UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

*Efeitos de α e β -neurotoxinas da peçonha do escorpião Tityus serrulatus
sobre a liberação de catecolaminas, pressão arterial,
captação de neurotransmissores e concentração de cálcio
em células de músculo liso de aorta de ratos*

FLÁVIO DE VASCONCELOS

RIBEIRÃO PRETO
2006

FLÁVIO DE VASCONCELOS

*Efeitos de α e β -neurotoxinas da peçonha do escorpião Tityus serrulatus
sobre a liberação de catecolaminas, pressão arterial,
captação de neurotransmissores e concentração de cálcio
em células de músculo liso de aorta de ratos*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

RIBEIRÃO PRETO
2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Vasconcelos, Flávio de

*Efeitos de α e β -neurotoxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* sobre a liberação de catecolaminas, pressão arterial, captação de neurotransmissores e concentração de cálcio em células de músculo liso de aorta de ratos.*

Ribeirão Preto, 2006.

139 f. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de Concentração: Toxicologia
Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. *Tityus serrulatus*. 2. Neurotoxinas escorpiônicas. 4. Pressão arterial. 5. Catecolaminas. 6. Neurotransmissores cerebrais. 7. Músculo liso - aorta de ratos. 8. Cálcio citoplasmático.

Flávio de Vasconcelos

Efeitos de α e β -neurotoxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*
sobre a liberação de catecolaminas, pressão arterial,
captação de neurotransmissores e concentração de cálcio
em células de músculo liso de aorta de ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.
Área de Concentração: Toxicologia

Trabalho defendido e aprovado em ____/____/2006

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico esta Tese aos meus pais: Pedro e Zilda Vasconcelos,
por minha educação, formação e pelos mais belos exemplos
de honestidade, dignidade, simplicidade e bondade ...
Pela compreensão, apoio e ajuda em todas
as mais difíceis e atribuladas fases de minha vida ...
E, sobretudo, pelo imprescindível e incondicional amor de sempre ...*

*À minha Andressa Rodrigues Garcia,
Por sua compreensão, paciência, carinho e conforto
nos momentos de impaciência, aborrecimento, angústia e tristeza ...
Por seu sincero amor de mulher e companheira...*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga,
pela orientação criteriosa e precisa, pelos ensinamentos edificantes,
pela incansável disposição em tirar sempre nossas dúvidas,
pela paciência nesses quase oito anos de convívio acadêmico,
e, sobretudo, pela oportunidade da conquista de mais este Título.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Vera Lúcia Lanchote (Laboratório de Análises Toxicológicas da FCFRP-USP) pela permissão do uso dos equipamentos e provisão de reagentes de seu Laboratório e pela inestimável colaboração, tornando possível o enriquecimento deste trabalho;

A Dra. Alessandra L. Cecchini, pelas valiosas trocas de conhecimentos e pela realização dos experimentos envolvendo captação de neurotransmissores, e à Dra. Susan G. Amara (Department of Neurobiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh (PA), USA) pela permissão do uso de técnicas e de equipamentos de seu Laboratório;

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio (FMRP-USP), que com sua respeitável experiência e admirável conhecimento, sempre vem contribuindo com nosso grupo de pesquisas em nossos experimentos e com nossas publicações;

A Profa. Dra. Suely Vilela (Laboratório de Toxinologia, FCFRP-USP) pela permissão do uso dos equipamentos e reagentes de seu Laboratório;

Ao Doutorando Mário dos Anjos Neto Filho (Laboratório de Farmacologia - FCFRP-USP) e a técnica Mayara Gomes, pelo auxílio e realização dos ensaios com células de MLV de aorta de ratos;

A Farmacêutica Sônia A.C. Dreossi (Laboratório de Análises Toxicológicas da FCFRP-USP) pelo auxílio na determinação de catecolaminas plasmáticas;

A Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack (Laboratório de Farmacologia, FCFRP-USP) pela permissão do uso de equipamentos de seu laboratório e pela colaboração no trabalho e aos demais docentes, por permitirem meu acesso ao laboratório;

A nossa secretária, Maria Aparecida de Almeida Segato (Cidinha), por realizar seu trabalho sempre com muita paciência, inigualável disposição e boa vontade e com alegria;

Ao Vítor e Josinete e ao pequeno João Vítor, que foram uma verdadeira família para mim aqui em Ribeirão Preto, sempre me apoiando nas etapas “tenebrosas” do meu Doutorado, me tratando com toda atenção, respeito, carinho, amizade e consideração. Jamais poderia esquecer o quanto foram e serão importantes para mim;

Aos amigos da pós-graduação: Ricardo Marreto, Otávio Carrera, Josiele Araújo, José Henrique Bomfim, e, em especial ao Wilson R. Malfará, Edemilson C. Conceição, Silvio Costa, Nádia Martins e ao Cristiano Quaresma, pelo apoio, pela amizade e pela força nos momentos críticos;

A grande amiga, Dra. Rosane G. P. Queiroz, pela inestimável ajuda nos momentos em que mais precisei;

Aos colegas pós-graduandos do laboratório: Welligton Santussi, Antônio Flávio Marongio, Aristides Quintero e Daniela Bertazzi, pelo agradável convívio, troca de idéias e pela bem vinda ajuda de sempre;

Aos Profs. Drs. Antônio Caliri, Fernando Barroso e Marco Antônio e a Dra. Cristina Nonato, bem como aos seus pós-graduandos e estagiários, pelo aprazível convívio diário;

Aos demais funcionários, técnicos e servidores, que tornaram possível a realização deste trabalho;

Meu profundo respeito e gratidão aos animais de laboratório, que cederam suas vidas (contra sua própria vontade) para que fosse possível a realização deste trabalho;

As agências brasileiras de fomento à pesquisa: CAPES (pela bolsa), CNPq (pelo auxílio financeiro) e FAPESP (pela contribuição);

E, a todos aqueles que, pelo simples convívio ao longo destes anos, se aproximaram de mim pelo vínculo da experiência comum, me ensinando muito mais que possam sequer imaginar sobre relações humanas ...

“A mais bela coragem é a confiança que devemos ter na capacidade do nosso esforço” (Coelho Neto)

**Este trabalho foi realizado e desenvolvido
nos seguintes laboratórios:**

Laboratório de Toxinas Animais

(Laboratório de Físico-Química)
Departamento de Física e Química,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Ribeirão Preto (SP)
Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

Laboratório de Toxinologia

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Ribeirão Preto (SP)
Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio

Laboratório de Análises Toxicológicas

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Ribeirão Preto (SP)
Profa. Dra. Vera Lúcia Lanchote

Laboratório de Farmacologia

Departamento de Física e Química,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Ribeirão Preto (SP)
Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Laboratory of Neurobiology

Department of Neurobiology,
University of Pittsburgh School of Medicine,
Pittsburgh (PA), USA
Prof. Susan G. Amara, Ph.D

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
INTRODUÇÃO: PEÇONHAS, VENENOS E TOXINAS	1
ESCORPIÕES: UMA VISÃO GERAL	2
PEÇONHA DE ESCORPIÕES	3
ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE TOXINAS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES	4
NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS	6
TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA Ca^{+2}	7
TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA Cl^-	8
TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA K^+	8
TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA Na^+	10
β -neurotoxinas escorpiônicas	11
α -neurotoxinas escorpiônicas	13
O CANAL PARA Na^+ , O POTENCIAL DE AÇÃO E O PAPEL DAS NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS	14
A TOXICIDADE DA PEÇONHA E SUAS TOXINAS: DA ALTERAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA AOS EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DO ENVENENAMENTO ESCORPIÔNICO	16
EFEITOS DE TOXINAS ESCORPIÔNICAS SOBRE PREPARAÇÕES ISOLADAS E LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES	19
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 MATERIAIS	25
3.1.1 PEÇONHA	25
3.1.2 ANIMAIS	25

3.1.3 REAGENTES E DROGAS ESPECIAIS.....	26
3.1.4 EQUIPAMENTOS.....	28
3.2 MÉTODOS.....	30
3.2.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA SOLÚVEL (TSV).....	30
3.2.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS DA PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i> E DAS TOXINAS TstX-I E TstX-V.....	30
3.2.3 ENSAIO DE LETALIDADE DA TSV.....	30
3.2.4 PURIFICAÇÃO E CRITÉRIOS DE PUREZA DAS TOXINAS TstX-I e TstX-V.....	31
3.2.4.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i>	31
3.2.4.2 DETERMINAÇÃO DO GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO.....	32
3.2.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DAS FRAÇÕES XI E XIII DA PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i>	32
3.2.4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SEM SDS PARA PROTEÍNAS BÁSICAS..	33
3.2.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	34
3.2.6 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM).....	35
3.2.7 ANÁLISE DE CATECOLAMINAS EM PLASMA DE RATOS.....	36
3.2.7.1 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DOS PLASMAS.....	36
3.2.7.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO E ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS ANALÍTICOS	37
3.2.7.3 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	39
3.2.7.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	40
3.2.8 ISOLAMENTO DE SINAPTOSOMAS CÓRTICO-CEREBRAIS (SCCR) E ESTRIADO-CEREBRAIS DE RATOS (SECR).....	42
3.2.9 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES.....	43
3.2.10 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE ³ H-GABA, ³ H-L-GLU E ³ H-DA NA AUSÊNCIA DE Ca ²⁺ OU PRESENÇA DE TTX.....	44
3.2.11 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE ³ H-GABA EM CÉLULAS COS-7.....	44
3.2.11.1 PREPARO DAS CÉLULAS COS-7.....	44
3.2.11.2 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE ³ H-GABA.....	45
3.2.12 MONITORAMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE GLIOMA C6.....	45
3.2.12.1 PREPARO DAS CÉLULAS DE GLIOMA C6.....	45
3.2.12.2 MONITORAMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA.....	46
3.2.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca ²⁺ INTRACELULAR EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE AORTA DE RATOS.....	47
3.2.13.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR	47
3.2.13.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE MLV.....	47

3.2.13.3 CARREGAMENTO DAS CÉLULAS DE MLV COM A SONDA FURA-2/AM.....	48
3.2.13.4 MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE CÁLCIO ($[Ca^{+2}]_c$).....	49
3.2.13.5 PROTOCOLOS ESPECÍFICOS PARA MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$	50
A) MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO BASAL DE Ca^{+2} CITOPLASMÁTICO.....	50
B) MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$ EM PRESENÇA DE KCl 60 mM.....	50
C) MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$ EM PRESENÇA DA TsV.....	50
D) MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$ EM PRESENÇA DAS NEUROTOXINAS TstX-V E TstX-I.....	50
3.2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO DA TsV E DAS TOXINAS TstX-I E TstX-V.....	52
4.2 ENSAIO DE LETALIDADE.....	52
4.3 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i>	52
4.4 CLAE DAS FRAÇÕES XI E XIII DA PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i>	53
4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) SEM AGENTES DESNATURANTES PARA PROTEÍNAS BÁSICAS.....	56
4.6 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) EM RATOS INJETADOS COM AS TOXINAS TstX-I E TstX-V DA TsV.....	58
4.7 ANÁLISE DE CATECOLAMINAS EM PLASMA DE RATOS.....	63
4.8 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES.....	71
4.9 DETERMINAÇÃO DA $[Ca^{+2}]_c$ EM CÉLULAS DE MLV DE AORTA DE RATOS.....	83
5. DISCUSSÃO.....	91
6. CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	- Adrenalina
AcN	- Acetonitrila
AMBIC	- Tampão bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3)
ANOVA	- Análise de Variância
BCA	- Ácido Bicinchonínico
BSA	- Albumina de soro bovino
CAs	- Catecolaminas
Ca_v	- Canais para Ca^{+2} sensíveis à voltagem
Ci	- Curie ($1\text{Ci} = 3,7 \times 10^{10}$ desintegrações/seg)
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	- Carboximetil-Celulose
CMV	- Citomegalovírus
$[\text{Ca}^{+2}]_c$	- Concentração citoplasmática de cálcio
$[\text{Na}^+]_i$	- Concentração de Na^+ intracelular
DA	- Dopamina
DAT	- Transportador de Dopamina
DIBAC₄(3)	- bis[ácido-(5)1,3-dibutilbarbiturico] trimethin-eoxolnol
DL₅₀	- Dose Letal Mediana
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DPBEA	- Ácido Difenil-Boro Etanolamina
DTT	- Ditiotreitól
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	- Ácido etilenoglicol bis (β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'- tetracético
EPM	- Erro Padrão da Média
FURA-2/AM	- Ácido tetracético 1-[6-amino-2-(5-carbóxi-2-oxazol)-5-benzofuranilóxi]etano-N,N,N',N' penta acetóxi-metil éster
GABA	- Ácido γ -aminobutírico
GAT-1	- Transportador de GABA tipo 1, sensível ao ácido <i>cis</i> -1,3-aminociclohexanocarboxílico
GAT-3	- Transportador de GABA do tipo 3, sensível à β -alanina.
GBR 12909	- Dihidrocloreto de 1-(2-[bis(4-fluorofenil)-metóxi]-etil)-4-(3-fenilpropil) piperazina (Dihidrocloreto de Vanoxerina)

