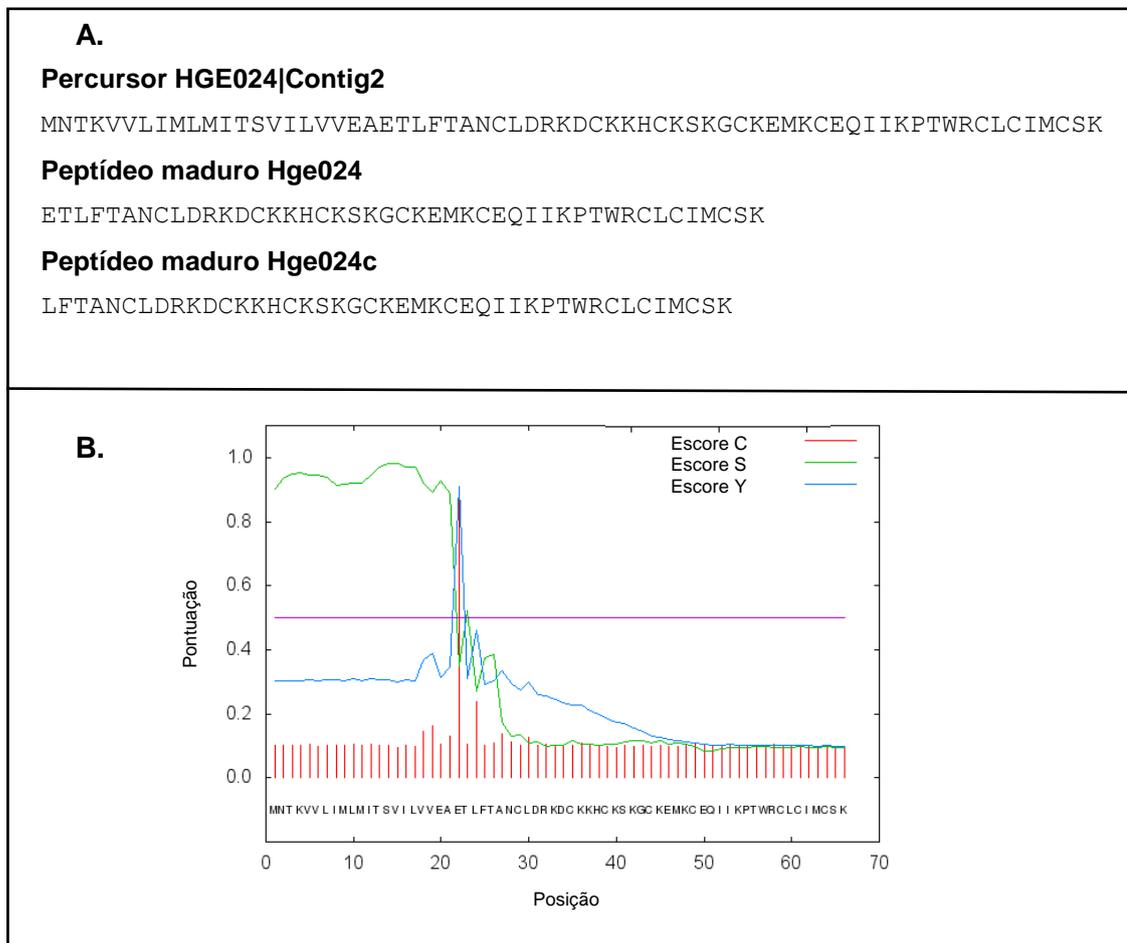


FIGURA 6. Previsão do peptídeo maduro a partir do precursor HGE024|Contig2. (A) Sequência de resíduos de aminoácidos do precursor e dos putativos peptídeos Hge024 e Hge024c. (B) Gráfico da previsão de clivagem do peptídeo sinal em peptídeo maduro, a partir do qual pode-se observar dois possíveis pontos de clivagem, o primeiro entre a alanina (21ª posição) e o ácido glutâmico (23ª posição) e entre a treonina (24ª posição) e a leucina (25ª posição), levando assim à perda do peptídeo sinal MNTKVVLIIMLITSVILVVEA e MNTKVVLIIMLITSVILVVEAET respectivamente. Sendo que o escore C indica o local de clivagem, no qual ocorre um pico após o peptídeo clivado, o S indica o peptídeo sinal, o qual diminui no peptídeo maduro, e o Y, uma combinação do C e S, indica uma melhor previsão da clivagem do peptídeo sinal e produção do peptídeo maduro, no qual ocorre um pico no local de clivagem.

A partir desses dados, iniciou-se a busca pela massa molecular dos peptídeos Hge024 e Hge024c na peçonha bruta do escorpião *Hadrurus gertschi*.

Foram realizadas diversas cromatografias no método CM 1 (Figura 7), as quais permitiram o fracionamento da peçonha por meio da coleta do material em intervalos de 10 minutos, nos *pools* 1, 2, 3, 4, 5, 6. As frações coletadas foram analisadas, posteriormente, em espectrômetro de massa molecular do tipo MALDI-TOF TOF (Bruker), sendo que no espectro obtido a partir do *pool* 3 foi observado um componente de massa molecular $[M+H]^+$ de aproximadamente 5.044Da (Figura 8). Como nos outros *pools* não foi encontrada nenhuma massa molecular semelhante à massa molecular teórica de interesse, foi dada continuidade à investigação somente com o *pool* 3.

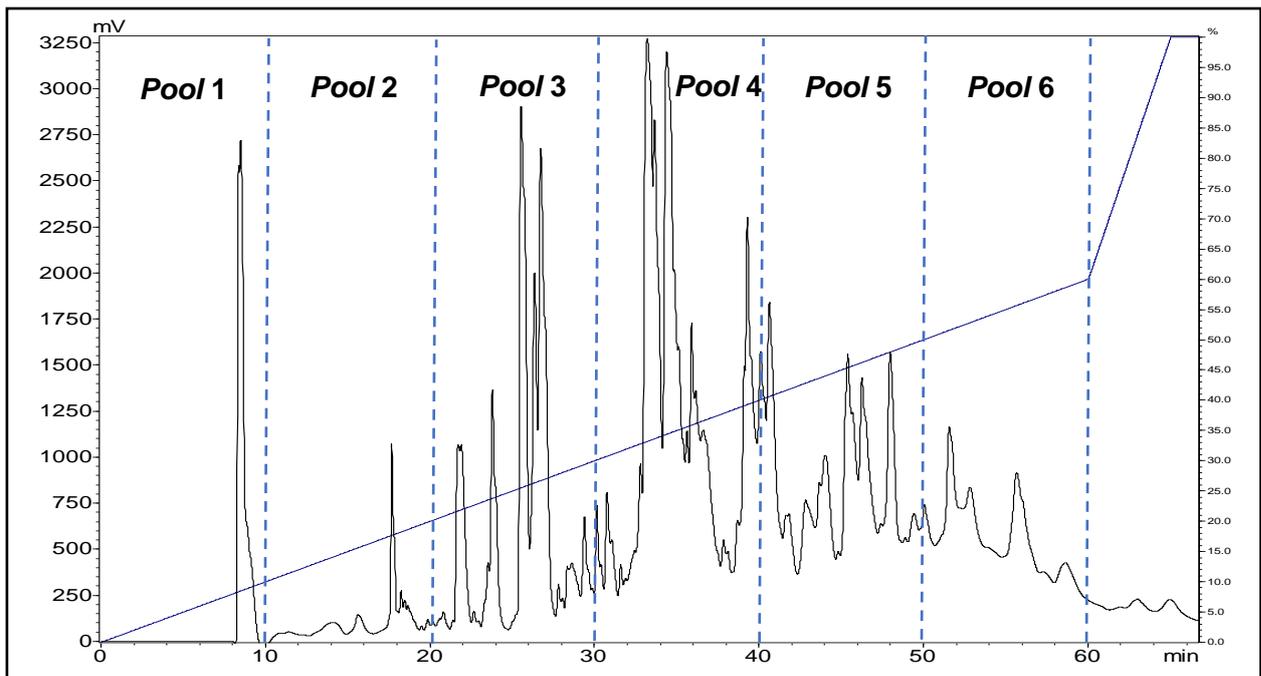


FIGURA 7. Cromatograma obtido após fracionamento por meio de RP-HPLC da peçonha bruta de *H. gertschi*. Foram coletadas as frações em intervalos de 10 minutos, gerando os *pools* de 1 à 6.

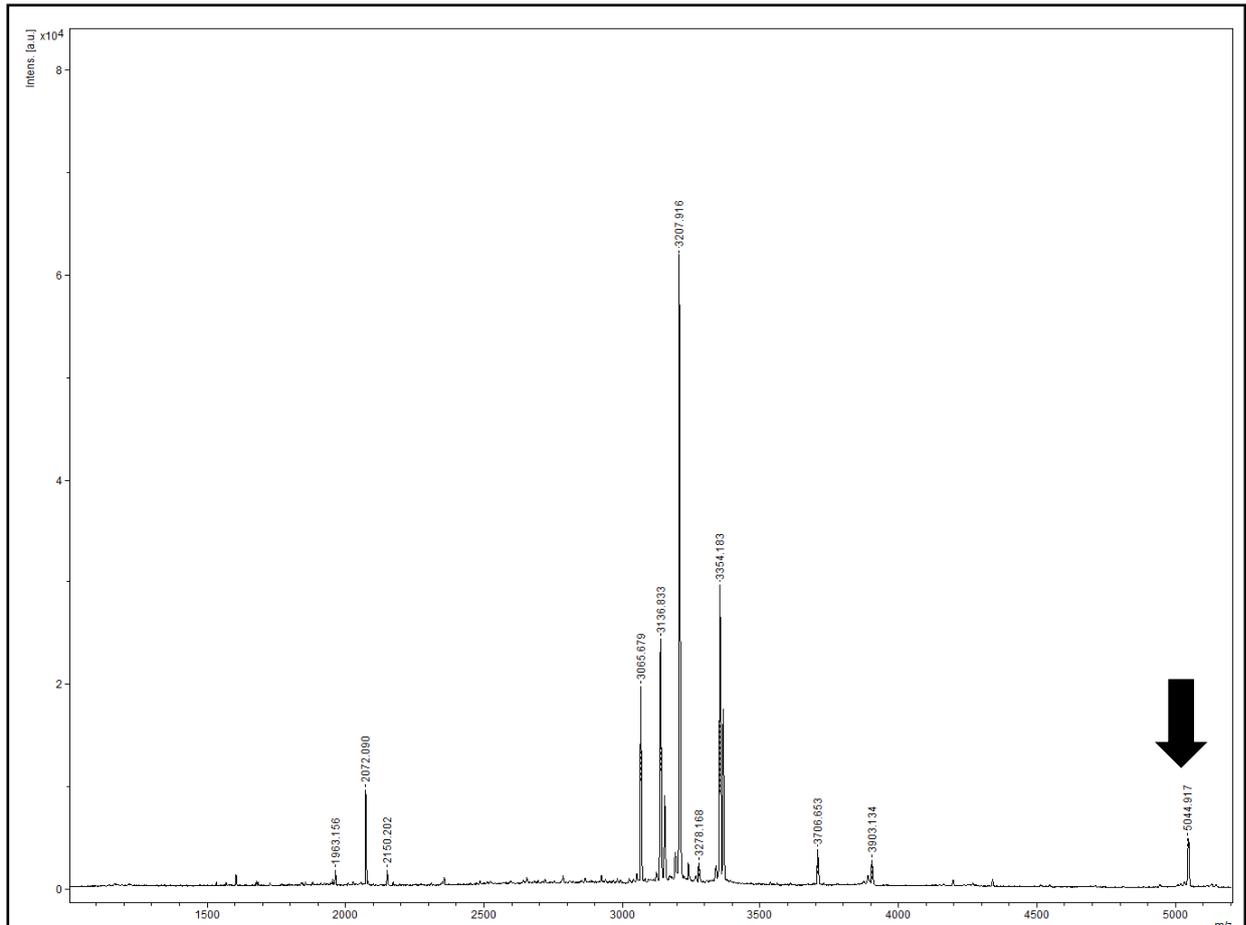


FIGURA 8. Espectro de massa molecular obtido por meio da análise ($[M+H]^+$) do *pool 3*. É possível observar, no último pico, uma massa molecular de 5.044,917Da, a qual se aproxima à massa molecular de um dos peptídeos de interesse.