Glu	- Glutamato
HEPES	- Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfónico
i.p.	- Intraperitoneal
i.v.	- Intravenoso
MLV	- Músculo liso vascular
NA	- Noradrenalina
Na_v	- Canais para Na ⁺ sensíveis à voltagem
NT	- Neurotransmissor
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PAM	- Pressão Arterial Média
PBS	- Salina tamponada em fosfato (phosphate buffer saline)
PDC	- Ácido 2,4 dicarboxílico –L-trans-pirrolidina
PE	- Polietileno
RO-41-096	- 2'-Fluoro-3,4-dihidróxi-5-nitrobenzofenona
SCCR	- Sinaptosomas córtico-cerebrais de ratos
SECR	- Sinaptosomas de estriado cerebral de ratos
SDS	- Dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)
SFB	- Soro fetal bovino
SNC	- Sistema nervoso central
SNP	- Sistema nervoso periférico
TFA	- Ácido Trifluoroacético
TEMED	- N, N, N' N' – Tetrametilenodiamina
ToABR	- Brometo de tetraoctilamônio
TRIS-HCl	- Cloridrato de hidroximetil-aminometano
TsTX-I	- Tityus toxina I
TsTX-V	- Tityus toxina V
TsV	- Peçonha solúvel do escorpião <i>T. serrulatus</i>
TTX	- Tetrodotoxina

LISTA DE TABELAS

TABELA I	- Neurotoxinas que atuam em canais para Na ⁺ dependentes de voltagem e seus respectivos locais de ligação aos sítios receptores.....	10
TABELA II	- Recuperação das frações obtidas da cromatografia da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	52
TABELA III	- Recuperação das subfrações obtidas a partir da CLAE da fração XI da TsV.....	54
TABELA IV	- Recuperação das subfrações obtidas a partir da CLAE da fração XIII da TsV.....	55
TABELA V	- Valores de precisão e exatidão do limite de quantificação da NA e ADR (usados como referência para determinação de catecolaminas plasmáticas nos controles e animais injetados com TsTX-V).....	68
TABELA VI	- Valores de precisão e exatidão do limite de quantificação da NA e ADR (usados como referência para determinação de catecolaminas plasmáticas em animais injetados com TsV e TsTX-I).....	68
TABELA VII	- Resultados obtidos na avaliação da recuperação média referente ao método de determinação de catecolaminas plasmáticas.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Topologia esquemática da subunidade Alfa dos canais para Na ⁺ e os sítios receptores 3 e 4 para α -e β -neurotoxinas escorpiônicas, respectivamente...	12
FIGURA 2	Procedimento de extração para análise de catecolaminas em plasma.....	41
FIGURA 3	Cromatografia de troca catiônica em carboximetil-celulose-52 da peçonha solúvel de <i>T. serrulatus</i>	53
FIGURA 4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da fração XI da TsV em coluna analítica de fase reversa C-18.....	54
FIGURA 5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da fração XIII em coluna analítica de fase reversa C-18.....	55
FIGURA 6	PAGE sem agentes desnaturantes das 13 frações obtidas da cromatografia da TsV	56
FIGURA 7	PAGE sem agentes desnaturantes dos componentes da fração XI obtida da cromatografia da TsV.....	57
FIGURA 8	Registro contínuo representativo da PAM de rato injetado com TsV (250 μ g/kg)	58
FIGURA 9	Registro contínuo representativo da PAM em ratos injetados com : A) TsV (100 μ g/kg); B) TsTX-I (30 μ g/kg); C) TsTX-V (30 μ g/kg).....	59
FIGURA 10	PAM de ratos conscientes e não imobilizados, injetados i.v. com: A) TsV (50 e 100 μ g/kg); B) TsTX-I (15 e 30 μ g/kg) e C) TsTX-V (15 e 30 μ g/kg).....	61
FIGURA 11	Gráfico da média da diferença na PAM entre os animais tratados com TsV ou toxinas e o controle, para cada tempo estabelecido (2,5, 30 e 90 min) após os respectivos tratamentos.....	62
FIGURA 12	Perfil cromatográfico representativo da sequência de eluição de uma solução de catecolaminas.....	63
FIGURA 13	Cromatograma representativo da eluição dos picos de catecolaminas (NA e ADR) extraídas de plasma de ratos tratados: A) salina 0,9% i.v (1000 μ L plasma) e B) TsV (100 μ g/kg, i.v) (500 μ L plasma), coletados 2,5 minutos após cada tratamento.....	64
FIGURA 14	Curva de calibração (A) e linearidade (B) para determinação de catecolaminas plasmáticas (NA e ADR) em animais controles e injetados com TsTX-V.....	66

FIGURA 15	Curva de calibração (A) e linearidade (B) para determinação de catecolaminas plasmáticas (NA e ADR) em animais injetados com TsV e TsTX-I.....	67
FIGURA 16	Níveis plasmáticos de: A) NA; B) ADR, 10 minutos antes e 2,5, 30 e 90 minutos após administração endovenosa de salina 0,9 % (controles), TsV (100 e 50 µg/kg) ou toxinas TsTX-I e TsTX-V (30 e 15 µg/kg de cada uma).	70
FIGURA 17	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-L-glutamato em SCCR na presença de concentrações crescentes de TsV.....	72
FIGURA 18	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-L-Glutamato em SCCR na presença de concentrações molares crescentes da toxina TsTX-V..	73
FIGURA 19	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-Dopamina em SCER na presença de concentrações crescentes de TsV.....	74
FIGURA 20	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-Dopamina em SCER na presença de concentrações molares crescentes da toxina TsTX-I.	75
FIGURA 21	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-Dopamina em SCER na presença de concentrações molares crescentes da toxina TsTX-V em presença de Ca ⁺² ou ausência do mesmo e na presença de tetrodotoxina (TTX)	76
FIGURA 22	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-GABA em SCCR na presença de concentrações crescentes de TsV em presença de Ca ⁺²	77
FIGURA 23	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-GABA em SCCR na presença de concentrações molares crescentes da neurotoxina TsTX-I em presença de Ca ⁺² ou ausência do mesmo.....	78
FIGURA 24	Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-GABA em SCCR na presença de concentrações molares crescentes da toxina TsTX-V.....	79
FIGURA 25	Gráfico representativo da captação de ³H-GABA pelas células COS-7 expressando os transportadores gabaérgicos GAT-1 e GAT-3 após incubação com a toxina TsTX-V em diferentes concentrações.....	80
FIGURA 26	Microscopia confocal das células de glioma C6. (A) Controle; (B) Imediatamente após à adição da TsTX-V (2,77 µM); (C) , (D) , (E) e (F) : aumento progressivo da fluorescência em 1,2,3 e 4 minutos após adição da toxina TsTX-V.....	82
FIGURA 27	Registros representativos de experimentos com células MLV de aorta de ratos. A) Carregamento das células com a sonda fluorescente FURA-2/AM (contagens/seg). Razão das intensidades de fluorescência (340/380 nm) após a perfusão das células com : B) KCl 60 mM C) TsV 100 µg/mL e D) TsV 500 µg/mL.....	84

FIGURA 28	Efeito da perfusão de KCl 60 mM e de TsV sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos.....	85
FIGURA 29	Efeito da perfusão de TsV sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de rato. Resultados expressos em porcentagem da razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) em relação ao controle (KCl 60 mM).....	86
FIGURA 30	Registros representativos de experimentos com células MLV de aorta de ratos. A) Carregamento das células com a sonda fluorescente FURA-2/AM (contagens/seg). Razão das intensidades de fluorescência (340/380 nm) após a perfusão das células com : B) KCl 60 mM C) TsTX-I 50 µg/mL e D) TsTX-V 50 µg/mL.....	87
FIGURA 31	Efeito da perfusão de KCl 60 mM e das toxinas TsTX-I e TsTX-V(50 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos.....	88
FIGURA 32	Efeito da perfusão das toxinas TsTX-I e TsTX-V (50 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de rato. Resultados expressos em porcentagem da razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) em relação ao controle (KCl 60 mM).....	88
FIGURA 33	Efeito da perfusão de KCl 60 mM e das toxinas TsTX-I e TsTX-V(100 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos.....	89
FIGURA 34	Efeito da perfusão das toxinas TsTX-I e TsTX-V (100 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de rato. Resultados expressos em porcentagem da razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) em relação ao controle (KCl 60 mM).....	90

RESUMO

VASCONCELOS, F. Efeitos de α e β -neurotoxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* sobre a liberação de catecolaminas, pressão arterial, captação de neurotransmissores e concentração de cálcio em células de músculo liso de aorta de ratos. 2006. 139p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Toxinas que atuam em canais para Na^+ operados por voltagem são as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos do envenenamento escorpiônico e podem ser divididas em duas classes: α - e β -neurotoxinas. TsTX-V e TsTX-I da peçonha de *Tityus serrulatus* (TsV) são, respectivamente, exemplos destas toxinas. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da TsV e destas toxinas sobre a pressão arterial média (PAM) e liberação de catecolaminas em ratos conscientes e não imobilizados, previamente cateterizados, bem como a captação de GABA, dopamina (DA) e glutamato (Glu) em sinaptosomas isolados de cérebro de ratos e a concentração citoplasmática de Ca^{+2} ($[\text{Ca}^{+2}]_C$) em células de músculo liso vascular de aorta de ratos. As toxinas foram isoladas por cromatografia de troca iônica (TsTX-I) seguida por CLAE de fase reversa (TsTX-V). As toxinas (15 e 30 g/kg) e TsV (50 e 100 $\mu\text{g/kg}$) foram injetadas intravenosamente. A PAM foi monitorada continuamente através do cateter femoral. Os níveis plasmáticos de adrenalina (ADR) e noradrenalina (NA) foram determinados por CLAE de fase reversa com detector eletroquímico, em 10 min antes e 2,5, 30 e 90 min após os tratamentos. Efeitos pressores máximos foram observados em 2,5–3,5 min. TsV induziu um intenso aumento de longa duração na PAM, bem como a TsTX-I. A TsTX-V mostrou efeitos pressores menores. TsV mostrou os maiores efeitos sobre a liberação de catecolaminas, seguido pela TsTX-I e TsTX-V com um efeito máximo em 2,5 min, seguido por uma gradual redução, permanecendo, todavia, maior que os controles. Embora ambas as classes de toxinas atuem em canais para Na^+ , TsTX-I mostrou efeitos mais significantes e intensos sobre a liberação de catecolaminas e pressão arterial que a TsTX-V. Parece que a toxicidade da TsTX-V não está somente relacionada à sua capacidade de liberar catecolaminas, indicando que outros neurotransmissores podem estar envolvidos em sua toxicidade. Nem a TsV ou suas toxinas foram capazes de afetar a captação de ^3H -Glu. TsTX-I inibiu somente a captação de ^3H -DA ($\text{IC}_{50} = 28,41 \text{ nM}$). Por outro lado, TsV (0,43ng/mL) inibiu a captação de ^3H -GABA e ^3H -DA (~50%). TsTX-V mostrou $\text{IC}_{50} = 9,37 \text{ nM}$ e $22,2 \text{ nM}$ para a captação de ^3H -GABA e ^3H -DA, respectivamente. Esses efeitos foram abolidos pelo pré-tratamento com TTX, indicando o envolvimento de canais para Na^+ neste processo. Na ausência de Ca^{+2} e em baixas concentrações de toxinas, a redução não é tão singnificante como na presença de Ca^{+2} . TsTX-V não reduziu a captação de ^3H -GABA em células COS-7 expressando os transportadores de GABA, GAT-1 e GAT-3, sugerindo que esta toxina reduz indiretamente o transporte. A redução da captação de ^3H -GABA pelos sinaptosomas pode ser devido a rápida e intensa despolarização celular, como revelado por microscopia confocal em células de glioma C6. Assim, TsTX-V causou redução da captação de ^3H -GABA e ^3H -DA de uma maneira independente de Ca^{+2} , não afetando diretamente os transportadores de GABA, mas em consequencia da despolarização, envolvendo canais para Na^+ operados por voltagem. TsV e suas toxinas foram capazes de aumentar a $[\text{Ca}^{+2}]_C$, provavelmente por interargir com canais para Na^+ . Quando comparado aos efeitos despolarizantes do KCl 60 mM (100 %), TsV (100 e 500 $\mu\text{g/mL}$) exibiu um aumento de $49,60 \pm 2,58 \%$ e $103,66 \pm 5,17 \%$, respectivamente, enquanto que a TsTX-I e TsTX-V (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada) exibiu $43,92 \pm 3,06 \%$ e $121,8 \pm 8,9 \%$; $52,56 \pm 8,33 \%$ e $79,5 \pm 6,1 \%$ de aumento, respectivamente. TsTX-I (100 $\mu\text{g/mL}$) mostrou-se mais potente nesta preparação, visto que uma dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ causou efeito muito mais intenso do que a TsTX-V na mesma concentração. É possível que as diferenças observadas sobre os efeitos induzidos pela TsTX-I e TsTX-V sejam consequência de alterações estruturais entre canais para Na^+ presentes em vários tipos de tecidos e inervações.

ABSTRACT

VASCONCELOS, F. **Effects of α and β -neurotoxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom on catecholamines release, arterial blood pressure, neurotransmitters uptake and calcium concentration in smooth muscle cells from rat aorta.** 2006. 139p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Voltage-gated Na^+ channel toxins are mainly responsible for the toxic effects of scorpion envenoming and can be classified into two classes: α - and β -neurotoxins. TsTX-V and TsTX-I from *Tityus serrulatus* venom (TsV) are, respectively, examples of these toxins. In this work, we evaluated the effects of TsV and its toxins on mean arterial pressure (MAP) and catecholamines release in conscious unrestrained rats previously catheterized, as well as GABA, dopamine (DA) and glutamate (Glu) uptake in isolated rat brain synaptosomes and cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_C$) in vascular smooth muscle cells from rat aorta. Toxins were isolated by ion exchange chromatography (TsTX-I) followed by RP-HPLC (TsTX-V). The toxins (15 and 30 g/kg) and TsV (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were injected intravenously. MAP was continuously monitored through femoral catheter. Epinephrine (E) and norepinephrine (NE) plasma levels were determined by RP-HPLC with electrochemical detection, at 10 min before and 2.5, 30 and 90 min after treatments. Maximal pressor effects were observed at 2.5–3.5 min. TsV induced intense long lasting increase in MAP, as did TsTX-I. TsTX-V showed the lowest pressor effects. TsV showed the highest effects on catecholamines release, followed by TsTX-I and TsTX-V with maximal effect at 2.5 min, followed by a gradual reduction, however remaining higher than controls. Although both toxins act on Na^+ channels, TsTX-I displayed significant and more intense effects on catecholamines release and blood pressure than TsTX-V. It seems that the toxicity of TsTX-V is not related only with its ability to release catecholamines, indicating that other neurotransmitters, may be involved in its toxicity. Neither the TsV or its toxins was capable to affect the ^3H -Glu uptake. TsTX-I inhibited only ^3H -DA uptake ($\text{IC}_{50} = 28.41$ nM). On the other hand, TsV (0.43 ng/mL) inhibited both ^3H -GABA and ^3H -DA uptake (~50%). TsTX-V showed $\text{IC}_{50} = 9.37$ nM and 22.2 nM for ^3H -GABA and ^3H -DA uptake, respectively. These effects were abolished by pre-treatment with TTX, indicating the involvement of Na^+ channels in this process. In the absence of Ca^{2+} and at low concentrations of toxin, the reduction is not as significant as in the presence of Ca^{2+} . TsTX-V did not reduce ^3H -GABA uptake in COS-7 cells expressing GABA transporters GAT-1 and GAT-3, suggesting that this toxin indirectly reduces the transport. The reduced ^3H -GABA uptake by synaptosomes could be due to fast and intense cell depolarization as revealed by confocal microscopy of C6 glioma cells. Thus, TsTX-V causes reduction on ^3H -GABA and ^3H -DA uptake in a Ca^{2+} -independent manner, not affecting directly GABA transporters, but, in consequence of depolarization, involving voltage-gated Na^+ channels. TsV and its toxins were able to increase the ($[\text{Ca}^{2+}]_C$), probably by interact with Na^+ channels. When compared to KCl 60 mM depolarizing effect (100 %), TsV (100 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), showed an increase of 49.60 ± 2.58 % and 103.66 ± 5.17 %, respectively, whereas TsTX-I and TsTX-V (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each) showed 43.92 ± 3.06 % and 121.8 ± 8.9 %; 52.56 ± 8.33 % and 79.5 ± 6.1 %, respectively. TsTX-I (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed most potent effects in this type of preparation, since induced most intense effect than TsTX-V in the same concentration. Thus, it is possible that the differences observed on the effects induced by both toxins are consequence of structural changes among Na^+ channels present in several types of tissues and innervations.

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO: PEÇONHAS, VENENOS E TOXINAS

A utilização biológica de peçonhas e venenos animais, como mecanismo de defesa contra agressores e predadores, captura de presas e obtenção de alimentos, é o resultado de um longo processo evolutivo, que tem ocorrido na natureza como resposta adaptativa de inúmeras espécies biológicas.

Animais venenosos e peçonhentos são encontrados em praticamente todos os continentes e climas (com mais frequência em climas tropicais e subtropicais), em todos os habitats (desde florestas equatoriais a desertos áridos) e em todas as classes de animais, incluindo alguns pássaros e pequenos mamíferos, como algumas espécies de musaranhos. Entretanto, dentre todos eles, o número de artrópodes peçonhentos é praticamente incontável.

Animais peçonhentos possuem um aparato próprio para inoculação da substância tóxica (**a peçonha**) a qual produzem em um grupo de células ou em um órgão secretório apropriado (glândula) conectado ao dispositivo para inoculação (ferrão, presa, dente, espinhos, etc). Usualmente, peçonhas têm, em sua maioria, caráter protéico e são inativadas por via enteral. Há geralmente, em sua composição, outros componentes, não necessariamente de caráter tóxico, mas biologicamente ativos, agindo como “adjuvantes” ou potencializadores da atividade tóxica;

Já os animais venenosos não possuem aparato próprio para inoculação, e a substância tóxica (**o veneno**) é produzida em glândulas ou tecidos, mas também adquirem compostos tóxicos do ambiente, de outros animais, plantas ou microorganismos. Assim, os componentes são acumulados nos tecidos ou em órgãos em particular, e fazem uso passivo do veneno (consideram-se exceções alguns sapos e salamandras). Os acidentes geralmente resultam da ingestão desses animais que contêm o veneno ou partes desses animais, bem como contato direto com pele e mucosas.

Portanto, peçonhas consistem principalmente de peptídeos ou polipeptídeos, enquanto que venenos são, muitas vezes, produtos secundários do metabolismo do animal ou planta ou ainda metabolitos produzidos por microorganismo. Venenos e peçonhas raramente são substâncias puras e consistem de vários componentes (que agem sinergicamente ou não) sendo que os que apresentam maior atividade biológica (atividade tóxica) são as **toxinas** que, quase sempre de origem natural, são quimicamente bem definidas, puras e homogêneas. (MEBS, 2002).

Toxinas de diferentes origens tem fascinado o homem por seus dramáticos efeitos farmacológicos. Elas também têm sido usadas cientificamente para elucidar diferentes mecanismos fisiológicos e usadas terapeuticamente, ou como ponto de partida no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Desta maneira, durante os últimos anos, as toxinas constituíram uma grande variedade de ferramentas, disponibilizadas para farmacologistas, fisiologistas ou bioquímicos interessados em identificar, purificar e caracterizar canais iônicos, ou receptores, com o objetivo de entender sua estrutura e função (OHIZUMI, 1997).

Constituindo-se em uma rica fonte de toxinas, peçonhas de diversos artrópodes são reconhecidas como fontes úteis de substâncias bioativas, tais como peptídeos e poliaminas-amidas, mostrando um amplo espectro de efeitos farmacológicos sobre a transmissão sináptica. Algumas dessas moléculas tem sido usadas como ferramentas para estender nosso conhecimento das bases moleculares da ação de neurotransmissão, liberação de neurotransmissores e outros mediadores bioquímicos e o melhor entendimento do seu papel fisiológico e farmacológico, bem como investigar os aspectos evolucionários de canais iônicos (OLIVEIRA e CRUZ, 2001).

ESCORPIÕES: UMA VISÃO GERAL

Os escorpiões são artrópodes quelicerados (Chelicerata), incluído entre os aracnídeos, embora haja evidência de que constituam grupo à parte. A ordem (Scorpiones) está atualmente dividida em 6 superfamílias e 20 famílias (LOURENÇO e VON EICKSTEDT, 2003). Sendo que os escorpiões de maior importância médica pertencem a família Buthidae, taxonomicamente dividida em 4 subfamílias. À subfamília Tityinae pertencem os escorpiões do gênero *Tityus*, principais causadores de acidentes graves no Brasil.

Os escorpiões mais perigosos pertencem a quatro gêneros: *Androctonus* e *Leiurus* (África do Norte e Oriente Médio), *Centruroides* (Costa Pacífica do México e zona de fronteira com os EUA) e *Tityus* (Região Sudeste e parte do Nordeste do Brasil e Ilha de Trinidad). Espécies do gênero *Buthus*, *Hottentota*, *Parabuthus* (África do Norte e do Sul, Oriente Médio e Península Arábica) e *Mesobuthus* (Índia) tem causado sérios acidentes, porém menos graves (SIMARD e WATT, 1990).

No Brasil, 3 espécies de escorpiões do gênero *Tityus* têm sido responsabilizados por acidentes graves e até mesmo fatais: *T. stigmurus*, *T. bahiensis* e *T. serrulatus*, sendo esse último responsável pela maioria dos casos de maior gravidade (BUCARETCHI et al., 1995).

T. serrulatus Lutz & Mello (escorpião amarelo) é considerado também o mais perigoso escorpião da América do Sul. No Brasil, cerca de 10.000 casos humanos de picadas deste escorpião são tratados em hospitais e notificados anualmente (CARDOSO et al., 1995). A maioria dos acidentes graves, inclusive mortes, ocorre em crianças picadas por *T. serrulatus* (CARDOSO et al., 1995; MINISTÉRIO BRASILEIRO DA SAÚDE, 1998; CUPO et al., 2003).

Segundo dados do Centro de Controle de Intoxicações da UE-HC/USP-RP, foram registrados cerca de 7.139 casos de vítimas de picadas de escorpiões na região de Ribeirão Preto, durante os anos de 1982-1997, sendo que 74,4% foram vítimas do *T. serrulatus*. Destes casos, 98,4 % necessitaram atendimento hospitalar (CUPO et al., 1998a, 1998b).

PEÇONHA DE ESCORPIÕES

A peçonha de escorpiões é produzida por um conjunto de duas glândulas localizadas no último segmento do metassoma (cauda) , onde se localiza o télson, e este termina por um aguilhão afiado, onde, perto do ápice, abrem-se dois orifícios através do qual a peçonha é ativamente inoculada.

Esta pode ser obtida por estímulo elétrico do télson, tem aspecto mucoso, opalescente e com aspecto leitoso e a composição pode variar, dependendo da espécie, da área habitada pelo animal, do tipo de dieta, etc.

A peçonha de escorpiões é antigênica e parcialmente solúvel em água e pode ser subdividido por centrifugação, obtendo-se uma fração insolúvel, geralmente não tóxica, composta de restos de membranas e organelas celulares e mucoproteínas (WATT, 1984).

A fração solúvel usualmente consiste de mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, moléculas de baixo peso molecular, como serotonina ou histamina, inibidores de proteases, liberadores de histamina, aminoácidos livres. Em alguns tipos de peçonha, há ainda a presença de catecolaminas. Diferente da maioria de peçonhas de serpentes e aranhas, muitas peçonhas escorpiônicas são geralmente desprovidas de atividade enzimática ou possuem baixos níveis de atividade enzimática, com exceção das hialuronidades (que tem o papel de “fator de espalhamento” na peçonha). Algumas espécies de escorpiões ainda possuem enzimas como fosfatase ácida, ribonucleases, acetilcolinesterases e fosfolipase A (em pequenas proporções), angiotensinas e succinato-desidrogenases e diversas proteínas básicas de baixo peso molecular (neurotoxinas) (GWEE et al., 1996; POSSANI et al., 1999; GWEE et al., 2002).

Estas neurotoxinas são os componentes mais importantes da peçonha, sob o ponto de vista toxicológico, alterando a permeabilidade iônica de células excitáveis, através da interação específica com canais para Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Cl^- dependentes de voltagem, presentes nestas células, alterando o mecanismo de ativação dos mesmos e levando a intensa despolarização e liberação massiva de neurotransmissores (ISMAIL, 1995; GORDON et al., 1998; POSSANI et al., 1999), os quais são os responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos do envenenamento.

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE TOXINAS DA PEÇONHA DE ESCORPIÕES

Após as primeiras tentativas para isolar os componentes ativos de peçonhas de escorpiões a partir de homogenados de telsons (WILSON, 1904; MOHAMED, 1944), vários melhoramentos foram sucessivamente introduzidos.

O método geral de purificação de toxinas de escorpiões, proposto por Miranda et al. (1970), consiste em: (a) extração da peçonha com água destilada, para eliminar mucoproteínas que poderiam prejudicar os passos seguintes da purificação, (b) filtração em gel de Sephadex G-50, (c) cromatografia de troca iônica (catiônica e aniônica sucessivamente). Desta forma os autores isolaram 11 neurotoxinas da peçonha dos escorpiões *Androctonus australis* Hector, *Buthus occitanus tunetanus* e *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, ativas em mamíferos, insetos ou crustáceos.