Com 5 mg do *pool 3* a foram realizadas quatro corridas cromatográficas no método RCM A, a partir da qual foram coletadas todas as frações, sendo que as últimas oito frações majoritárias (Tabela 2 e Figura 9) foram purificadas por meio do método RCM B (Figura 10 e 11).

TABELA 2. Relação das frações de interesse obtidas após fracionamento por meio de RP-HPLC da peçonha bruta de *H. gertschi* (Figura 7).

Nº da fração	1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de Retenção (TR) (em min)	35,832	40,727	43,006	44,951	48,210	50,087	51,265	68,432

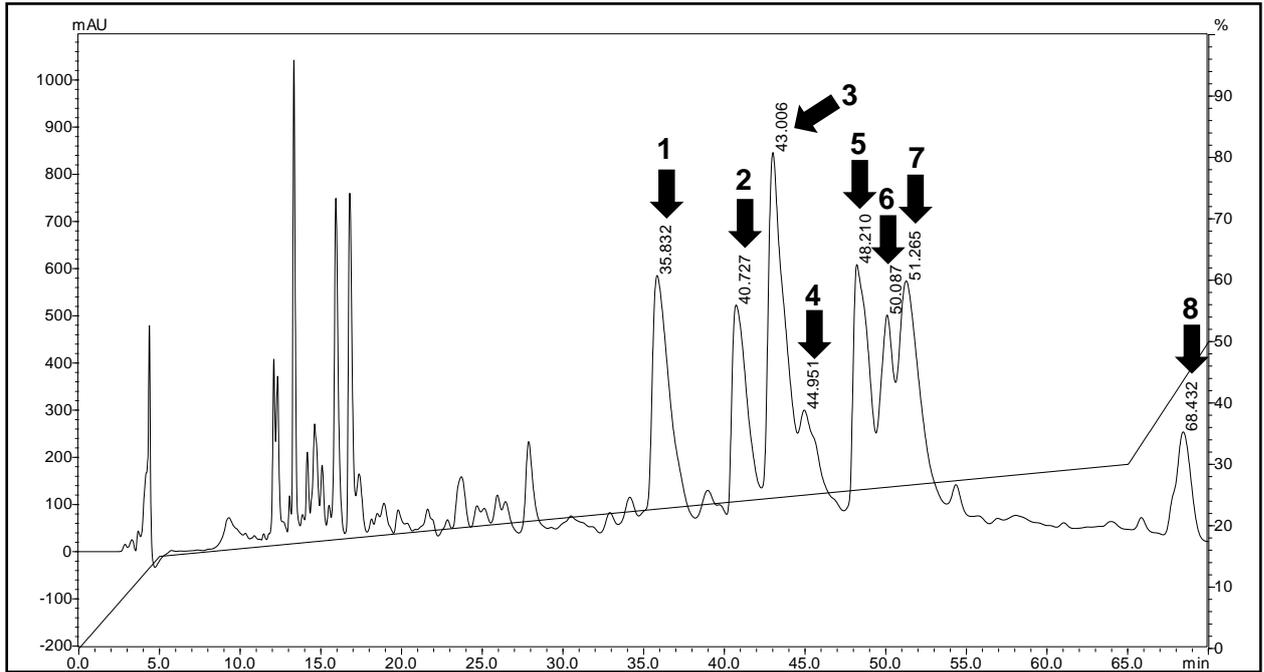


FIGURA 9. Recromatografia 1, obtida após o fracionamento por meio de RP-HPLC do *pool* 3 da peçonha do *H. gertschi*. Sendo que as últimas oito frações foram nomeadas como fração de 1 a 8 para posterior purificação.

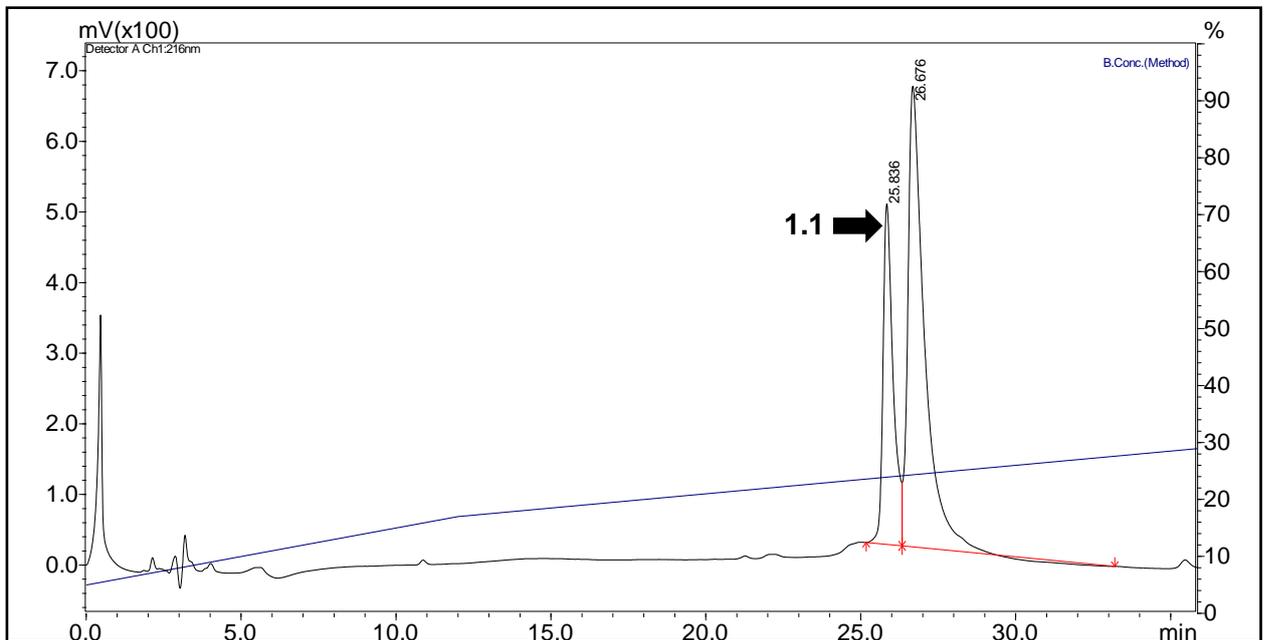


FIGURA 10. Recromatografia 2, obtida após o fracionamento por meio de RP-HPLC da fração n° 1. Através dessa foi obtida a fração n° 1.1.

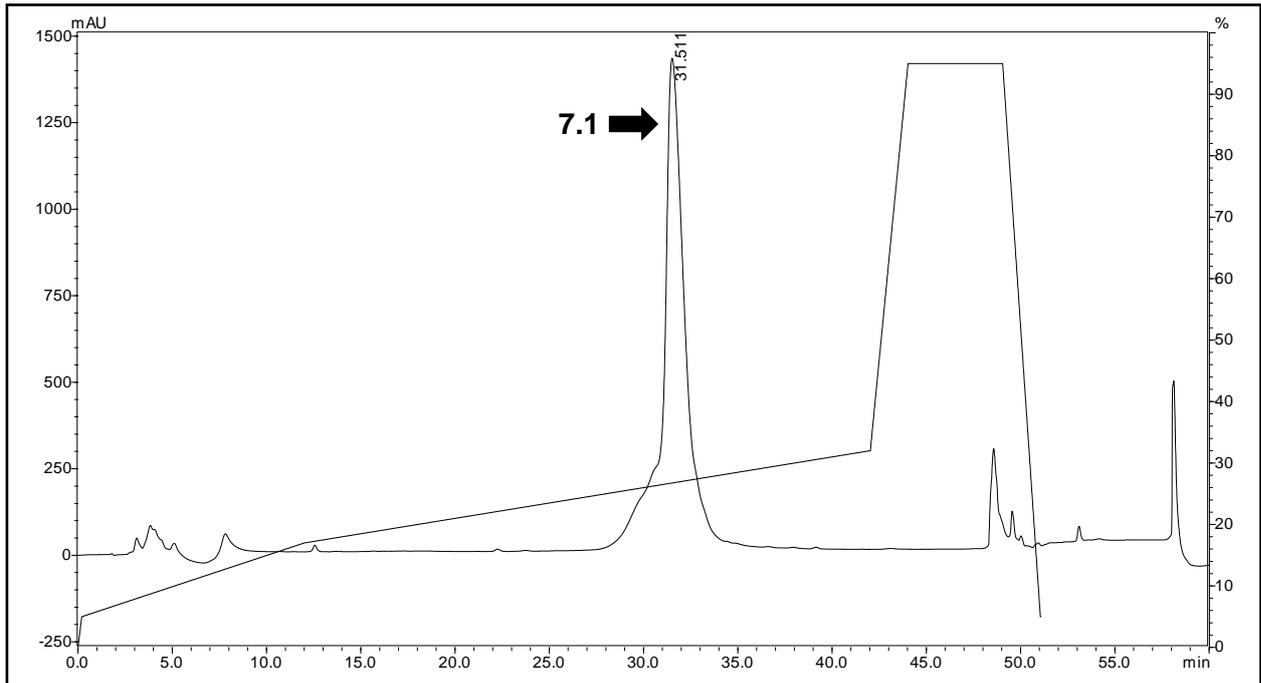


FIGURA 11. Recromatografia 3, obtida após o fracionamento por meio de RP-HPLC da fração n° 7. Através dessa foi obtida a fração n° 7.1.

Após essa etapa, foram analisadas as massas moleculares presentes nas frações majoritárias obtidas após fracionamento cromatográfico das cromatografias de n° 1 a 8. Foram encontradas nas frações n°1.1 (Figura 12), com tempo de retenção (TR) de 25,836min, e, na 7.1 (Figura 13), com TR de 31,511min, as massas moleculares $[M+H]^+$ de aproximadamente 5.292 e 5.042Da.

A partir da fração 1.1 foi realizada uma cromatografia com o método RCM C, da qual foi obtida uma fração, a 1.2 (Figura 14) com massa molecular, dentre outras, de 5292 Da. Já na 7.1, foi utilizado o método RCM D, que resultou em uma fração, a 7.2 (Figura 15), com massa molecular $[M+H]^+$ de 5.042 Da, porém, ainda não estava pura. Dessa forma, foram necessários mais passos de cromatograficos por meio de RP-HPLC.