Os primeiros trabalhos de purificação de toxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* Lutz & Mello foram realizadas por Diniz e Gonçalves (1956, 1960), utilizando eletroforese em papel e gel de amido. Posteriormente, Gomez e Diniz (1966) obtiveram a partir da peçonha de *T. serrulatus* duas frações tóxicas, utilizando extração da peçonha bruta com água, filtração em gel de Sephadex G-25, seguida de cromatografia em CM-celulose. Uma destas frações apresentou-se homogênea em eletroforese em papel e foi parcialmente caracterizada por Gomes (1967), sendo denominada Tityustoxina (TsTX).

Diversas publicações (TOLEDO e NEVES, 1976; POSSANI et al., 1977; 1981; 1985; SAMPAIO et al., 1983; 1997; ARANTES et al., 1989, 1994) têm descrito fracionamentos da mesma e o isolamento de toxinas altamente purificadas.

Coutinho-Netto (1975) purificou a Tityustoxina combinando extração com amônia, filtração molecular em Sephadex G-50 e cromatografia em CM-celulose-52. A toxina obtida foi caracterizada como sendo uma proteína básica, com peso molecular de 6.995, apresentando uma cadeia polipeptídica com 61 resíduos de aminoácidos, N-terminal lisina e não revelou metionina na sua composição.

Toledo e Neves (1976) purificaram duas toxinas da peçonha de *T. serrulatus*, TsTX-I e TsTX-II, através de filtração em Sephadex G-25 e cromatografia em CM-Celulose-52, utilizando gradiente convexo de concentração de acetato de amônio para a eluição. A TsTX-I apresentou N-terminal lisina e peso molecular 6.932, enquanto que a TsTX-II revelou N-Terminal glicina e peso molecular de 8.500. Ambas apresentaram metionina em sua composição.

Possani et al. (1977), utilizando filtração em gel de Sephadex seguida de cromatografia em CM-celulose com tampão fosfato e recromatografia em CM-celulose com gradiente de NaCl em tampão acetato, obtiveram a TsTX- γ , que apresentou composição em aminoácidos semelhante à TsTX-I obtida por Toledo e Neves (1976).

Posteriormente, Possani et al. (1981), utilizando filtração em Sephadex G-50 e cromatografia em CM-celulose com gradiente de NaCl em tampão acetato de amônio, pH 4,7, conseguiram purificar 4 toxinas da peçonha de *T. serrulatus*: II-11, III-8, III-10 e IV-5. A II-11 e III-10 apresentaram a mesma composição e a mesma sequência amino-terminal da TsTX- γ (POSSANI et al., 1977). A IV-5 apresentou composição em aminoácidos semelhante à TsTX obtida por Coutinho-Netto (1975).

Possani et al. (1982) isolaram e caracterizaram parcialmente as toxinas TsII-9 e Ts-10-2, as quais bloqueiam canais de potássio e apresentam homologia com a noxiustoxina.

Sampaio et al. (1983) isolaram e caracterizaram 5 toxinas da peçonha de *T. serrulatus*: T₁VIII, T₁VI, T₂III, T₂IV e T₁IV, sendo que as T₁VIII e T₂IV apresentaram composição em aminoácidos semelhante à TsTX-I (TOLEDO e NEVES, 1976) ou TsTX- γ (POSSANI et al., 1977). Para a purificação destas toxinas os autores utilizaram filtração em Sephadex e cromatografia em CM-celulose-52 em tampão AMBIC, pH 8,0.

Arantes et al. (1989) desenvolveram metodologia para purificação da peçonha de *T. serrulatus* na qual foi abolida a filtração em gel de Sephadex. O extrato da peçonha foi cromatografado em coluna de CM-celulose-52, sendo obtidas 13 frações protéicas (I-XIII) das quais a XIII foi considerada pura. A caracterização química desta fração mostrou que a mesma é igual a toxina γ (POSSANI et al., 1977).

Em 1992, Arantes e colaboradores demonstraram que a Tityustoxina, obtida pelo processo descrito por Gomez e Diniz (1966), correspondia a um pool de vários peptídeos, e sugeriram que fosse denominada “Tityustoxina”, para diferenciá-la da toxina isolada Tityustoxina (sem aspas) ou TsTX (COUTINHO NETTO, 1975; SAMPAIO et al., 1983; SAMPAIO et al., 1991; ARANTES et al., 1989).

A caracterização incompleta e a falta de uniformidade na nomenclatura utilizada para denominar as toxinas do *T. serrulatus*, tem causado o aparecimento de nomes e símbolos confusos para designá-las. Para sanar estes problemas Sampaio et al. (1991) propuseram uma uniformização da nomenclatura baseada no primeiro componente tóxico isolado desta peçonha, a Tityustoxina (“TsTX”, GOMEZ e DINIZ, 1966; TsTX, COUTINHO-NETTO, 1975). Este trabalho reuniu sob uma mesma denominação as toxinas que se mostraram idênticas:

- TsTX para as toxinas: IV-5 (POSSANI et al., 1981), T₂III₁ (SAMPAIO et al., 1983) e X₄ (ARANTES et al., 1989);
- TsTX-I para as toxinas TsTX-I (TOLEDO e NEVES, 1976), toxina γ (POSSANI et al., 1977; 1981; 1985) T₁VIII (SAMPAIO et al., 1983), VII (BECHIS et al., 1984) e XIII (ARANTES et al., 1989);
- TsTX-II para as toxinas TsTX-II (TOLEDO e NEVES, 1976) e T₁V₁ (SAMPAIO et al., 1983);
- TsTX-III para as toxinas T₁IV (SAMPAIO et al., 1983) e III (POSSANI et al., 1985);
- TsTX-IV para a toxina X₂ (ARANTES et al., 1989).

Também foram descritas posteriormente as toxinas TsTX-V (ARANTES et al., 1994) e TsTX-VI (SAMPAIO et al., 1997).

Chaves-Olórtegui et al. (1996) purificaram e sequenciaram um peptídeo quase idêntico à TsTX-VI (MARANGONI et al., 1990), e denominaram-no de “proteína não tóxica” (TsNTxP), a qual possui uma glicina adicional na região C-terminal e na posição 50 tem um ácido aspártico em lugar do ácido glutâmico encontrado na TsTX-VI.

Em 1997, Sampaio e colaboradores isolaram a TsTX-VII, que libera ácido glutâmico e ácido gama-aminobutírico (GABA) de sinaptosomas de cérebro de rato, efeito não bloqueado pela tetrodotoxina, indicando que seu mecanismo de liberação não envolve canais de Na⁺.

NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS

O termo neurotoxinas define resumidamente compostos biologicamente ativos, que atuam em estruturas nervosas, no sistema nervoso periférico ou central, fibras nervosas, sinapses, etc. Portanto, neurotoxinas produzem sintomas sugerindo o envolvimento do SNC ou SNP.

As neurotoxinas da peçonha de escorpiões interagem com canais iônicos dependentes de voltagem, presentes em membranas de células eletricamente excitáveis, alterando o mecanismo

de ativação dos mesmos e levando a intensa despolarização e liberação massiva de neurotransmissores.

Apesar do fato de que as estruturas primárias de neurotoxinas escorpiônicas podem ser bastante diferentes (MENEZ et al., 1992), há um constante “motife” estrutural conservado, entre essas famílias de proteínas. Exceto para aquelas toxinas escorpiônicas específicas de canais para Ca^{+2} , cuja estrutura tridimensional ainda é desconhecida (VALDÍVIA e POSSANI, 1998), todos os peptídeos tóxicos de escorpiões (com raríssimas exceções) tem um núcleo denso e altamente conservado, formado por uma alfa-hélice e dois ou três motivos estruturais de folhas beta pregueadas e curtos segmentos de folha-beta anti-paralela (LEGROS e MARTIN-EAUCLEAIRE, 1999), mantidas por pontes dissulfeto (MENEZ et al., 1992; POSSANI et al., 1999; 2000).

Do total aproximado de 400 neurotoxinas escorpiônicas isoladas e caracterizadas, cerca de 200 são toxinas que interagem com canais para Na^+ , 150 com canais para K^+ , 19 com canais para Cl^- e cerca de 10 tipos de toxinas afetam canais para Ca^{+2} (ZHIJIAN et al., 2005).

TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA Ca^{+2}

Peptídeos da peçonha de escorpiões específicos para canais para Ca^{+2} são muito menos frequentes. Dois diferentes peptídeos escorpiônicos que modificam a ligação da rianodina aos canais de Ca^{+2} presentes no retículo sarcoplasmático (canais de Ca^{+2} sensíveis à rianodina) foram os primeiros peptídeos tóxicos descritos, seletivos para esses canais: isolados da peçonha do escorpião *Pandinus imperator*: um peptídeo de 33 resíduos de aminoácidos (IpTx_a) que aumenta a ligação de rianodina aos canais e o outro é um heterodímero contendo uma sub-unidade de 104 e outra de 27 resíduos de aminoácidos (IpTx_i), e inibe a ligação da rianodina à seus canais. (ZAMUDIO et al., 1997a, 1997b). Outros peptídeos de canais para Ca^{+2} sensíveis à rianodina foram descritos: Rianotoxina (MORRISSETTE et al., 1996), BjTx-1 e BjTx-2 , ativadores dos receptores de rianodina, (ZHU et al., 2004), todos isolados da peçonha do *Buthotus judaicus*. Alguns tipos de toxinas escorpiônicas descritas com afinidade para canais para Ca^{+2} também afetam a dependência de voltagem em canais para Na^+ . É o caso da Kurttoxina (CHUANG et al., 1998) que tem afinidade para canais para Ca^{+2} – dependentes de voltagem (Ca_v) do tipo T (da classe $\text{Ca}_v3.1$ e $\text{Ca}_v3.2$), isolada do *P. transvaalicus*. Olamendi-Portugal et al. (2002) isolaram e caracterizaram duas toxinas da peçonha de *P. granulatus*, similares à kurttoxina (KLI e KLII) e que possuem características estruturais bastante semelhantes àquelas que atuam em canais para Na^+ . Estas toxinas são

altamente relacionadas às α -toxinas escorpiônicas. Os autores também mostraram que essas toxinas tem afinidade para canais para Na^+ cardiovasculares, e sugerem que as mesmas reconhecem um “motife” estrutural comum em ambos os tipos de canais.

TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA Cl^-

A clorotoxina, isolada da peçonha de *Leiurus quinquestriatus*, foi a primeira e é a principal toxina descrita que bloqueia canais de Cl^- de baixa condutância, possui 36 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, cuja sequência revela semelhança com as proteínas tóxicas de baixo peso molecular para insetos (DEBIN et al., 1993). Sua atividade foi estudada em células de epitélio de cólon de rato. Esta toxina paralisa artrópodes (insetos e crustáceos), provavelmente por uma ação em receptores para o glutamato do sistema nervoso dos mesmos. (DeBIN et al., 1993). Posteriormente, a clorotoxina mostrou atividade contra tumores cerebrais (SOROCEANU et al., 1998).

A clorotoxina também apresenta 30% de homologia com a caribdotoxina, uma toxina bloqueadora de canais de K^+ , isolada da peçonha deste mesmo escorpião (LIPPENS et al., 1995).

TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA K^+

Os canais para K^+ podem ser divididos em dois grandes grupos: os canais dependentes de voltagem e os dependentes de ligantes. Devido à alta seletividade para íons K^+ e à ampla distribuição nos tecidos, os canais de K^+ são muito importantes em vários processos fisiológicos, tais como excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios, regulação da secreção de fluidos e ativação de linfócitos.

Canais para K^+ sensíveis à voltagem são proteínas complexas, que formam um canal de permeação transmembrana, com uma grande seletividade para o K^+ (KUKULJAN et al., 1995; LIPKIND e FOZZARD, 1997). O bloqueio do canal é produzido pela ligação de uma molécula de toxina a um receptor localizado na face externa do canal, levando a uma oclusão física do poro condutor de K^+ (STAMPE et al., 1994). Os canais para K^+ dependentes de voltagem possuem uma importante função na regulação do grau de excitabilidade neuronal. Esta classe de canais está envolvida no controle da duração e na frequência dos potenciais de ação. Para determinar o papel funcional de um canal específico na célula, moduladores seletivos e de alta afinidade a diferentes tipos de canais para K^+ precisam ser identificados e caracterizados (TYTGAT et al., 1999).

Diversos estudos têm demonstrado a influência de toxinas de peçonhas de escorpiões nestes canais. Já foram purificadas e sequenciadas várias toxinas peptídicas destas peçonhas, tais como a caribdotoxina, que está sendo usada como uma ferramenta específica para bloquear canais para K^+ de alta condutância ativados por cálcio (GIMENEZ-GALLEGO et al., 1988); a noxiustoxina, que o bloqueia canal de K^+ retificador-tardio (CARBONE *et al.*, 1982), a iberiotoxina do *Buthus tamulus* (GALVEZ et al., 1990), dentre pelo menos 120 peptídeos conhecidos, que bloqueiam ou modificam a permeabilidade ao K^+ em células excitáveis ou não-excitáveis (RODRÍGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004).

Quase todas as toxinas escorpiônicas específicas de canais para K^+ tem cerca de 30-40 resíduos de aminoácidos e são estabilizados por três ou quatro pontes dissulfeto (OLAMENDI-PORTUGAL et al., 1996; POSSANI et al., 1999; TYTGAT et al., 1999; GARCIA et al., 2001). Elas também adotam em sua conformação tridimensional três fitas beta anti-paralelas ligadas a uma região alfa-helicoidal por pontes dissulfeto. Este padrão de enovelamento dá à molécula um estrutura compacta, expondo todos os resíduos ao solvente (exceto as cisteínas) (GARCIA et al., 2001).

Como citado anteriormente, estas toxinas são bloqueadoras de poro. Várias evidências indicam que todos esses peptídeos ligam-se no vestíbulo externo do canal e bloqueiam a condutividade iônica por oclusão física do poro, sem afetar a cinética de ativação do canal (MILLER, 1988; GIANGIACOMO et al., 1992). A ligação do peptídeo ao canal ocorre através de uma reação bimolecular reversível, por meio de interações eletrostáticas entre resíduos carregados negativamente no canal e carregados positivamente no peptídeo (GIANGIACOMO et al., 1992; GARCIA et al., 2001).

Algumas das toxinas da peçonha de *T. serrulatus* já identificadas, que interagem com canais para K^+ descritas são a TsII-9 e TsII-10-2, que bloqueiam a condutância de potássio em axônio gigante de lula (POSSANI *et al.*, 1982), a TsTX- $K\alpha$ (que mostrou-se idêntica à TsII-9, POSSANI et al., 1982) e a TsTX- $K\beta$ que bloqueiam canal de K^+ retificador-tardio (ROGOUSKI et al., 1994) e, mais recentemente a TsTX-IV que foi capaz de bloquear canais de K^+ -ativados por Ca^{+2} (NOVELLO et al., 1999).

As toxinas escorpiônicas que atuam em canais para K^+ têm pouca importância toxicológica. Todavia, associadas a outras toxinas escorpiônicas, como as que atuam em canais para Na^+ , agem sinergicamente, propiciando potente ação tóxica à peçonha (GWEE et al., 2002).

TOXINAS ESCORPIÔNICAS QUE ATUAM EM CANAIS PARA Na⁺

Toxinas escorpiônicas que atuam em canais para Na⁺ são os polipeptídeos tóxicos mais reativos presentes na peçonha de escorpiões e os principais responsáveis pelos efeitos neurotóxicos do envenenamento escorpiônico. Estas toxinas possuem uma cadeia de aminoácidos maior que as que atuam em canais para K⁺, com 58-76 resíduos de aminoácidos (6500 a 8500 Da) estabilizados por 4 pontes dissulfeto (POSSANI et al., 2000; RODRÍGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2005). As seqüências de aminoácidos de vários peptídeos diferentes são atualmente conhecidas e, para algumas toxinas, a estrutura tridimensional foi determinada por difração de raios X ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A característica estrutural presente em todas elas consiste de uma ou duas pequenas alfa-hélices e três segmentos antiparalelos, conectados por regiões variáveis, formando alças de tamanhos diferentes e de composição química variável. Estes elementos estruturais são altamente conservados em todas as toxinas da peçonha de escorpiões que interagem com canais para Na⁺ (para revisão, ver POSSANI et al., 1999; 2000; RODRÍGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2005).

TABELA I - Neurotoxinas que atuam em canais para Na⁺ dependentes de voltagem e seus respectivos locais de ligação aos sítios receptores *

SÍTIO RECEPTOR	NEUROTOXINAS	LOCAIS DE LIGAÇÃO DAS NEUROTOXINAS AOS SÍTIOS
Sítio 1	Tetrodotoxina Saxitoxina μ-Conotoxinas	Alça-p em D1, D2, D3, D4.
Sítio 2	Veratridina Batracotoxina Aconitina	D1-S6 D2-S6 D3-S6
Sítio 3	α-Neurotoxinas escorpiônicas δ-atracotoxinas Toxina II de anêmonas marinhas	D4: S3-S4 Alça D1:S5-S6 Alça D4:S5-S6
Sítio 4	β-Neurotoxinas escorpiônicas	D2:S3-S4
Sítio 5	Brevetoxinas Ciguatoxinas	Alça D1-S6 D4-S5
Sítio 6	δ-Conotoxinas	?

* Adaptado de Cestèle e Catterall, (2000); Wang e Wang (2003)

As toxinas escorpiônicas específicas de canais para Na^+ são autênticas modificadoras do mecanismo de ativação destes canais (GORDON et al., 1998). Tem sido proposto que a superfície na qual um grupo de resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (superfície hidrofóbica conservada) é localizado, constituem o sítio ativo dessas toxinas (LANDON et al., 1997; FONTECILLA-CAMPOS et al., 1998). A interação entre essas toxinas e o canal acontece via superfície hidrofóbica composta de resíduos de aminoácidos aromáticos e alifáticos (SUN et al., 2003; WANG et al., 2003).

Estas toxinas podem ser divididas em dois grandes grupos, de acordo com o modo de ação, estudos eletrofisiológicos e propriedades de ligação ao canal (MARTIN-EAUCCLAIRE e COURAUD, 1995; GORDON et al., 1998; POSSANI et al., 1999): As α - e as β -neurotoxinas escorpiônicas.

Ao lado desses dois grandes grupos, temos as toxinas específicas para insetos e crustáceos, as mistas e as chamadas γ -toxinas, estas altamente específicas para insetos, diferente das clássicas toxinas de canais para Na^+ ativas em mamíferos (ZLOTKIN et al., 1991)

β -neurotoxinas escorpiônicas

As β -neurotoxinas escorpiônicas são particularmente úteis para o entendimento das bases moleculares das propriedades de ativação dos canais para Na^+ (CESTÈLE et al., 1998).

As toxinas ativas em mamíferos tem sido associadas a escorpiões do Novo Mundo, como nas espécies de *Tityus* e *Centruroides*, ao passo que outras β -toxinas que atuam exclusivamente em canais para Na^+ de insetos tem sido estritamente encontradas em escorpiões do Velho Mundo (ZLOTKIN, 1983; POSSANI et al., 1999; MARTIN-EAUCCLAIRE e COURAUD, 1995). Polipeptídeos tóxicos com algumas propriedades inerentes às β -toxinas tem sido encontrados na peçonha de escorpiões do Velho Mundo como o *Leiurus quinquestriatus hebraeus* e o *Buthus martensii* Karsch (GORDON et al., 2003)

β -neurotoxinas escorpiônicas ligam-se ao sítio receptor 4 na alça extracelular S3-S4 no domínio II da subunidade α (DIIS3-S4) dos canais para Na^+ sensíveis à voltagem (**TABELA I e FIGURA 1**). Durante a ativação destes canais, os sensores de voltagem (S4DII) altamente carregados são translocados externamente e então a β -neurotoxina interage com a porção extracelular terminal do segmento S4DII, imobilizando-o, portanto, mantendo-o nesta posição exterior, ou seja, na posição ativada (CESTÈLE et al., 1998). Por conseguinte, a toxina pode aumentar a ativação do canal devido a uma mudança na dependência de voltagem de ativação, para potenciais de membrana mais negativos, causando uma tendência aumentada da célula

para produzir potenciais de ação espontâneos e repetitivos. A interação de β -toxinas aos canais de Na^+ é independente do potencial de membrana (para revisão, ver CESTÈLE e CATTERALL, 2000; DENAC et al., 2000).

FIGURA 1 - Topologia esquemática da subunidade α dos canais para Na^+ e os sítios receptores 3 e 4 para α -e β -neurotoxinas escorpiônicas, respectivamente (modificado de GORDON e GUREVITZ, 2003)

Apesar da ligação dessas neurotoxinas nos mesmos locais do sítio receptor, seus subsequentes efeitos variam grandemente em vários animais ou até mesmo em tipos diferentes de preparações (GORDON et al., 2003). Por exemplo, canais para Na^+ presentes no sistema cardiovascular e no cérebro são até certo ponto similares em sua estrutura, mas diferem significativamente nos mecanismos de ativação, permeabilidade iônica e bloqueio (FOZZARD e HANCK, 1996). Experimentos mostram que algumas β -neurotoxinas escorpiônicas ligam-se com mais afinidade aos canais para Na^+ do músculo esquelético do que em canais para Na^+ da musculatura cardiovascular (MARCOTTE et al., 1997).

A TsTX-I, também chamada de Ts1 ou Toxina- γ (para nomenclatura ver SAMPAIO et al., 1991; BECERRIL et al., 1997) é a principal β -neurotoxina da peçonha do escorpião *T. serrulatus*, e também a toxina mais abundante (POSSANI et al., 1981). TsTX-I é uma típica β -neurotoxina, com 61 resíduos de aminoácidos e 6.873 Da (PINHEIRO et al., 2003) e tem uma DL_{50} intravenosa de $76 \pm 9 \mu\text{g/kg}$, comparado aos $375 \pm 45 \mu\text{g/kg}$ da peçonha (ARANTES et al., 1989).

Testes de toxicidade realizados em camundongos e testes de afinidade de ligação em preparações sinaptossomais de cérebro de ratos e corda espinal de baratas mostraram que os resíduos de triptofano 54 e 39 do cluster aromático conservado e o resíduo de lisina 12, positivamente carregado, são extremamente importante para sua atividade (HASSANI et al.,

1999). Adicionalmente, o resíduo terminal de lisina tem sido considerado importante para a alta toxicidade apresentada por esta toxina (POLIKARPOV et al., 1999)

α -neurotoxinas escorpiônicas

α -neurotoxinas escorpiônicas também têm grande importância na caracterização das propriedades funcionais e no mapeamento dos canais para Na^+ sensíveis à voltagem (CATTERALL, 1992). A maioria delas provém de peçonhas de escorpiões do Velho Mundo, e são descritas como os polipeptídeos mais tóxicos e os principais responsáveis por fatalidades humanas (MARTIN-EAUCLAIRE e COURAUD, 1995). Entretanto, algumas α -toxinas também foram isoladas de espécies do Novo Mundo. A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* é uma rica fonte destas neurotoxinas. TsTX-III (SAMPAIO et al., 1983), TsTX (também chamada Ts3 ou toxina IV-5, BECERRIL et al., 1997) e a TsTX-V (ARANTES et al. 1994), são alguns exemplos destas neurotoxinas.

As α -neurotoxinas escorpiônicas ligam-se ao sítio receptor 3 na alça extracelular S3-S4 no domínio IV da subunidade α (DIVS3-S4) dos canais para Na^+ sensíveis à voltagem (**TABELA I** e **FIGURA 1**). Por causa da relativa proximidade da alça IVS3-S4 ao segmento sensível a voltagem IVS4, a toxina liga no outro lado da alça IVS3-S4, inibindo ou prevenindo o translocamento externo ou o movimento do segmento IVS4 durante a despolarização. Assim as α -toxinas mantêm imobilizado o sensor de voltagem IVS4 na posição interna não ativada, durante a ativação do canal de Na^+ e, desta maneira, diminuem ou retardam o fechamento do portão de inativação (ou seja, diminuem ou retardam a inativação do canal, induzindo o prolongamento da fase de repolarização do potencial de ação) (ROGERS et al., 1996). Este bloqueio característico da inativação do canal é dependente de voltagem (MEVES et al., 1986). Em outras palavras, estas toxinas tornam a inativação do canal mais lenta e incompleta, resultando em um prolongamento do potencial de ação. O efeito e a ligação é dependente do potencial de ação e esses parâmetros são aumentados por despolarização da membrana através da concentração externa do K^+ ou por fortes pulsos despolarizantes (para revisão, ver CESTÈLE e CATTERALL, 2000; DENAC et al., 2000).

As α -toxinas escorpiônicas mostram variabilidade em sua aparente toxicidade para mamíferos e insetos, em sua estrutura primária (seqüência de aminoácidos) e em suas características de ligação à preparações de membrana neuronal (GORDON et al., 1996; ZILBERBERG et al., 1996). Entre as neurotoxinas escorpiônicas, o grupo alfa é o mais estudado e útil no mapeamento da estrutura dos canais de Na^+ (para revisão, ver CATERRALL,

1986, 1992) α -toxinas clássicas são altamente ativas em cérebro de mamíferos (GORDON et al., 2002), possuindo alta afinidade de ligação em sinaptosomas de cérebro de ratos (CESTÈLE et al., 1999; GILLES et al., 1999).