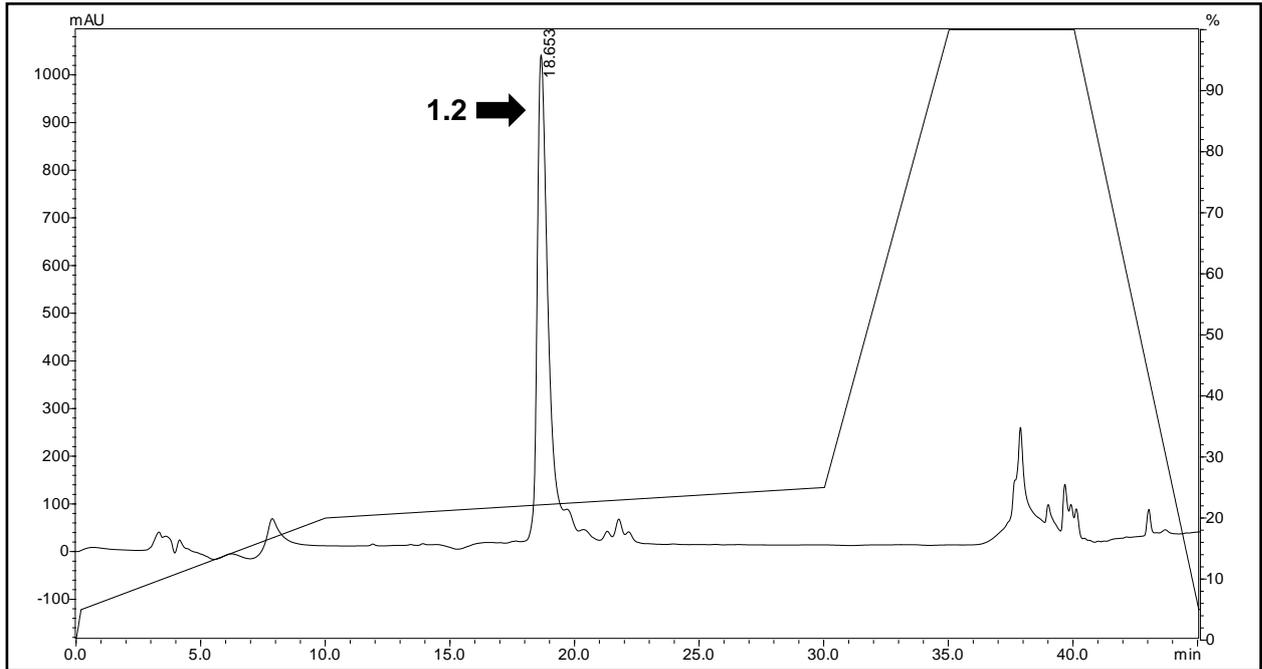


FIGURA 12. Recromatografia 4, obtida após o fracionamento por meio de RP-HPLC da fração n° 1.1. Através dessa foi obtida a fração n° 1.2.

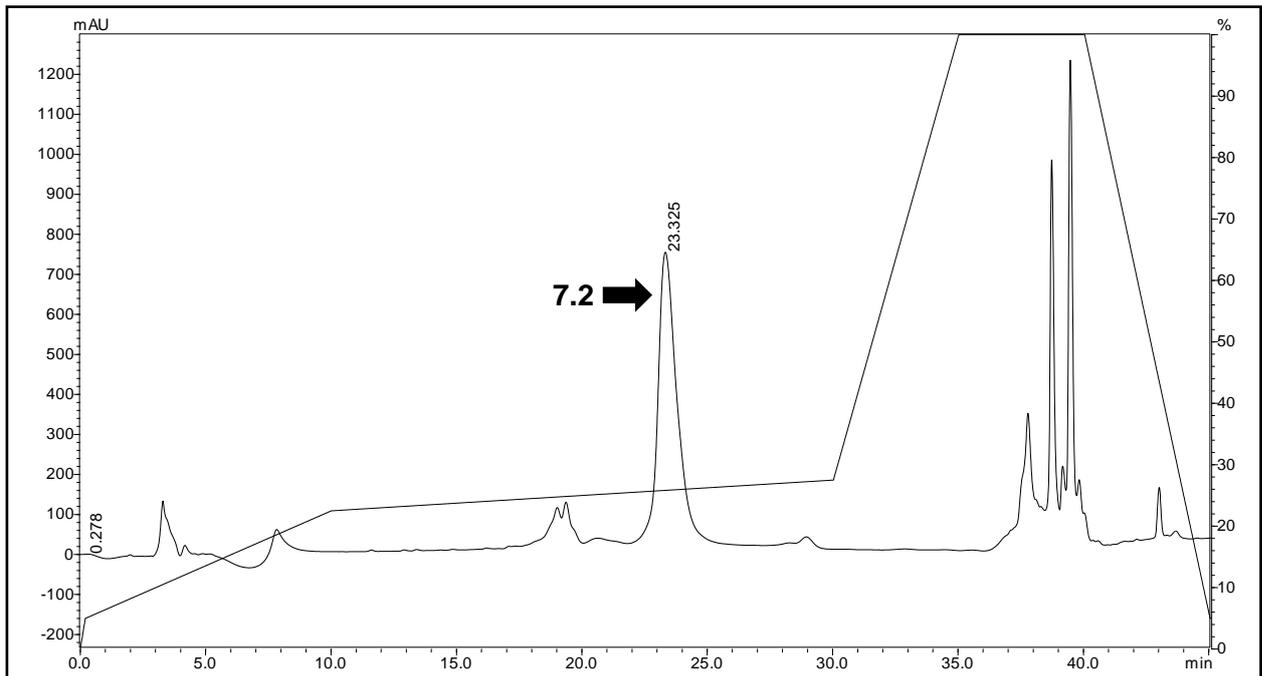


FIGURA 13. Recromatografia 5, obtida após o fracionamento por meio de RP-HPLC da fração n° 7.1. Através dessa foi obtida a fração n° 7.2.

Foi realizada, então, a corrida cromatográfica da fração n° 1.2 pelo método RCM E, obtendo-se um peptídeo, a fração 1.3 (TR = 47,258min), com massa molecular da dupla carga $[M+2H]^+$ de 2.645,014Da, a qual corresponde à massa molecular $[M+H]^+$ de 5.288,028Da (Figura 14). Já a fração 7.2, ao passar por uma

cromatografia no método RCM F, foi purificada, revelando a n°7.3 (TR = 47,412 min), com massa molecular da dupla carga $[M+2H]^+$ 2.522,966Da, que corresponde ao valor, em $[M+H]^+$, de 5.043,932Da (Figura 15).

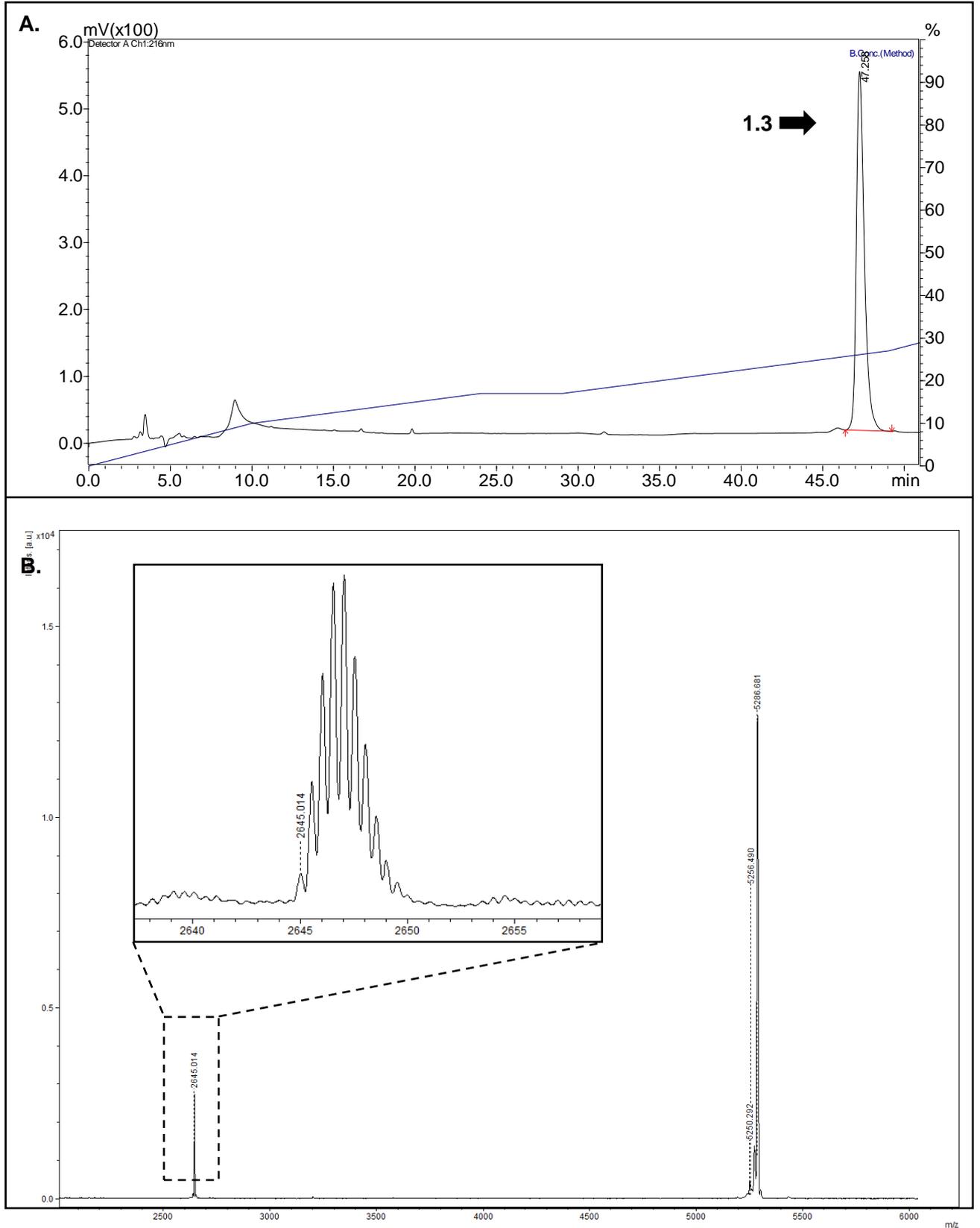


FIGURA 14. (A) Recromatografia 6, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC da fração n° 1.2.

Através dessa foi obtida a fração n° 1.3. (B) Espectro de massa molecular obtido através da análise $[M+H]^+$ da fração n° 1.3 com ampliação da região de $[M+2H]^+$. É possível observar, na região de $[M+2H]^+$, uma massa molecular de 2.645,014Da, a qual corresponde à massa molecular $[M+H]^+$ de 5.288,028Da, que se aproxima a um dos peptídeos de interesse.