Um subtipo de α -toxina escorpiônica, ativa em neurônios de insetos e crustáceos (α -like toxina) e em mamíferos, não afeta canais para Na^+ cerebrais ($\text{Na}_v1.2$), em contraste com as clássicas α -toxinas específicas para mamíferos, mas são extremamente ativas em subtipos de canais para Na^+ cardíacos e esqueléticos (CHEN e HEINEMANN, 2001).

Trabalhos de Gurevitz e colaboradores (GUREVITZ et al., 2001; 2002) sugerem que a superfície bioativa de α -toxinas está localizada na parte externa do canal, e que diferenças estruturais sutis nesta superfície podem ditar a seletividade para as toxinas que interagem com canais para Na^+ em diferentes organismos, tecidos ou preparações, com diferentes respostas fisiológicas.

A TsTX-V, é uma importante α -neurotoxina, isolada inicialmente da fração XI da peçonha do *T. serrulatus* por ARANTES et al. (1994). É outra toxina de canais para Na^+ extremamente tóxica, com uma DL_{50} intravenosa de $94 \pm 7 \mu\text{g/kg}$ (em camundongos), básica (pI de 8,0), com 64 resíduos de aminoácidos e 7.230 Da (MARANGONI et al., 1995).

A alça B na TsTX-V é mais curta que em outras α -neurotoxinas escorpiônicas, sugerindo assim que esta região não é importante para a neurotoxicidade envolvendo a TsTX-V. A análise molecular desta neurotoxina sugere que a região da alça C-terminal pode estar envolvida nas ações da TsTX-V. Apesar do modelo desta toxina ser baseado em uma α -neurotoxinas, ela mostra uma estrutura híbrida com características de α - e β -neurotoxinas (MARANGONI et al., 1995).

O CANAL PARA Na^+ , O POTENCIAL DE AÇÃO E O PAPEL DAS NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS

Canais iônicos dependentes de voltagem são proteínas transmembrana de grande peso molecular e caráter anfifílico, que conduzem de maneira seletiva íons através da membrana plasmática e são regulados por alterações de voltagem, que os alteram conformacionalmente. Eles desempenham um papel fundamental na geração e propagação do impulso nervoso e na homeostase celular. A diferença de concentração iônica entre o meio interno e o meio externo da célula resulta em uma diferença de potencial elétrico e o fluxo de íons através da membrana plasmática, resulta em um gradiente eletroquímico. As células fazem uso deste gradiente

eletroquímico na propagação do impulso nervoso (para revisão sobre ver TERLAU e STÜMHMER, 1998).

Células eletricamente excitáveis (células nervosas, neuroendócrinas, células de músculo liso, esquelético e cardíaco) distinguem-se das demais por possuírem estes canais em suas membranas plasmáticas, que respondem a alterações no potencial de membrana com grande aumento regenerativo na permeabilidade de íons específicos em uma escala de tempo de milissegundos (CATTERALL, 1984).

Os canais para Na^+ são responsáveis pela condução de impulsos elétricos na maioria das células excitáveis, devido a sua propriedade de abertura transiente durante a despolarização. Assim, estes canais mediam o aumento dependente de voltagem da permeabilidade do íon Na^+ que dá início a potenciais de ação (HODGKIN e HUXLEY, 1952).

Canais para Na^+ são compostos de uma subunidade glicosilada e fosforilada, denominada subunidade α (formadora do poro) de 260 kDa, associado com pequenas subunidades $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$ (CATTERALL, 2000; YU et al., 2003). A subunidade α consiste de quatro domínios homólogos internos (I-IV), cada um contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6) e um segmento re-entrante (SS1-SS2) conectado por alças polipeptídicas internas e externas (YU et al., 2003). O poro é formado pelo segmento transmembrana S5 e S6 e os segmentos re-entrantes SS1 e SS2 formam o estreito filtro de seletividade e as paredes do poro (TERLAU et al., 1991; HEINEMANN et al., 1992; RAGSDALE et al., 1994). Em resposta a alterações no potencial de membrana, o segmento S4 (no domínio DIV), que contém resíduos carregados positivamente na terceira posição, move-se externamente e atua como sensor de voltagem ao iniciar a ativação do canal (MITROVIC et al., 1998; CHA et al., 1999; SHEETS et al., 1999; CHANDA E BEZANILLA, 2002).

Quando um estímulo qualquer causa uma pequena despolarização da membrana (alteração da diferença de potencial transmembrana para valores menos negativos), a consequência imediata é um aumento na probabilidade de abertura dos canais para Na^+ dependentes de voltagem, resultando em um maior influxo desse íon a favor do seu gradiente eletroquímico. Este aumento no número de cargas positivas no interior celular despolariza ainda mais a membrana e, em consequência, ocorre um aumento ainda maior na probabilidade da abertura dos canais para Na^+ .

A fase despolarizante do potencial de ação é, portanto, devido a um aumento na permeabilidade ao sódio (entra Na^+), enquanto que a repolarização e hiperpolarização,

subseqüentes ao pico do potencial de ação, são devidas a um aumento na permeabilidade ao K^+ (sai K^+).

O aumento da permeabilidade ao sódio que resulta na despolarização de células excitáveis é bifásico. Este comportamento se deve a dois processos que controlam a função do canal para Na^+ : *ativação*, a qual controla valor e a dependência de voltagem do aumento da permeabilidade ao sódio que segue o estímulo despolarizante da membrana e a *inativação*, a qual controla o valor e a dependência de voltagem do retorno subseqüente da permeabilidade ao Na^+ para os valores de repouso. O canal para Na^+ pode, portanto, existir em 3 estados conformacionais distintos: repouso (fechado), ativado (aberto) e inativado (não condutor) (KOESTER, 1991).

Embora os sensores de voltagem dos canais para Na^+ estejam localizados dentro da membrana, neurotoxinas escorpiônicas afetam uma ou mais das três propriedades funcionais dos canais de sódio: a ativação dependente de voltagem, a inativação, ou a condutância iônica seletiva, alterando a ativação e a inativação dependentes de voltagem, pela ligação a sítios receptores específicos na superfície do canal. Assim, estas toxinas tem sido usadas como sondas moleculares para identificar os componentes protéicos do canal de sódio e para caracterizar regiões funcionais nas subunidades destes canais (para revisão ver CATTERALL, 1992).

A TOXICIDADE DA PEÇONHA E SUAS TOXINAS: DA ALTERAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA AOS EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DO ENVENENAMENTO ESCORPIÔNICO

Como já detalhado, neurotoxinas da peçonha de escorpiões afetam canais para Na^+ por diferentes mecanismos, aumentando a permeabilidade da membrana ao sódio, com intensa despolarização na membrana e prolongando o potencial de ação, ou induzindo a geração de potenciais de ação espontâneos e repetitivos. Esta ação causa uma alteração conformacional nos canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem, tornando-os ativos, ou seja, tornando-os permeáveis aos íons Ca^{+2} , e assim promovendo influxo maciço deste íon para o citoplasma, na terminação nervosa.

A atividade dos canais de Ca^{+2} é, portanto, modulada pelo potencial de membrana. Estes canais fazem a ligação entre a atividade elétrica da célula e os fenômenos contráteis ou secretórios. Eles interferem na contração dos músculos esqueléticos, cardíacos e músculos lisos, e são a origem dos mecanismos de regulação da secreção de hormônios ou liberação de neurotransmissores e outros mediadores químicos, excitabilidade neuronal e ainda estão

envolvidos nos mecanismos de crescimento, divisão e morte celular (MOREL e HUGUES, 1998).

A liberação de neurotransmissores dos terminais sinápticos é um dos eventos celulares desencadeados por íons Ca^{+2} intracelular mais bem estudados. Quando o terminal sináptico é despolarizado, os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem se abrem, os íons Ca^{+2} entram na célula pelo poro aberto e se difundem pelo citoplasma, criando um domínio de alta concentração de Ca^{+2} próximo ao canal, promovendo a mobilização das vesículas sinápticas. Seu conteúdo (neurotransmissores) é então liberado na fenda sináptica por exocitose. Neste processo estão envolvidas outras proteínas citoplasmáticas e de membrana (para revisão, ver LANGLEY e GRANT, 1997; ZUCKER, 1996), que não são alteradas pela ação deste tipo de neurotoxinas.

Várias evidências indicam que a rápida fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica é desencadeada por altas concentrações de Ca^{+2} intracelular, próximo aos canais da zona ativa (MATTHEWS e VON GERSDORFF, 1996).

Assim, a toxicidade dos componentes presentes na peçonha do escorpião é uma marcada sobreatividade do sistema nervoso autônomo, resultante de uma massiva liberação de neurotransmissores autônomos dos terminais nervosos simpáticos e parassimpáticos, bem como da medula adrenal, fenômeno descrito como “tempestade autonômica” (CORRADO et al., 1968; FREIRE-MAIA et al., 1974; DINIZ, 1978; FREIRE-MAIA e CAMPOS, 1989; HARVEY, 1994; FREIRE-MAIA, 1995; GWEE et al., 2002). Esta descarga autonômica é a principal responsável pelos efeitos fisiopatológicos do envenenamento escorpiônico, e variam em intensidade de espécie para espécie, sendo mais intensos em escorpiões da família Buthidae (GWEE et al., 2002)

Os efeitos típicos incluem aqueles produzidos pela sobreatividade do sistema nervoso simpático e parassimpático (GWEE et al., 2002), com hiperalgesia local, sudorese, lacrimejamento, micção e salivação excessivos, manifestações gastrointestinais (vômitos, cólicas abdominais, diarreia), alterações cardiovasculares, histopatológicas, bioquímicas e metabólicas, edema pulmonar multifatorial (cardiogênico e humoral), arritmias respiratórias e efeitos sobre o sistema nervoso central (hemiplegia, hiper ou hipotermia, apoplexia, hiper irritabilidade, convulsões) (para revisão sobre a síndrome do envenenamento escorpiônico, ver HARVEY, 1994; ISMAIL, 1995).

Todavia, a maior causa de mortes tem sido atribuída principalmente a toxicidade cardiovascular, resultante da liberação maciça de catecolaminas dos terminais nervosos noradrenérgicos e da adrenal, juntamente com complicações surgidas após esta descarga de

catecolaminas (edema pulmonar e arritmias respiratórias) (GUERON e YAROM, 1970; GUERON et al., 1980; BAWASKAR e BAWASKAR, 1992; ISMAIL, 1995; HARVEY, 1994).

Quase todas as peçonhas escorpiônicas causam pronunciada hipertensão em animais experimentais e crianças (FREIRE-MAIA et al., 1974; BAWASKAR e BAWASKAR, 1986; 1987; GUERON e OVSYSHCHER, 1987; AMARAL e REZENDE, 1990; SAMPAIO et al., 1991; GUERON et al., 1992, ARANTES et al, 1994; KRISHNA MURTHY, 2000).

A hipertensão arterial pode ser causada pela liberação de catecolaminas, ocasionando aumento da força de contração do miocárdio e da resistência vascular periférica. A liberação de renina, via estimulação beta-adrenérgica renal, seguida da produção de angiotensina II pode ser outro fator que contribui para a patogênese da hipertensão (AMARAL e REZENDE, 1990, KRISHNA MURTHY, 2000).

A hipotensão arterial, que geralmente segue a hipertensão inicial, é um problema sério nos envenenamentos graves. Os mecanismos propostos para explicar a hipotensão incluem um efeito colinérgico, a síndrome da depleção de catecolaminas, o efeito beta₂-vasodilatador, hipovolemia secundária à excessiva perda de fluidos (GUERON e OVSYSHCHER, 1987; GUERON et al., 1992, KRISHNA MURTHY, 2000), e participação parcial de cininas e/ou prostaglandinas na gênese da hipotensão terminal (ISMAIL, 1995).

Freire-Maia e Campos (1987) sugerem que a hipotensão deve ser consequência da apnéia e bradicardia, um efeito reflexo induzido por estímulo do edema pulmonar e falência cardíaca.

As principais arritmias cardíacas são a taquicardia e bradicardia sinusal, extra-sístoles ventriculares e distúrbios da condução atrioventricular (AV) e intraventricular do estímulo. A bradicardia sinusal e o bloqueio AV total decorrem da liberação de acetilcolina pela ação da peçonha nos gânglios vagais e nas terminações nervosas pós-ganglionares cardíacas. A taquicardia sinusal e as extra-sístoles ventriculares são causadas pela estimulação beta-adrenérgica pelas catecolaminas (FREIRE-MAIA et al., 1973; GUERON et al., 1980; AMARAL e REZENDE, 1990).

Zeghal et al. (2000) demonstraram em ratos anestesiados que a peçonha do escorpião *Buthus occitanus* induz a uma massiva liberação de catecolaminas e que estas são as responsáveis, através da estimulação dos receptores α - e β -adrenérgicos, pelo desenvolvimento de fortes efeitos vasoconstrictores (renais e musculares) sistêmicos e regionais, levando à redução do débito cardíaco e fluxo sanguíneo regional e em última instância à falência hemodinâmica.