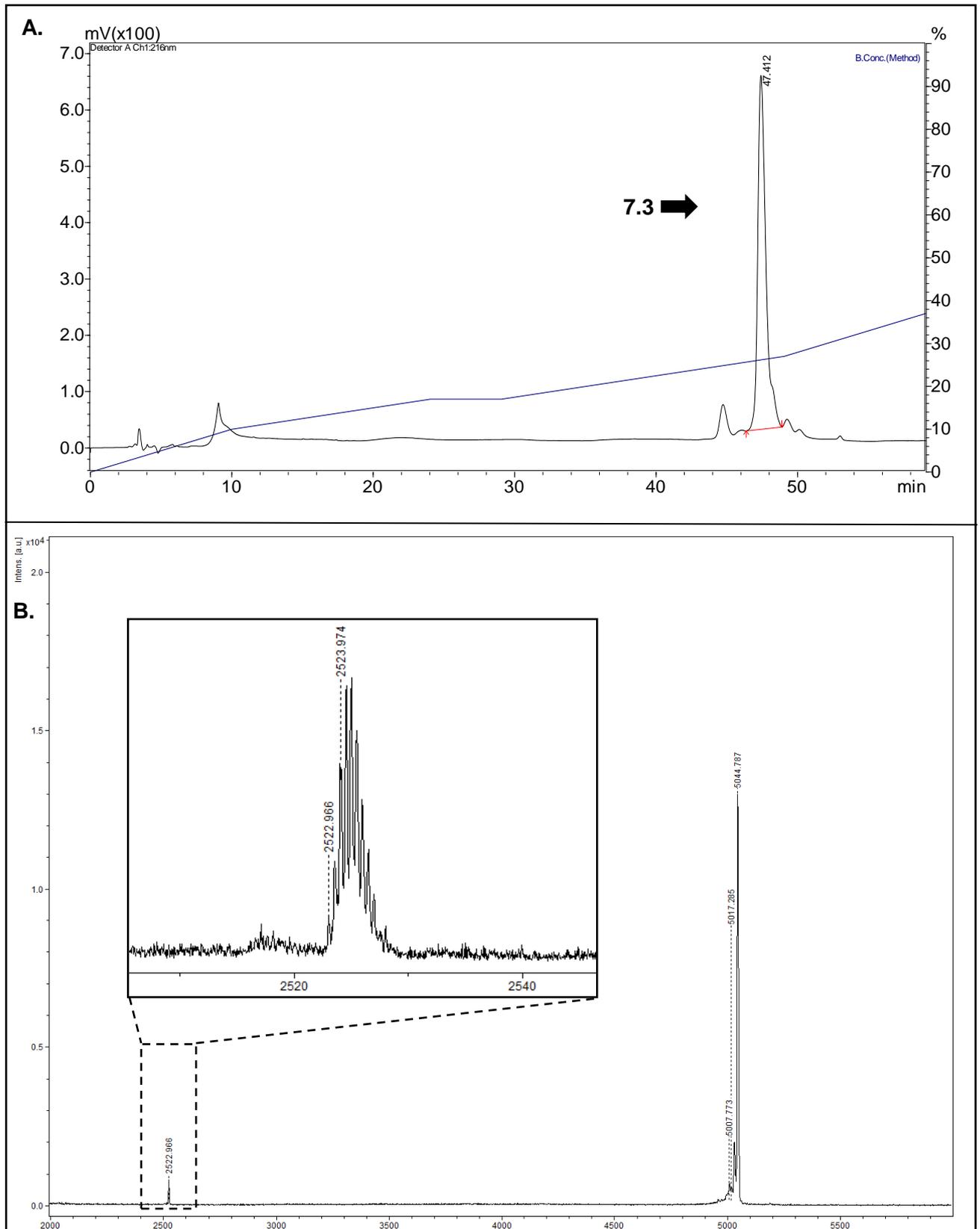


FIGURA 15. (A) Recromatografia 7, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC da fração n° 7.2.

Através dessa foi obtida a fração n° 7.3. (B) Espectro de massa molecular obtido através da análise ($[M+H]^+$) da fração n° 7.3 com ampliação da região de $[M+2H]^+$. É possível observar, na região de $[M+2H]^+$, uma massa molecular de 2.522,966Da, a qual corresponde à massa molecular $[M+H]^+$ de 5.043,932Da, que se aproxima a um dos peptídeos de interesse.

Estas etapas cromatográficas revelaram a presença de dois peptídeos que, possivelmente, poderiam ser os componentes de interesse, a Hge024 e Hge024c. Dessa forma, foi realizada a purificação de tais compostos do *pool* 3 que restou, cerca de 7mg. Foram realizadas seis corridas cromatográficas pelo método CM 1, a partir das quais foram obtidas as mesmas frações da primeira etapa, as n° 1 - 8. Porém, o perfil cromatográfico (Figura 16) se apresentou levemente diferente, com uma resolução menor, o que acarretou em um procedimento diferenciado.

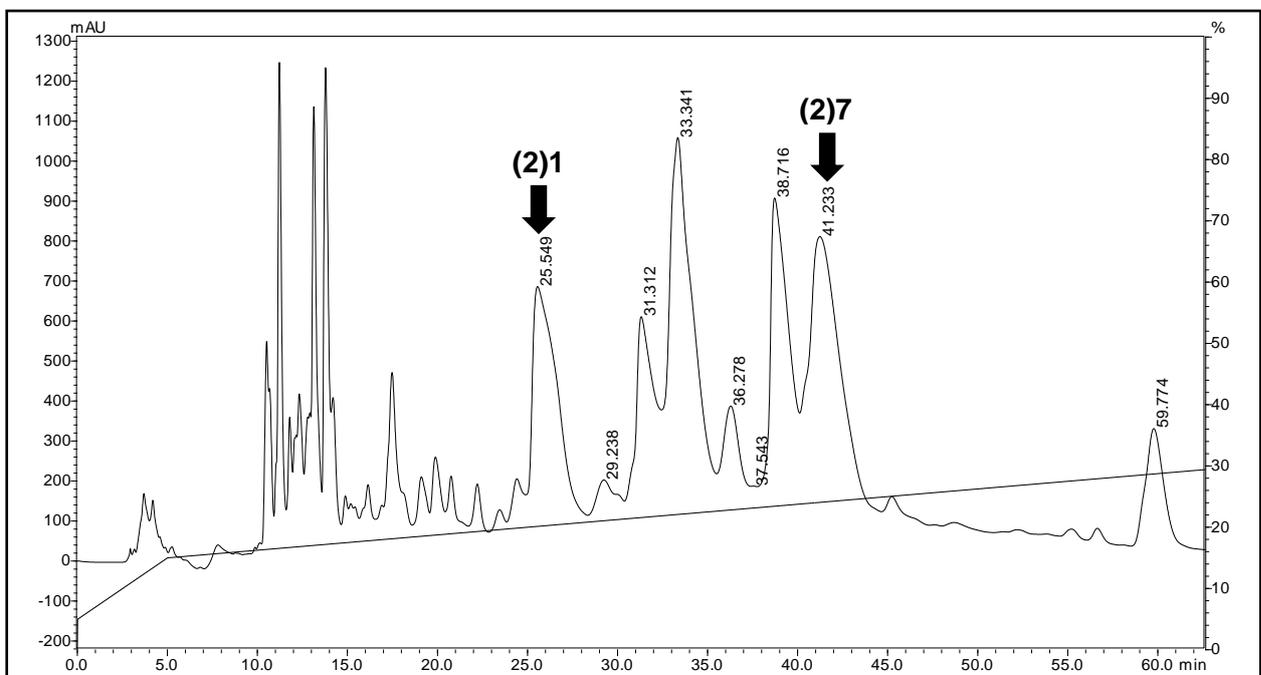


FIGURA 16 Recromatografia 8, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC do *pool* 3. Através dessa foram obtidas as frações n° (2)1 e (1)7.

Para purificar a fração (2)7 foi utilizado, inicialmente o método RCM A, o qual gerou a n° (2)7.1 (TR = 19,329 min) (Figura 17). A purificação dessa, por meio do método RCM G, levou à amostra (2)7.2, a qual é a mistura das frações com TR de 26,614 e 27,336 min (Figura 18).

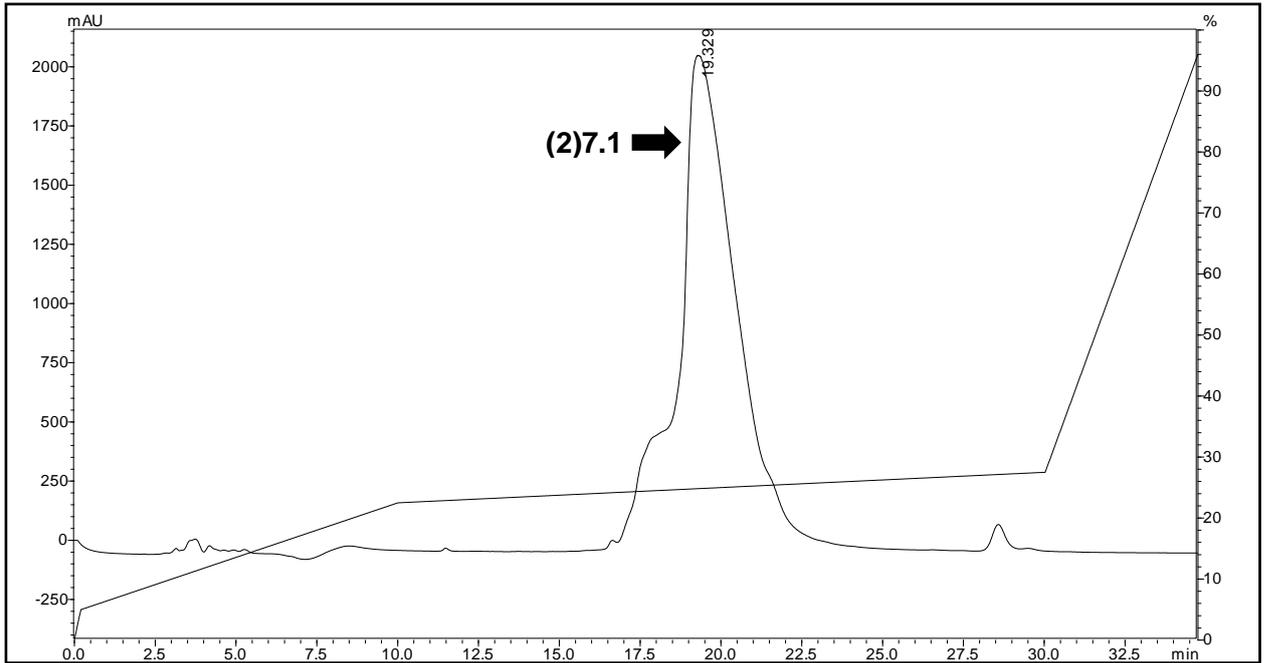


FIGURA 17. Recromatografia 9, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC da fração n° (2)7. Através dessa foi obtida a fração n° (2)7.1.

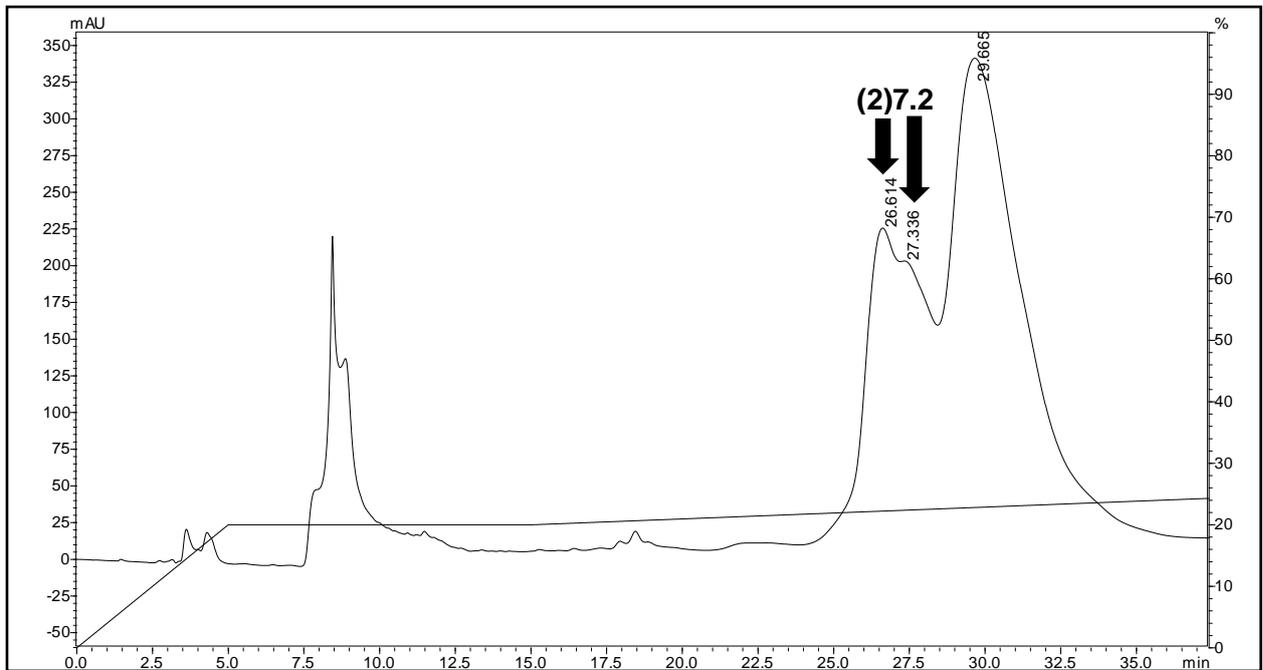


FIGURA 18. Recromatografia 10, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC da fração n° (2)7.1. Através dessa foi obtida a amostra n° (2)7.2, a qual corresponde às frações com TR de 26,614 e 27,336 min.

A partir da amostra (2)7.2, foi realizada uma cromatografia com o método RCM G, porém, como o aquecimento à temperatura de 40°C. Essa levou à obtenção da fração n° (2)7.3 (Figura 19), a qual, ainda não estava pura. Dessa forma, ela foi submetida a uma última separação cromatográfica, com o método RCM F, que gerou a fração (2)7.4, com massa molecular $[M+2H]^+$ 2.522,659Da, que corresponde ao valor em $[M+H]^+$ de 5.043,318Da (Figura 20).

Infelizmente, devido a uma falha no injetor, o material da fração (2)1.1 foi perdido em sua totalidade, dessa forma, o peptídeo putativo Hge024, ou seja, o de 5.290Da, foi obtido somente na primeira etapa da purificação da peçonha bruta.

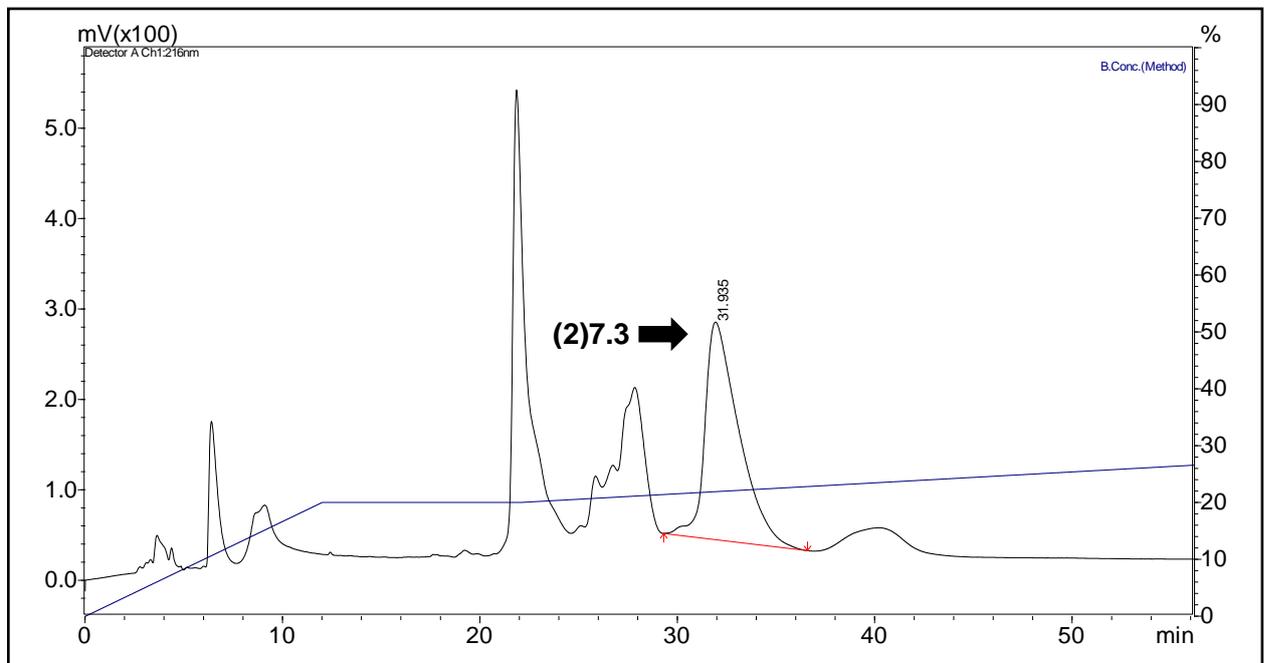


FIGURA 19. Recromatografia 11, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC da fração n° (2)7.2. Através dessa foi obtida a fração n° (2)7.3.

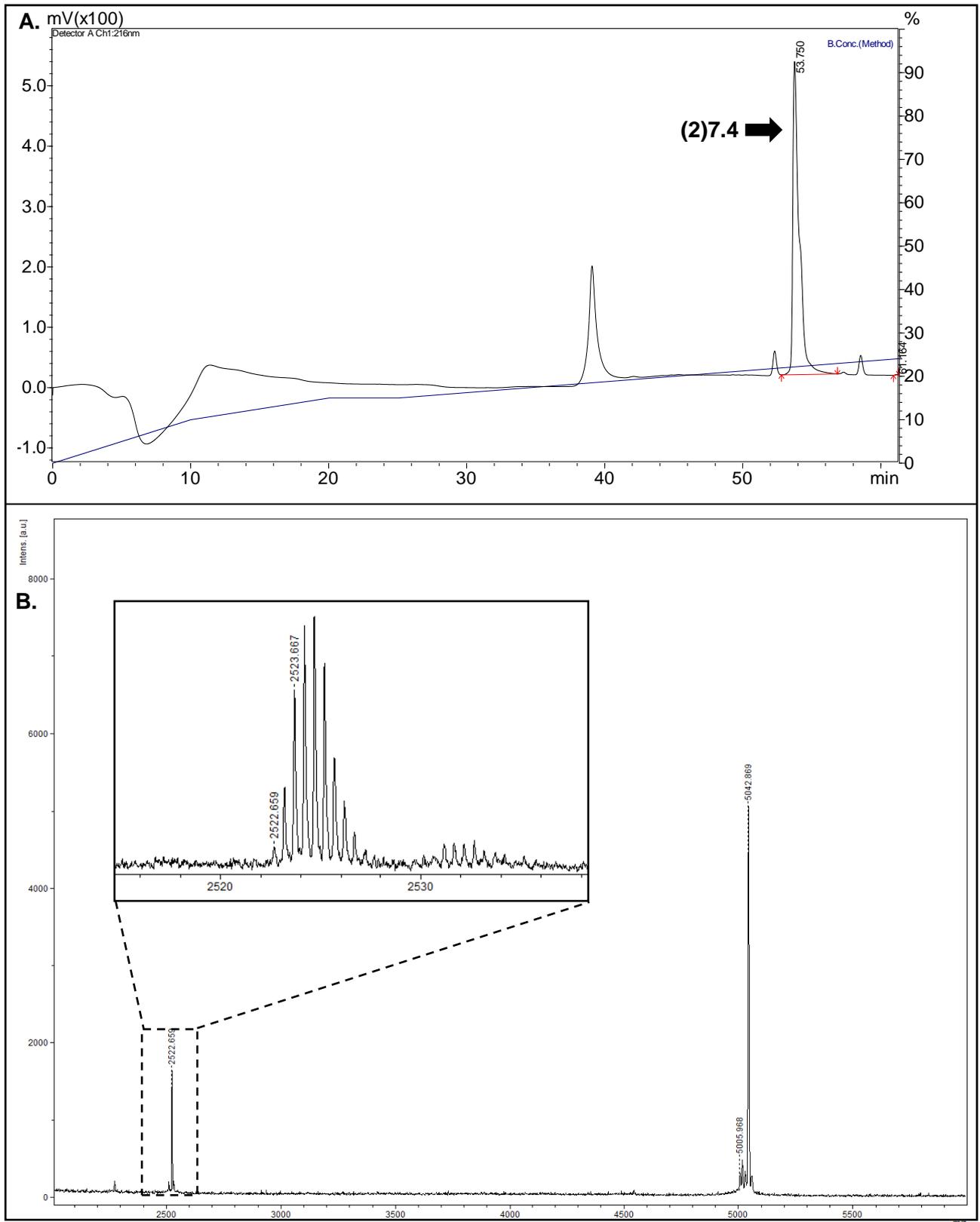


FIGURA 20. (A) Recromatografia 12, obtida após a purificação por meio de RP-HPLC da fração n° (2)7.3. Através dessa foi obtida a fração n° (2)7.4. (B) Espectro de massa molecular obtido por meio da análise ([M+H]⁺) da fração n° (2)7.4 com ampliação da região de [M+2H]⁺. É possível observar, na região de [M+2H]⁺, uma massa molecular de 2.522,659Da, a qual corresponde à massa molecular [M+H]⁺ de 5.043,318Da, que se aproxima a um dos peptídeos de interesse.

5.2. Sequenciamento dos peptídeos purificados

Após a purificação dos peptídeos correspondentes às frações 1.3, 7.3 e (2)7.4, das recromatografias 6, 7 e 12, respectivamente, observou-se que os dois últimos possuíam a mesma massa molecular. Então esses foram unidos previamente ao sequenciamento dos resíduos de aminoácidos, formando a amostra de peptídeo classificada como 7.5. Sendo que foram obtidas 17,4455 μ g do 1.3 e 35,253 μ g do 7.5.

Inicialmente, para realizar o sequenciamento dos peptídeos 1.3 e 7.5, foi utilizado o método por ISD. Os espectros obtidos revelaram fragmentos da sequência com 12 e 14 resíduos de aminoácidos respectivamente. Sendo que, no 1.3 (Figura 21), representam cerca de 26% dos resíduos e 25% da massa molecular do peptídeo Hge024 e, no 7.5 (Figura 22), cerca de 34% dos resíduos e 35% da massa molecular do peptídeo Hge024c.