Ainda que cininas pareçam estar envolvidas nos efeitos cardiovasculares e letais de certas espécies de escorpiões (BAGCHI e DESHPANDE, 1998; FATANI et al., 1998) e até mesmo uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica tem sido postulada como uma explicação para as manifestações cardiovasculares (MAGALHÃES et al., 1999), a maioria dos investigadores ainda consideram que esta é secundária aos efeitos vasculares periféricos e miocárdicos decorrentes da massiva liberação de catecolaminas causada pelo envenenamento (GUERON et al., 1990; GUERON et al., 2000).

GUERON et al. (1980) demonstraram que, apesar do papel atribuído às catecolaminas, pré-tratamento de cães com fentolamina e ou propranolol e ou atropina, faliram em prevenir algumas alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha. Teixeira Jr. et al. (2001) verificaram que, em músculo cardíaco, os efeitos cronotrópicos da peçonha são dependentes da liberação destes neurotransmissores, mas os efeitos inotrópicos são devidos a uma ação direta da peçonha nos cardiomiócitos. Estes estudos indicam que as toxinas do escorpião podem exercer também ações diretas sobre estruturas pós-sinápticas.

EFEITOS DE TOXINAS ESCORPIÔNICAS SOBRE PREPARAÇÕES ISOLADAS E LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISORES

A neurotransmissão química no SNC é um processo constituído de vários eventos, envolvendo a síntese e a liberação do neurotransmissor, a difusão do mesmo através da fenda sináptica e a ligação a receptores, resultando em alterações das propriedades elétricas das células pós-sinápticas.

A chegada o potencial de ação no terminal sináptico desencadeia a abertura de canais iônicos sensíveis a voltagem, com conseqüente despolarização e aumento transitório e localizado da concentração de íons cálcio. Estes últimos exercem papel essencial na fusão das vesículas à membrana pre-sináptica e liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica (BAJJALIEH e SCHELLER, 1995; BAUERFEIND et al., 1995).

Uma vez liberados, os neurotransmissores se difundem pela fenda, podendo interagir com auto-receptores, presentes na membrana pre-sináptica e que agem inibindo a liberação, ou com receptores pós-sinápticos gerando potenciais pós sinápticos excitatórios ou inibitórios.

A ação de um neurotransmissor pode ser finalizada por degradação enzimática (no caso da acetilcolina) ou por recaptação ou ambos (no caso da dopamina e noradrenalina). A recaptação é o processo ativo que retira o neurotransmissor da fenda sináptica, sendo feita por proteínas transportadoras altamente específicas presentes em neurônios pré e pós-sinápticos e

células gliais, corpos celulares neuroniais, terminais nervosos e dendritos, para que a ação sináptica do mediador seja finalizada (BEAR et al., 1996). Este transporte tem a dependência absoluta de íons sódio, e pode ocorrer de forma reversa, dependendo das condições iônicas (SIEGEL, 1994; ROSSI et al., 2000).

Ao longo dos últimos anos foi feito um progresso significativo em direção à compreensão molecular dos transportadores de neurotransmissores no SNC. Estudos eletrofisiológicos de transportadores de neurotransmissores indicam que muitos dos carreadores são eletrogênicos e podem operar de maneiras semelhantes, em certos aspectos, a canais iônicos. Alguns trabalhos indicam que estes carreadores não funcionam somente na captação do neurotransmissor, mas também, em consequência de suas capacidades de alterar o potencial de membrana, podem ter um papel mais amplo na regulação da excitabilidade neuronal e em mecanismos de sinalização (AMARA, 1996).

O sistema de recaptação de alta afinidade da membrana plasmática é dependente da atividade do íon sódio e também dos íons cloro e ou potássio. Diversos transportadores de neurotransmissores, incluindo GABA, serotonina, dopamina, glutamato, colina e glicina tem sido estudados por vários anos, com especial atenção às necessidades de acoplamento de gradientes iônicos, substratos e moduladores específicos (WORRALL e WILLIAMS, 1994).

O mecanismo neuroquímico, implicado na patogênese de fenômenos convulsivos/epilépticos e a estes relacionados, trata-se de um desequilíbrio entre os sistemas de neurotransmissores inibitórios e excitatórios, desencadeando hiperexcitabilidade (ENGELBORGHES et al., 2000). Diversas evidências têm implicado principalmente os sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos nestes processos.

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é encontrado em altas concentrações no encéfalo e medula espinhal (KROGAARD-LARSEN et al., 1998). A neurotransmissão GABAérgica é finalizada por meio de proteínas transportadoras presentes em neurônios pré-sinápticos e em glias adjacentes, dependentes de íons sódio e cloreto e pertencentes a mesma família dos transportadores monoaminérgicos (para revisão, ver BORDEN, 1996). Este processo, responsável pela recaptação do GABA, é dependente do potencial eletroquímico. O sódio, uma vez ligado à sítios específicos parece promover alterações conformacionais no transportador, aumentando sua afinidade pelo substrato (MAGER et al., 1996) e tem sido muito estudado em uma variedade de preparações, como fatias de cérebro, sinaptosomas e culturas primárias de células (IVERSEN e NEAL 1968). As quatro principais proteínas responsáveis por esse processo são denominadas GAT (transportadores de GABA) e são constituídas pelo GAT-1 (transportadores de GABA sensíveis à ACHC, ácido *cis*-1,3-aminociclohexanocarboxílico,

também chamado de GAT-A), GAT-2 e GAT-3 (transportador de GABA sensível à β -alanina, também chamado de GAT-B) e GAT-4, com distribuições distintas no tecido cerebral (para revisão, ver BORDEN, 1996).

O glutamato é liberado de vesículas sinápticas contidas nos terminais nervosos por exocitose clássica dependente de íons cálcio. A ação do glutamato é finalizada por um sistema de transporte de alta afinidade dependente de íons Na^+ , K^+ e OH^- , formado por cinco subtipos de transportadores denominados EAATs (para revisão, ver DANBOLT et al., 1998; VANDENBERG, 1998). A hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos causa vários danos aos neurônios e esse fenômeno é conhecido como excitotoxicidade.

Os transportadores monoaminérgicos incluem as proteínas carreadoras de noradrenalina, serotonina e dopamina e pertencem a mesma família dos transportadores GABAérgicos (RUDNICK e CLARK, 1993). Os transportadores dopaminérgicos desempenham importante papel na regulação do controle dos movimentos e na liberação de hormônios, e estão envolvidos em várias patologias do SNC. Estimulação elétrica (FARO et al., 2002), despolarização por KCl (HARVEY et al., 1996) e a α -latrodotoxina (KHOVOTCHEV et al., 2000) induzem a liberação de dopamina de fatias de cérebro de ratos ou de sinaptosomas neoestriatais, enquanto a cocaína e a anfetamina são drogas conhecidas por bloquearem a captação de dopamina e de noradrenalina, produzindo efeitos estimulantes (BEAR et al., 1996).

A liberação de dopamina e outras monoaminas cerebrais envolve um processo exocitótico disparado pelo influxo de cálcio no terminal. Entretanto, tem sido proposto que outro mecanismo de liberação de dopamina pode co-existir com o clássico processo de exocitose. Neste modelo, o transporte reverso da amina citoplasmática ocorre por transportador de dopamina (DAT), que normalmente é responsável pela captação do neurotransmissor e este atípico modo de liberação pode ser induzido diretamente por fatores envolvendo transientes alterações dos canais para sódio (LEVIEL, 2001).

Neurotoxinas escorpiônicas, por aumentarem a permeabilidade da membrana ao sódio, são capazes de induzir liberação de neurotransmissores de diferentes preparações (ROMANO-SILVA et al., 1994; GOMEZ et al., 1995; STIER et al., 1996; CONCEIÇÃO et al., 1998; FERNANDES et al., 2001; NICOLATO et al., 2002).

A perda de modulação do canal para Na^+ no SNC pode levar a focos epileptogênicos (TAMMARO et al., 2002). Assim, a alteração funcional destes canais, induzidos pela peçonha de escorpiões ou por suas toxinas pode ser o responsável pelos acessos convulsivos observadas no envenenamento severo em crianças (onde a barreira hemato-encefálica não é totalmente

desenvolvida). Dessa maneira, a peçonha de *T. serrulatus*, quando injetada dentro do hipocampo cerebral ou mesmo intravenosamente, causa convulsões em ratos (SANDOVAL e DORCE, 1993).

Peçonha ou toxinas isoladas deste escorpião tem mostrado traçados epileptiformes em registros de atividades elétricas cerebrais, dano cerebral e convulsões, alterações comportamentais relacionadas às convulsões, descargas epiléticas de intensidade moderada, dispnéias, mioclonias, automatismo orofacial, períodos de imobilidade e hiperatividade, os quais foram correlacionados com alterações eletroencefalográficas e lesões neuronais, além de lesões hipocâmpais, após injeções em diferentes estruturas de cérebro de ratos (SANDOVAL e DORCE, 1993; DORCE e SANDOVAL, 1994; CARVALHO et al., 1998; 2000; NENCIONI et al., 2000). Aminoácidos excitatórios presentes no sistema nervoso central tem sido implicados nestes efeitos (CARVALHO et al., 1998; 2000; NENCIONI et al., 2000).

Alguns trabalhos também tem mostrado que toxinas ou peçonha de *T. serrulatus* aumentam a liberação de acetilcolina bem como a captação de íons Na^+ e Ca^{+2} em fatias e ou sinaptosomas de córtex cerebral de ratos (GOMEZ et al., 1995; MIRANDA et al., 2001).

Sinaptosomas (sinapses isoladas) são terminais nervosos pre-sinápticos selados que contém todos os componentes envolvidos na formação e consolidação de contatos sinápticos (transportadores, canais iônicos operados por voltagem) e, sob condições metabólicas, mantêm um potencial normal de membrana, mas, sob despolarização, libera neurotransmissores de uma maneira dependente de Ca^{+2} , constituindo uma excelente ferramenta para estudos da função sináptica, sem as complicações encontradas com sinapses *in situ* (WHITTAKER, 1993).

Assim, sinaptosomas juntamente com neurotoxinas escorpiônicas, tem providenciado importantes informações sobre as bases moleculares da excitabilidade neuronal (SAMPAIO et al., 1996). Neste contexto, estas neurotoxinas tem sido amplamente usadas para estudos de mecanismos neurofisiológicos envolvendo canais iônicos operados por voltagem e liberação de neurotransmissores (COUTINHO-NETTO et al., 1980; HENRIQUES e GOMEZ, 1981; SAMPAIO et al., 1996; 1997; SALGADO et al., 1997; MASSENSINI et al., 1998; BICALHO et al., 2002).

Durante anos, têm-se acumulado suficientes evidências para sugerir que, por modulação de canais de sódio pelas diferentes classes de neurotoxinas, é possível alterar a liberação de neurotransmissores de uma maneira quantitativa e qualitativa (BASUDEV et al., 1995; ROMANO-SILVA et al., 1993; 1994; MASSENSINI et al., 1998). Estes dados sugerem que, dependendo da localização do canal e da ligação da neurotoxina no sítio, é possível modular quantitativamente e ou qualitativamente o influxo de Na^+ , despolarização, aumento de Ca^{+2} no

citoplasma e exocitose (liberação de neurotransmissores) e conseqüentemente entender melhor os efeitos fisiológicos, fisiopatológicos e tóxicos decorrentes da ação destas neurotoxinas.

As diferenças nas estruturas e ações sobre canais para Na^+ entre α - e β -neurotoxinas escorpiônicas foram investigadas, mas as diferenças com relação aos efeitos farmacológicos são menos conhecidas. Mais estudos são requeridos para se determinar o papel de ambas as classes de toxinas no envenenamento escorpiônico.

Assim, baseado nas considerações acima, foram realizados estudos comparando os efeitos de duas das mais importantes e letais toxinas que atuam em canais para Na^+ (TsTX-V e TsTX-I, α - e β -neurotoxinas respectivamente) isoladas da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, sobre a atividade simpatoadrenal, medindo a concentração de catecolaminas plasmáticas e suas ações sobre a pressão arterial em ratos conscientes e não imobilizados (no sentido de evitar a interferência de anestésicos gerais e estresse de imobilização sobre os efeitos das toxinas). Foram também realizados experimentos com a peçonha e estas toxinas, para verificar a ação das mesmas na captação dos neurotransmissores GABA, L-glutamato e dopamina em sinaptosomas cerebrais de ratos, visando um estudo sobre a atuação de toxinas escorpiônicas para canais de Na^+ dependentes de voltagem e seu papel nestes sistemas de recaptação de neurotransmissores em sinaptosomas.

Outros experimentos foram realizados em células isoladas de músculo liso vascular de aorta de ratos, que, por não apresentarem terminações nervosas capazes de liberar neurotransmissores sob efeitos despolarizantes, são ótimos modelos para estudar a ação direta da peçonha e toxinas sobre a concentração de Ca^{+2} citoplasmática, neste tipo de célula.