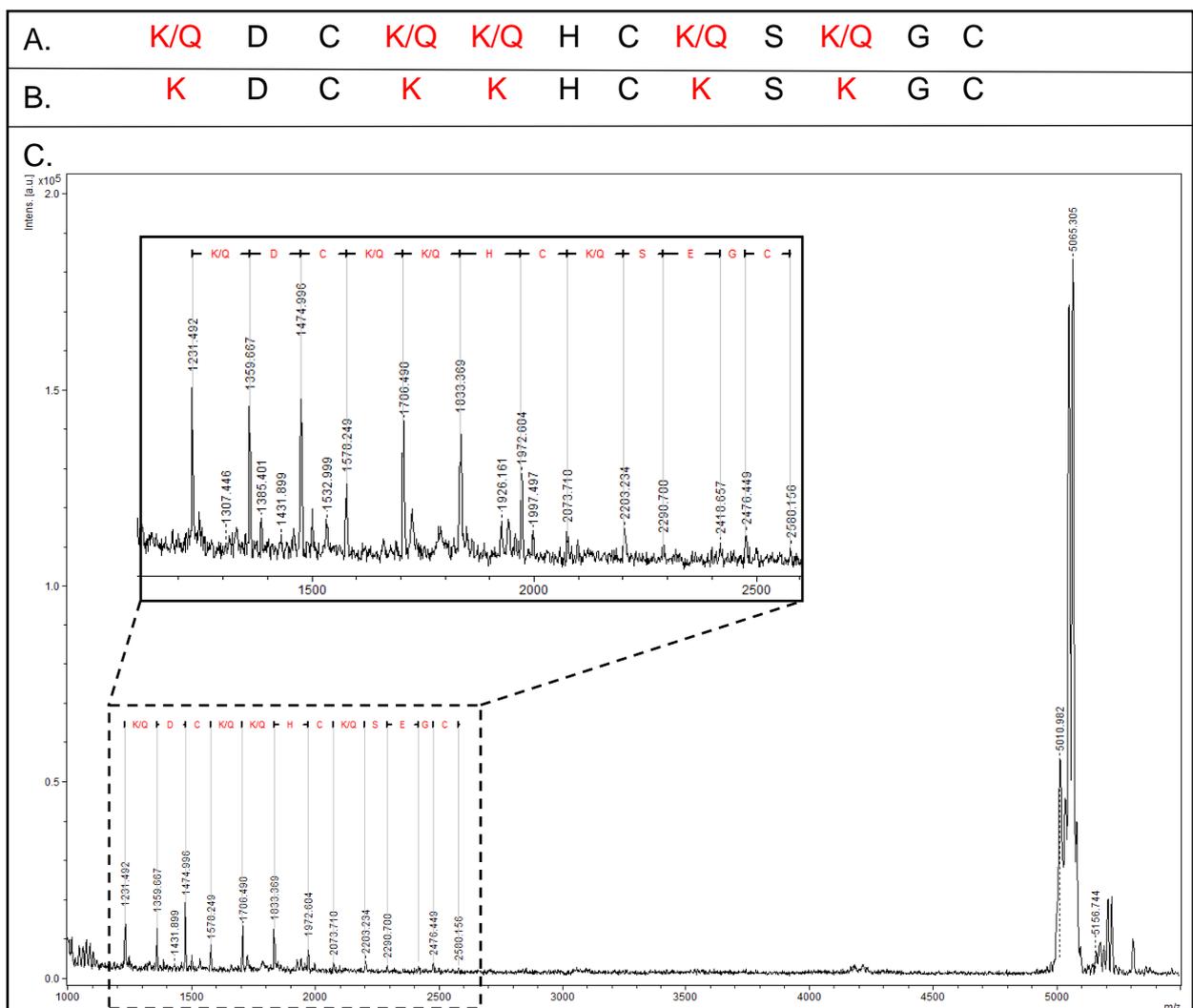


FIGURA 21. (A) Sequência obtida por meio da análise em MALDI/TOF em DAN do peptídeo 1.3. (B) Sequência do peptídeo 1.3 ajustada (em destaque os pontos de ajuste). (C) Espectro de massa molecular obtido através da análise ($[M+H]^+$) do peptídeo 1.3 com ampliação da região correspondente

à sequência dos resíduos de aminoácidos. É possível observar, na região ampliada, os resíduos obtidos.

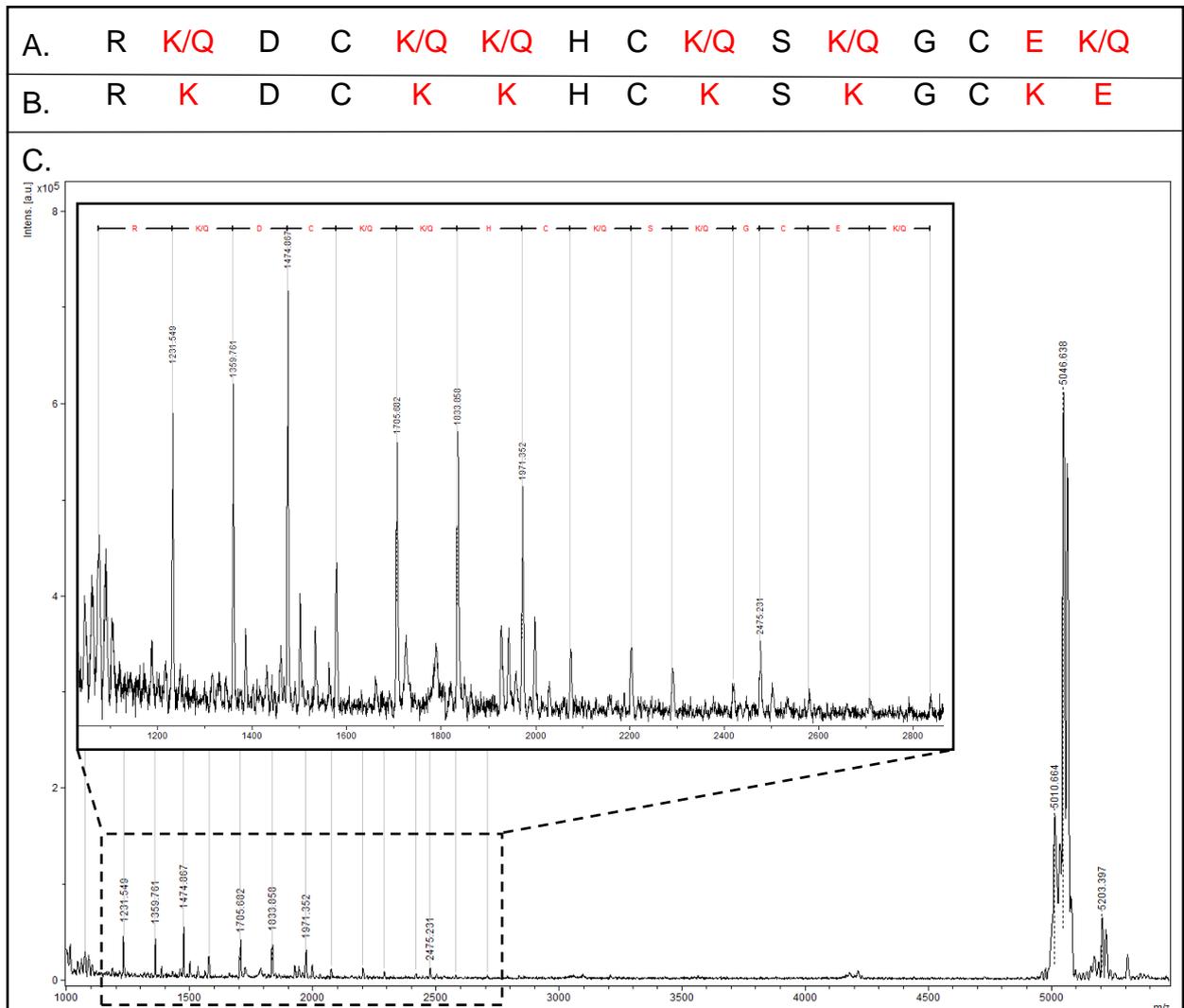


FIGURA 22. (A) Sequência obtida através da análise em MALDI/TOFTOF em DAN do peptídeo 7.5. (B) Sequência do peptídeo 7.5 ajustada (em destaque os pontos de ajuste). (C) Espectro de massa molecular obtido através da análise $([M+H]^+)$ do peptídeo 7.5 com ampliação da região correspondente à sequência dos resíduos de aminoácidos. É possível observar, na região ampliada, os resíduos obtidos.

Embora existam duas falhas nos sequenciamentos, a indeterminação entre resíduos de lisina e glutamina no 1.3 e 7.5 e a leitura incorreta da lisina e ácido glutâmico no 7.5, essas são justificáveis e passíveis de correção.

A primeira decorre da resolução do espectrômetro de massa molecular utilizado, o qual é ineficaz para distinguir a diferença de aproximadamente 0,05 Da que existe entre a lisina (128,09496Da) e a glutamina (129,04259Da) no peptídeo 1.3 e 7.5, dessa forma, o sinal emitido por suas massas moleculares pode ser interpretado

0,498Da, de erro de calibração do equipamento, o qual levou à uma aferição imprecisa dos parâmetros. Dessa forma, deve-se aprofundar a investigação das sequências de resíduos de aminoácidos para maior elucidação e confirmação dessas.

Assim sendo, pode-se observar que foram encontrados, na peçonha bruta do escorpião *H. gertschi*, dois peptídeos semelhantes, os quais podem consistir no Hge024 e o Hge024c, que diferem somente na presença e ausência de dois resíduos N-terminais, um ácido glutâmico e uma treonina.

As modificações pós-traducionais (MPT) do tipo proteólise aparentam ser comuns em peçonhas escorpiônicas, estando presentes em diversas espécies, como no *Hadrurus gertschi*, no qual acredita-se que o peptídeo HgeScp1p1 é processado em dois tipos de peptídeos maduros (DIEGO-GARCÍA *et al.*, 2007b). Já no *Tityus serrulatus*, ocorre uma MPT na Hypotensina-1, a partir da qual foram descritos 45 peptídeos fragmentados (VERANO-BRAGA *et al.*, 2013), na proteína *Pape* (RATES *et al.*, 2008) e na TsTSK- β (PIMENTA *et al.*, 2001). Na peçonha do escorpião *Orthochirus scrobicosus*, por sua vez, foi observado um peptídeo oriundo da MPT da toxina Osl-1 (KOZLOV, S *et al.*, 2000).

Ainda que a relevância biológica das modificações pós-traducionais não tenha sido completamente compreendida, supõe-se que a proteólise dos peptídeos possua o objetivo de aumentar a variedade de toxinas na peçonha, como consequência, aumenta-se a quantidade de alvos moleculares e dos seus mecanismos de ação (VERANO-BRAGA *et al.*, 2013).

Assim sendo, descontadas as adições ocasionadas pela oxidação da metionina e amidação C-terminal, considerando-se que a diferença de massa molecular $[M+H]^+$ entre o peptídeo 1.3 e 7.4, de 229,71Da, semelha-se à soma das massas moleculares do ácido glutâmico com a treonina, 230,091Da, e que o resultado da previsão da clivagem do peptídeo sinal obtida pelo SignalP 4.1 indica um ponto de clivagem entre a treonina (24° posição na sequência) e leucina (25° posição na sequência), pode-se propor que o peptídeo Hge024 tenha sido submetido à uma MPT do tipo proteólise, levando à um derivado com sequência reduzida, o Hge024c.

6. CONCLUSÃO

- A partir da peçonha bruta do escorpião *Hadrurus gertschi* foi encontrada, no *pool* 3, um composto de massa molecular experimental semelhante à massa molecular teórica de um putativo peptídeo maduro oriundo do precursor HGE024|Contig2;
- Por meio da purificação do *pool* 3 foi possível a obtenção de dois peptídeos, 1.3 e 7.5, de massas moleculares $[M+H]^+$ de 5.288,028 e 5.043,381Da, respectivamente;
- Foi realizado o sequenciamento de um fragmento de cada um dos peptídeos purificados, os quais corresponderam a aproximadamente 30% da sequência de resíduos de aminoácidos e da massa molecular teórica dos peptídeos Hge024 e Hge024c, respectivamente;
- Devido à identidade das sequências e das massas moleculares teóricas e experimentais, é possível propor que os peptídeos purificados, 1.3 e 7.5, consistem nos Hge024 e Hge024c;
- Como a diferença entre as sequências teóricas do Hge024 e Hge024c consiste na presença, no primeiro, de dois resíduos N-terminais adicionais, pode-se propor que o Hge024c resulte de uma modificação pós-traducional de proteólise do Hge024;
- Devido à diferença encontrada entre as massas moleculares teórica e experimental em ambos os peptídeos 1.3 e 7.5, sugere-se o aprofundamento do estudo de suas sequências com o intuito de elucidá-las e confirmá-las;
- Por fim, deve-se avaliar a atividade bloqueadora dos peptídeos encontrados sobre linfócitos humanos com o intuito de examinar a possibilidade de que esses venham a se tornar candidatos a um novo tratamento para a esclerose múltipla.

REFERÊNCIAS

- AHMED, H.; TERUNA, J. S. **Immune modulating peptides for the treatment and suppression of multiple sclerosis**. Elsevier, v. 114, p. 127-138, 2012.
- BÄÄRNHIELM, M.; OLSSON, T.; ALFREDSSON, L. **Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis**. Multiple Sclerosis Journal, v. 20, n. 6, p.726-732, 2014.
- BAGDAANY, M. **Anuroctoxin, a New Scorpion Toxin of the -KTx 6 Subfamily, Is Highly Selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion Channels of Human T Lymphocytes**. Molecular Pharmacology, v. 67, n. 4, p.1034-1044, 2005.
- BATISTA, C. V. F. *et al.* **Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities**. Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics, v. 1601, n. 2, p.123-131, 2002.
- BATISTA, C. *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, 2007.
- BEETON, C. *et al.* **Selective Blocking of Voltage-Gated K⁺ Channels Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits T Cell Activation**. The Journal Of Immunology, v. 166, n. 2, p.936-944, 2001a.
- BEETON, C. *et al.* **Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis**. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, v. 98, n. 24, p.13942-13947, 2001b.
- BEETON, C. **Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases**. Molecular Pharmacology, v. 67, n. 4, p.1369-1381, 2005.
- BEETON, C. *et al.* **Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases**. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, v. 103, n. 46, p.17414-17419, 2006.
- BEETON, C.; PENNINGTON, M. W.; NORTON, R. S. **Analogs of the Sea Anemone Potassium Channel Blocker ShK for the Treatment of Autoimmune Diseases**. Inflammation & Allergy - Drug Targets, v. 10, n. 5, p.313-321, 2011.
- BENZANILLA, F. **The voltage sensor in voltage-dependent ion channels**. Physiology Reviews, v. 80, p. 555-592, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Portaria nº 391, Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla.** Diário Oficial da União, Brasília-DF, nº 84, maio, seção 1, p. 40. 2015.

BRELAND, A. E.; CURRIER, R. D. **Scorpion venom and multiple sclerosis.** The Lancet, v. 322, n. 8357, p.1021, 1983.

BRIGGS, D. E. G. **Scorpions take to the water.** Nature, v. 326, n. 6114, p.645-646, 1987.

CAHALAN, M. D.; CHANDY, K. G. **Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression.** Current Opinion In Biotechnology, v. 8, n. 6, p.749-756, 1997.

CAHALAN, M. D.; WULFF, H.; CHANDY, K. G. **Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System.** Journal Of Clinical Immunology, v. 21, n. 4, p.235-252, 2001.

CAMARGO, A. C. *et al.* **Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril.** Toxicon, v. 59, n. 4, p.516-523, 2012.

CASSETTA, I.; IULIANO, G.; FILIPPINI, G. **Azathioprine for multiple sclerosis.** Cochrane Database Of Systematic Reviews, v. 4, p. CD003982, 2007.

CASTAÑEDA, O. *et al.* **Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*.** Toxicon, v. 33, n. 5, p.603-613, 1995.

CHEN, Z. *et al.* **Hg1, Novel Peptide Inhibitor Specific for Kv1.3 Channels from First Scorpion Kunitz-type Potassium Channel Toxin Family.** Journal Of Biological Chemistry, v. 287, n. 17, p.13813-13821, 2012.

CHEN, Z. *et al.* **ImKTx1, a new Kv1.3 channel blocker with a unique primary structure.** Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology, v. 25, n. 4, p.244-251, 2011.

CHI, V. *et al.* **Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases.** Toxicon, v. 59, n. 4, p.529-546, 2012.

CHIPPAUX, J. P. **Emerging options for the management of scorpion stings.** Drug Design, Development And Therapy, v. 6, p.165-173, 2012.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. **Epidemiology of scorpionism: A global appraisal.** Acta Tropica, v. 107, n. 2, p.71-79, 2008.

COETZEE, A. W. *et al.* **Molecular diversity of K⁺ channels.** Annals Of The New York Academy Of Sciences, v. 868, n. 1, p.233-285, 1999.

CONDE, R. *et al.* **Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom.** Febs Letters, v. 471, n. 2-3, p.165-168, 2000.

COMI, G. *et al.* **Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta- 1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): a phase 3 randomised controlled trial.** *The Lancet Neurology*, v. 11, n. 1, p. 33-41, 2012.

COMPSTON, A.; COLES, A. **Multiple sclerosis.** *The Lancet*, v. 359, n. 9313, p.1221-1231, 2002.

CORRY, B. *et al.* **Mechanisms of Permeation and Selectivity in Calcium Channels.** *Biophysical Journal*, v. 80, n. 1, p.195-214, 2001.

DAUPLAIS, M. *et al.* **On the Convergent Evolution of Animal Toxins: conservation of diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures.** *Journal Of Biological Chemistry*, v. 272, n. 7, p.4302-4309, 1997.

DE ANDRÉS, C. de *et al.* **Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: An ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing–remitting multiple sclerosis.** *Journal Of Neuroimmunology*, v. 182, n. 1-2, p.204-211, 2007.

DE BIASI, M. *et al.* **Inactivation determined by a single site in K+ pores.** *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, v. 422, n. 4, p. 354-363, 1993.

DE COURSEY, T. E. *et al.* **Voltage-gated K+ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?.** *Nature*, v. 307, n. 5950, p.465-468, 1984.

DE LA VEGA, R. C R.; POSSANI, L. D. **Current views on scorpion toxins specific for K+-channels.** *Toxicon*, v. 43, n. 8, p.865-875, 2004.

DE LA VEGA, R.; 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.

DEMO, S. D.; YELLEN, G. **The inactivation gate of the Shaker K+ channel behaves like an open-channel blocker.** *Neuron*, v. 7, n. 5, p.743-753, 1991.

DHIB-JALBUT, S.; MARKS, S. **Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis.** *Neurology*, v. 74, n. 11, p.S17-24, 2009.

DIEGO-GARCIA, E. *et al.* **Wide phylogenetic distribution of scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of “orphan” components.** *Peptides*, v. 28, p. 31-37, 2007a.

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, 2007b.

DOYLE, D. A. **The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K+ Conduction and Selectivity.** *Science*, v. 280, n. 5360, p.69-77, 1998.

- DUDDY, M. *et al.* **Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis.** The Journal Of Immunology, v. 178, n. 10, p.6092-6099, 2007.
- DUNLOP, J. A.; SELDEN, P. A. **Scorpion Fragments from the Silurian of Powys, Wales.** Arachnology, v. 16, n. 1, p.27-32, 2013.
- FERREIRA, L. A. F.; ALVES, E.W.; HENRIQUES, O. B. **Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from Tityus Serrulatus scorpion venom.** Toxicon, v. 31, n. 8, p.941-947, 1993.
- FUJINAMI, R. S. *et al.* **Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease.** Clinical Microbiology Reviews, v. 19, n. 1, p.80-94, 2006.
- GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. **Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy.** Cell J (yakhteh), v. 19, n. 1, p.1-10, 2017.
- GASPARINI, S. *et al.* **Delineation of the Functional Site of Dendrotoxin: the functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins.** Journal Of Biological Chemistry, v. 273, n. 39, p.25393-25403, 1998.
- GELFAND, J. M. **Multiple sclerosis diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation.** Handbook Of Clinical Neurology, v. 122, p.269-290, 2014.
- GHANSHANI, S. *et al.* **Up-regulation of the IKCa1 Potassium Channel during T-cell Activation: molecular mechanism and functional consequences.** Journal Of Biological Chemistry, v. 275, n. 47, p.37137-37149, 2000.
- GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. **Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy.** Cell Journal, v. 19, n. 1, p.1-10, 2016.
- GIANGIACOMO, K. M.; CERALDE, Y.; MULLMANN, T. **Molecular basis of α -KTx specificity.** Toxicon. v. 43, p. 877-886, 2004.
- GOODMAN, A.D. *et al.* **Results of a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study.** Neurology, v. 72, n. 9, p. 806-812, 2009.
- GRAY, O.; MCDONNELL, G. V; FORBES, R. B. **Methotrexate for multiple sclerosis.** Cochrane Database Of Systematic Reviews, v. 2, p.CD03208-CD03208, 2004.
- GRISMER, S; NGUYEN, A. N.; CAHALAN, M. D. **Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology.** The Journal of General Physiology, v. 102, p. 601-630, 1993.

GUTMAN, G. A., *et al.* **Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels.** *Pharmacol*, v. 57, p.473-508, 2005.

HAAS, J. *et al.* **Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4+CD25+FOXP3+CD31+ T-cells in patients with multiple sclerosis.** *Journal Of Neuroimmunology*, v. 216, n. 1-2, p.113-117, 2009.

HAGIWARA, S.; MIYAZAKI, S.; ROSENTHAL, N. P. **Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish.** *The Journal of General Physiology*, v. 67, p. 621-638, 1976.

HARRIS, R. E.; LARSSON, H. P.; ISACOFF, E. Y. **A permanent ion binding site located between two gates of the Shaker K⁺ channel.** *Biophysical Journal*, v. 74, n. 4, p. 1808-1820, 1998.

HEGINBOTHAM, L. *et al.* **Mutations in the K⁺ channel signature sequence.** *Biophysical Journal*, v. 66, n. 4, p.1061-1067, 1994.

HOLLOMAN, J. P. *et al.* **The development of hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation as an effective treatment for multiple sclerosis.** *American Journal Of Stem Cells*, v. 2, n. 2, p.95-107, 2013.

HOSHI, T.; ZAGOTTA, W. N.; ALDRICH, R. W. **Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: Effects of alterations in the carboxy-terminal region.** *Neuron*, v. 7, n. 4, p.547-556, 1991.

IUPHAR/BPS. **Guide to Pharmacology.** Disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/IonChannelListForward?class=VGIC>>. Acessado em 11/05/2016, 2016.

KASPER, L. H.; SHOEMAKER, J. **Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system.** *Neurology*, v. 74, n. 11, p.2-8, 2010.

KENEALY, S.J.; PERICAK-VANCE, M.A.; HAINES, J.L. **The genetic epidemiology of multiple sclerosis.** *Journal of Neuroimmunology*, v. 143, p.7-12, 2003.

KHAN, F. *et al.* **Multidisciplinary rehabilitation for adults with multiple sclerosis.** *Postgraduate Medical Journal*, v. 84, n. 993, p.385-385, 2008.

KHAN, O. *et al.* **Three times weekly glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis.** *Annals Of Neurology*, v. 73, n. 6, p.705-713, 2013.

KIVISÄKK, P. *et al.* **Expression of CCR7 in multiple sclerosis: Implications for CNS immunity.** *Annals Of Neurology*, v. 55, n. 5, p.627-638, 2004.

KOO, G.C. *et al.* **Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo.** *The Journal of Immunology*, v. 158, p. 5120-5128, 1997.

KOUCHAKI, E.; SALEHI, M.; REZA, S. M. **Nikoueinejad H, Akbari H. Numerical status of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) and CD8(+)CD28(-) regulatory T cells in multiple sclerosis.** Iranian journal of basic medical sciences, v. 17, n.4, p.250–255, 2014.

KOZLOV, S *et al.* **Purification and cDNA cloning of an insecticidal protein from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*.** Toxicon, v. 38, n. 3, p.361-371, jan. 2000.

KUZMENKOV, A. I.; GRISHIN, E. V.; VASSILEVSKI, A. A. **Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins.** Biochemistry, v. 80, n. 13, p.1764-1799, 2015.

LAMANTIA, L. *et al.* **Cyclophosphamide for multiple sclerosis.** Cochrane Database Of Systematic Reviews, v. 2, n.6, p.CD002819-CD002819, 2009.

LEONARD, R. J. *et al.* **Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T-lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, p. 10094-10098, 1992.

LEWIS, R. S. **Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes.** Annual Review Of Immunology, v. 19, n. 1, p.497-521, 2001.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. **Therapeutic potential of venom peptides.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 2, n. 10, p.790-802, 2003.

LIU, Y.; JURMAN, M.; YELLEN, G. **Dynamic Rearrangement of the Outer Mouth of a K⁺ Channel during Gating.** Neuron, v. 16, n. 4, p.859-867, 1996.

LOMA, I. HEYMAN, R. **Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment.** Current Neuropharmacology, v. 9, n. 3, p.409-416, 2011.

LOOTS, E., ISACOFF, E. Y. **Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K⁺ channel.** The Journal of General Physiology, v. 112, n. 4, p. 377-389, 1998

MACKINNON, R; MILLER, C. **Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor.** Science, v. 245, n. 4924, p.1382-1385, 1989.

MACKINNON, R. **Potassium channels.** Febs Letters, v. 555, n. 1, p.62-65, 2003.

MANNUZZU, L. M.; MONOTE, M. M.; ISACOFF, E. Y. **Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating.** Science, v.271, p.213-216, 1996.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. *at al.* **Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the**

South American scorpion *Tityus serrulatus*. Federation of European Biochemical Societies, v. 302, p. 220-222, 1992.

MATTESON, D. R.; DEUTSCH, C. **K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion.** Nature, v. 307, n. 5950, p.468-471, 1984.

MINTY, A. *et al.* **Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses.** Nature, v. 362, n. 6417, p.248-250, 1993.

MOCZYDLOWSKI, E.; LUCCHESI, K.; RAVINDRAN, A. **An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels.** The Journal Of Membrane Biology, v. 105, n. 2, p.95-111, 1988.

MOUHAT, S. *et al.* **Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels.** Biochemical Journal, v. 378, n. 3, p.717-726, 2004.

MOUHAT, S. *et al.* **K⁺channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom.** Biochemical Journal, v. 385, n. 1, p.95-104, 2005.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. **Atlas of EM 2013:** mapping multiple sclerosis around the world. London, 2013.

NEWTON, K. A. *et al.* **Mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of the Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*: biotope-specific variation in the expression of venom peptides.** Rapid Communications In Mass Spectrometry, v. 21, n. 21, p.3467-3476, 2007.

O'GORMAN, C. *et al.* **Smoking increases the risk of multiple sclerosis in Queensland, Australia.** Journal Of Clinical Neuroscience, v. 21, n. 10, p.1730-1733, 2014.

OCHOA, J. A. *et al.* **Systematic Revision of the Andean Scorpion Genus *Orobothriurus Maury, 1976* (Bothriuridae), with Discussion of the Altitude Record for Scorpions.** Bulletin Of The American Museum Of Natural History, v. 359, p.1-90, 2011.

OCLESE, R. *et al.* **Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K⁺ channels.** The Journal of General Physiology, v. 110, n.5, p. 579-589, 1997.

ORTIZ, E. *et al.* **Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera.** Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects, v. 1840, n. 6, p.1738-1746, 2014.

OUKKACHE, N. *et al.* **New analysis of the toxic compounds from the *Androctonus mauretanicus mauretanicus* scorpion venom.** Toxicon, v. 51, n. 5, p.835-852, 2008.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. **The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation.** *Immunity*, v. 28, n. 4, p.454-467, 2008.

PANYI, G. **Ion channels and lymphocyte activation.** *Immunology Letters*, v. 92, n. 1-2, p.55-66, 2004.

PANYI, G. **Biophysical and Pharmacological Aspects of K⁺ Channels in T Lymphocytes.** *European Biophysics Journal*, v. 34, n. 6, p.515-530, 2005.

PENNINGTON, M. W. *et al.* **Engineering a Stable and Selective Peptide Blocker of the Kv1.3 Channel in T Lymphocytes.** *Molecular Pharmacology*, v. 75, n. 4, p.762-773, 2009.

PIMENTA, A. M. C. *et al.* **Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae).** *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, v. 15, n. 17, p.1562-1572, 2001.

PISCIOTTA, M. *et al.* **Fast K⁺ currents from cerebellum granular cells are completely blocked by a peptide purified from *Androctonus australis* Garzoni scorpion venom.** *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes*, v. 1468, n. 1-2, p.203-212, 2000.

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

PRENDINI, L. **Scorpion Diversity and Distribution in Southern Africa: Pattern and Process.** *African Biodiversity: Molecules, Organisms, Ecosystems*, p.25-68, 2005.

PRENDINI, L.; WHEELER, W. C. **Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing.** *Cladistics*, v. 21, n. 5, p.446-494, 2005.

PRENDINI, L. **Order Scorpiones C.L. Koch, 1850.** *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness*, v. 3148, p. 115–177, 2011.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. *et al.* **Scorpion venom components that affect ion-channels function.** *Toxicon*, v. 76, p.328-342, 2013.

RACKE, M. K.; LOVETT-RACKE, A. E.; KARANDIKAR, N. J. **The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis.** *Neurology*, v. 74, n. 11, p.S25-30, 28 2009.

RATES, B. *et al.* ***Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity.** *Toxicon*, v. 52, n. 5, p.611-618, 2008.

ROBERTSON, D. W.; STEINBERG, M. I. **Potassium channel modulators: scientific applications and therapeutic promise.** *Journal Of Medicinal Chemistry*, v. 33, n. 6, p.1529-1541, 1990.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. **Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance**. Annual Review Of Immunology, v. 22, n. 1, p.745-763, 2004.

SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; FRANCKE, O. F.; PRENDINI, L. **Shining a light into the world's deepest caves: phylogenetic systematics of the troglobiotic scorpion genus *Alacran* Francke, 1982 (*Typhlochactidae* : *Alacraninae*)**. Invertebrate Systematics, v. 28, n. 6, p.643-664, 2014.

SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. *et al.* **Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity**. Toxins, v. 8, n. 1, p.2-18. 2015.

SAUCEDO, A. L. *et al.* **New Tricks of an Old Pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing**. Journal Of Biological Chemistry, v. 287, n. 15, p.12321-12330, 2012.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. **Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses**. Advances In Immunology, v. 96, p.41-101, 2007.

SCHOPPA, N. *et al.* **The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels**. Science, v. 255, n. 5052, p.1712-1715, 1992.

SCHWARTZ, E. F. *et al.* **Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones)**. BMC Genomics, v. 8, n. 1, p.119-131, 2007.

SCHWARTZ, E. F. *et al.* **Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors**. British Journal Of Pharmacology, v. 157, n. 3, p.392-403, 2009.

SINGER, B. *et al.* **Comparative injection-site pain and tolerability of subcutaneous serum-free formulation of interferon beta-1a versus subcutaneous interferon beta-1b: results of the randomized, multicenter, Phase IIIb REFORMS study**. BMC Neurology, v. 12, p.154, 2012.

SWARTZ, K. J. **Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels**. Toxicon, v. 49, n. 2, p.213-230, 2007.

SHAKKOTTAI, V. G. **Design and Characterization of a Highly Selective Peptide Inhibitor of the Small Conductance Calcium-activated K⁺ Channel, *SkCa₂***. Journal Of Biological Chemistry, v. 276, n. 46, p.43145-43151, 2001.

SHEN, K. Z. *et al.* **Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus oocytes*: Evidence for tetrameric channel formation**. Pflugers Archiv European Journal Of Physiology, v. 426, n. 5, p.440-445, 1994.

SHIEH, C.-c *et al.* **Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities.** *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 1, p.557-593, 2000.

SIGWORTH, F. J. **Voltage gating of ion channels.** *Quarterly Reviews Of Biophysics*, v. 27, n. 01, p.1-40, 1994.

SLOKA, S. *et al.* **A Quantitative Analysis of Suspected Environmental Causes of MS.** *Canadian Journal Of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, v. 38, n. 1, p.98-105, 2011.

SOLWGLAD M. E.; FET, V. **High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (*Scorpiones: Orthosterni*).** *Euscorpius*, v. 11, p.1-175, 2003.

SPEER, G. **Impact of vitamin D in neurological diseases and neurorehabilitation: from dementia to multiple sclerosis.** Part I: the role of vitamin D in the prevention and treatment of multiple sclerosis. *Ideggyógyászati szemle*, v. 66, n.9-10, p. 293–303, 2013.

SRINIVASAN, K. N. *et al.* **Kappa-Hefutoxin1, a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function.** Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 277, n. 33, p.30040-30047, 2002.

STARKUS, J. G, *et al.* **Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels.** *The Journal of General Physiology*, v. 110, n. 5, p. 539-550, 1997.

TORRES-LARIOS, A. *et al.* **Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*.** *European Journal Of Biochemistry*, v. 267, n. 16, p.5023-5031, 2000.

TYTGAT, J. *et al.* **A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies.** *Trends In Pharmacological Sciences*, v. 20, n. 11, p.444-447, 1999.

UNIPROT. **Hadrurus.** Taxonomy results, 2017a. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=ancestor%3a88315>>. Acessado em 30/05/2017.

UNIPROT. **Scorpion potassium channel toxins: nomenclature and list of entries.** Swiss-Prot Protein Knowledgebase, 2017b. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/docs/scorpctx>> . Acessado em 30/05/2017

VALVERDE, P.; KAWAI, T.; TAUBMAN, M. A. **Selective Blockade of Voltage-Gated Potassium Channels Reduces Inflammatory Bone Resorption in Experimental Periodontal Disease.** *Journal Of Bone And Mineral Research*, v. 19, n. 1, p.155-164, 2004.

VARGA, Z. *et al.* **Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells.** *Molecular Pharmacology*, v. 82, n. 3, p.372-382, 2012.

VERANO-BRAGA, T. *et al.* **Moving Pieces in a Venomic Puzzle: Unveiling Post-translationally Modified Toxins from *Tityus serrulatus***. *Journal Of Proteome Research*, v. 12, n. 7, p.3460-3470, 2013.

VOLLMER, T.; STEWART, T.; BAXTER, N. **Mitoxantrone and cytotoxic drugs' mechanisms of action**. *Neurology*, v. 74, n. 11, p.S41-S46, 2009.

WADDINGTON, J.; RUDKIN, D. M.; DUNLOP, J. A. **A new mid-Silurian aquatic scorpion--one step closer to land?** *Biology Letters*, v. 11, n. 1, 2015.

WILLIAMS, S.C. **Scorpions of Baja California, Mexico, and Adjacent Islands**. *Occasional Papers California Academy of Sciences*, v. 195, p. 1 - 127, 1980.

WULFF, H. *et al.* **The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS**. *Journal Of Clinical Investigation*, v. 111, n. 11, p.1703-1713, 2003.

WULFF, H.; CASTLE, N. A.; PARDO, L. A. **Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 12, p.982-1001, 2009.

YAN, R. *et al.* **A new natural α -helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV**. *Peptides*, v. 32, n. 1, p.11-19, 2011.

YANG, Y.; YAN, Y.; SIGWORTH, F. J. **How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?** *The Journal of General Physiology*, v.109, n. 6, p. 779-789, 1997.

ZAGOTTA, W. N. **Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation**. *The Journal Of General Physiology*, v. 103, n. 2, p.321-362, 1994.

ZEH, D. W. **The Biology of Scorpions**. *Science*, v. 249, n. 4973, p.1176-1177, 1990.

ZENG, X.; CORZO, G.; HAHIN, R. **Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges**. *Iubmb Life (international Union Of Biochemistry And Molecular Biology: Life)*, v. 57, n. 1, p.13-21, 2005.

ZENG, X.-C. *et al.* **Identification and molecular characterization of three new K⁺-channel specific toxins from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch revealing intronic number polymorphism and alternative splicing in duplicated genes**. *Peptides*, v. 34, n. 2, p.311-323, 2012.

ZHANG, S. M. *et al.* **Dietary fat in relation to risk of multiple sclerosis among two large cohorts of women**. *American journal of epidemiology*, v. 152, n.11, p. 1056–1064, 2000.

ZHENG, W., ZHANG, Y. P. **Research progress on a new potassium channel-blocking agent-4-aminopyridine**, *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, v. 17, p. 254-258, 1986.

ZHU, J.; PAUL, W. E. **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** Blood, v. 112, n. 5, p.1557-1569, 2008.

ZWEIFACH, A.; LEWIS, R. S. **Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America of the United States of America, v. 90, n. 13, p. 6295–6299, 1993.