Em conjunto, estes experimentos permitiram comparar e avaliar os diferentes efeitos *in vivo* e *in vitro*, advindos da interação destas duas classes de neurotoxinas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo estudar (e comparar) os efeitos de duas classes de neurotoxinas que atuam em canais para Na^+ (TsTX-V e TsTX-I, α e β -neurotoxinas, respectivamente) isoladas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* sobre a liberação de catecolaminas, pela determinação dos níveis plasmáticos das mesmas, e seus efeitos sobre a pressão arterial em ratos conscientes e não imobilizados, os efeitos sobre a captação de neurotransmissores (GABA, glutamato e dopamina) em sinaptosomas de ratos e avaliar os efeitos diretos em células de músculo liso de aorta de ratos, determinando a concentração citoplasmática de Ca^{+2} .

Para se atingir esses objetivos, foram realizados:

- Isolamento das toxinas TsTX-I e TsTX-V da peçonha de *T. serrulatus*, por meio de cromatografia de troca iônica e CLAE em coluna de fase reversa C-18;
 - Determinação da pressão arterial média em ratos conscientes e não imobilizados injetados intravenosamente com a peçonha ou toxinas;
 - Re-validação e adaptação do método para determinação de catecolaminas em plasma de ratos;
 - Determinação dos níveis de catecolaminas em plasma de ratos conscientes e não imobilizados injetados intravenosamente com a peçonha ou toxinas;
 - Estudo de captação dos neurotransmissores GABA, L-glutamato e dopamina, empregando-se diferentes concentrações das toxinas e peçonha;
 - Isolamento e cultura primária de células de MLV de aorta de ratos para determinação da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em presença da peçonha ou toxinas.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 PEÇONHA

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* Lutz e Mello (1922), extraída por estímulo elétrico do telson, liofilizada e mantida a - 20 °C, foi comprada da *Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA* - Belo Horizonte, MG, Brasil.

3.1.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, var. albino), linhagem Wistar, pesando de 280 a 360 gramas, e camundongos machos (*Mus musculus*, var. albino), linhagem Suíço, pesando de 20 a 22 gramas, todos procedentes do Biotério Central do Campus Universitário da USP de Ribeirão Preto.

Os ratos foram alojados em número de 5 em caixas de polipropileno com tampa metálica (50×35×15 cm) e após a cirurgia experimental (ver métodos), foram alojados individualmente em caixas menores (30×18×15 cm) com serragem, e mantidos sob condições padrões de laboratório com ciclo de luz/escuro de 12 horas e temperatura constante de 20° a 24° C, ração peletizada e água *ad libitum*. Após os experimentos, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de tribromoetanol (300 mg/kg. i.v.) seguidos de uma dose de 0,1 mL/animal de KCl 1M, i.v.

Os camundongos foram alojados em número de 20 em caixas de plástico com tampa metálica (50×35×15 cm) com serragem, e mantido nas mesmas condições descritas para os ratos.

A alimentação de ambos os tipos de animais consistia de ração básica (Nuvital, Nuvilab CR1[®], Curitiba, PR) composta de carbonato de cálcio, farelo de trigo, farelo de soja, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, enriquecida com vitaminas, microelementos minerais e aminoácidos (DL-metionina e lisina).

Para os experimentos com sinaptosomas, foram utilizados ratos machos da linhagem Sprague Dawley, (200 - 250 g), provenientes do Laboratório Charles River, USA, e mantidos sob semelhantes condições padrões de laboratório.

Todos os procedimentos com os animais, por estarem de acordo com os *Princípios Éticos na Experimentação Animal*, segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CoBEA), foram aprovados pela *Comissão de Ética no Uso de Animais* - (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP (protocolo no. 03.1.1069.53.0).

3.1.3 REAGENTES E DROGAS ESPECIAIS

- β -alanina - *Sigma Chemical Co* (St. Louis, MO-USA).
 - 1900 TR Liquid Scintillation Analyser - *Packard Brand Life Science Products/ Perkin-Elmer*, UK.
 - 2,2,2, Tribromoetanol - *Acrós Organics*, NJ, USA.
 - ^3H - Dopamina, ^3H -GABA e ^3H -L-Glutamato - *Perkin Elmer Life Sciences*, USA.
 - Acetonitrila P.A. (grau HPLC) - *Mallinckrodt Baker, Inc.*, USA.
 - Ácido Nipecótico - *Sigma-Aldrich Co* (St. Louis, MO-USA).
 - Ácido Trifluoroacético P.A - *Vetec Química*, RJ, Brasil.
 - Acrilamida - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Albumina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Azul de Tripam - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Bis-Acrilamida - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Bitartarato de noradrenalina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - BSA - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Canamicina - *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany.
 - Cloridrato de 3-metoxitiramina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Cloridrato de adrenalina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Cloridrato de dl-metanefrina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Cloridrato de dl-normetanefrina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Cloridrato de dopamina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - CMC-52 microgranular - *Whatman plc.*, UK.
 - Colagenase - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - Coomassie Brilliant Blue G-250 - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - DIBAC₄(3) - *Molecular Probes Inc*, USA.
 - DMEM - *Life Technologies (Gibco BRL)*, USA.
 - DPBEA - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - DTT - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - EDTA - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
 - EGTA - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
-

- Estreptomicina - *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany.
- Fura-2/AM - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- GBR12090 - *Sigma-Aldrich Co* (St. Louis, MO-USA).
- Glutathiona P.A. - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA)
- Heparina 5000 UI (Liquemine[®]) - *Roche Pharmaceuticals Inc.*, NJ, USA.
- Heptano - *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany.
- Inibidor de tripsina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- Ionomicina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- Kit BCA “protein assay” - *Pierce Chemical Co*, IL, USA.
- Kit DNA Plasmid Max - Maxi-Prep - *Qiagen International* – USA.
- Kit FuGENE 6[™] transfection protocol (FuGENE 6 Transfection Reagent) - *Roche Applied Science*, USA.
- Metanol P.A. - *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany.
- Octanol P.A. - *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany.
- OptiPhase Supermix - *Wallac Perkin-Elmer Precisely*, UK.
- Papaína - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- Pargilina - *Sigma-Aldrich Co* (St. Louis, MO-USA).
- PCD - *Research Biochemicals International*, USA.
- Penicilina G Sódica - *Sigma-Aldrich Co* (St. Louis, MO-USA).
- RO- 41-0960 - *Sigma-Aldrich Co* (St. Louis, MO-USA).
- ScintiVerse - *Fisher Scientific International Inc.*, UK.
- SDS - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- Tampão HEPES - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- Tampão Tris HCl - *Sigma-Aldrich Co* (St. Louis, MO-USA).
- Tampão Tris pH 9,5 - *Celm.* - *CELM* -Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos/ Brasil .
- Taurina - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- TEMED - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- ToABR - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).
- TTX - *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO-USA).

Os demais reagentes não mencionados na lista foram todos de grau analítico.

3.1.4 EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos (mixer) mod. AP 56 - *Phoenix*;
 - Agitador magnético *Clay Adams - Clay Adams Bencton & Dickinson Division*, CA, USA;
 - Agitador mecânico com banho termostatzado *Incu-Shaker bath 0817B – Dubnoff*;
 - Analisador de cintilação *Wallac 1450 Microbeta/Trilux 1450-029 - PerkinElmer Precisely*, UK.
 - Balança analítica digital - *Ohaus*;
 - Balança digital BG 4400 - *Geahaka*;
 - Banho rotativo mecanicamente refrigerado para frascos de liofilização *Mini-Shell – FTS Systems*, USA;
 - Bomba a vácuo *Marconi - Art. Lab.*, Brasil;
 - Câmara de Fluxo Laminar Vertical - *Veeco*;
 - Centrífuga Clínica *Excelsa II 206 - Fanem*;
 - Centrífuga de 12.000 r.p.m. *Centimicro 243 - Fanem*;
 - Centrífuga RC- 2B™ (Rotor SS-34) *Sorvall® - Thermo Electron Corporation*, USA.
 - Centrífuga refrigerada a vácuo mod. J2-21 *Beckman - Beckman Coulter, Inc.*, USA;
 - Coletor Digital de Frações *SUPERFRAC* conectado a duas Unidades Controladoras (Ótica e Ultravioleta UV-1) e Registrador *REC 102 Pharmacia Biotech - Amersham Biosciences (General Electric Company, Healthcare Division)*, USA;
 - Coluna analítica de fase reversa C-18 *Shim Pack CLC-ODS(M)* (0,46 x 25 cm), partículas de 5 µm - *Shimadzu Instruments Corp.*, Tokyo, Japan;
 - Coluna de fase reversa *LiChrocart® Purospher® RP-18* (5 µm) *endcapped* de 125 x 3,0 mm – *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany;
 - Condutivímetro *CD-20 Digimed – Digimed Analytical and Knwaagen Weight Precision Scale*, USA.
 - Espectrofotômetro computadorizado *U-2001 Hitachi - Hitachi High-Technologies Corporation*, Japan;
 - Estufa de carbogênio com controle de temperatura e unidade *NU5510 NuAire - NuAire Inc.*, USA
 - Fonte de Eletroforese *EPS 3500 XL Pharmacia Biotech - Amersham Biosciences (General Electric Company, Healthcare Division)*, USA;
 - Homogeneizador tipo *Potter-Elvehjem LS-50* (haste em aço inox e pistão em Teflon®) (*Labo-Stirrer*, Japan)
 - Liofilizador de mesa *Flexy-Dry µP – FTS Systems*, USA;
-

- Lupa cirúrgica no. 1628 – *DF Vasconcelos*;
 - Microscópio confocal de varredura a laser de criptônio-argônio *Bio-Rad MRC-1000 - Bio-Rad Life Science Group*, Hercules, CA, USA;
 - Microscópio invertido *Nikon Diaphot 200* equipado com lentes de 40X *Nikon PahnApo - Nikon Corporation*, Tokyo, Japan.
 - Microscópio para fluorescência de luz invertida *Nikon Diaphot D104B - Nikon Corporation*, Tokyo, Japan ;
 - Potenciômetro digital *DM-20 Digimed - Digimed Analytical and Knwaagen Weight Precision Scale*, USA.
 - Pré-coluna RP-18 LiChrocart® Purospher® – *Merck KGaA*, Darmstadt, Germany;
 - Sistema de Aquisição de Dados *Power Lab*® (operado por um PC IBM AMD-K6® 900 MHz e software Chart V4.0.4® para Windows) composto por transdutor de pressão arterial *MLT0380*, válvula anti-refluxo e Unidade de Pré-amplificação e Registro *ML820 Bridge Amplifier 2/20 Power Lab*® - *ADInstruments Ltd.*, USA;
 - Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência *Shimadzu* (acoplado a um PC-IBM Pentium® 450 mHz e monitorado pelo software *CLASS VP*® para Windows™) composto por Sistema Controlador *SCL-10 A_{VP}*, 2 Bombas *LC-10 A_{VP}*, (para mistura automatizada dos tampões) Forno para Colunas *CTD-10 A_{VP}*, Coletor Automático de Frações *FRC-10A*, Detector UV *SPD-10 A_{VP}* e Injetor Manual *Rheodyne* (amostrador de 500 µL) - *Shimadzu Instruments Corp.*, Tokyo, Japan;
 - Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência *LC-10 AD Shimadzu*, acoplado a um Integrador *CR-6A Chromatopac* e equipado com Detector Eletroquímico *L-ECD-6A* (equipado com eletrodo de referência de Ag/AgCl) e injetor *Rheodyne mod. 7125* com amostrador de 50 µL - *Shimadzu Instruments Corp.*, Tokyo, Japan;
 - Sistema de eletroforese Minigel *Sigma-Aldrich - Sigma-Aldrich Co*, USA;
 - Sistema de filtração *Ultra-Ware Millipore*® - *Millipore, Molsheim*, France;
 - Sistema de filtração/aspiração para placas com 96 poços *Brandel Systems XR-96-MS - PerkinElmer Precisely*, USA;
 - Sistema de Ultrapurificação de Água *Milli-Q*® - *Millipore Corporation*, USA;
 - Sistema de Ultra-Som 40000 Hz *Thornton - Thornton Inpec Eletrônica Ltda*, Brasil;
 - Sistema para Medida de Íons Intracelulares *Delta Ran mod. RM-F* composto por uma lâmpada de xenônio (75 W) e filtros *X-1016T – Photon Techonolgy International inc.*, U.K.;
 - Ultracentrífuga *L-65-B* (rotor *SW-27*) *Beckman - Beckman Coulter, Inc.*, USA.
-

3.2 MÉTODOS

3.2.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA SOLÚVEL (TsV)

A peçonha do escorpião *T. serrulatus*, empregada nos experimentos, foi diluída em solução salina 0,9% e centrifugada a 11.270 *xg* por 5 minutos. A seguir foi determinada a absorvância do sobrenadante em comprimento de onda de 280 nm e a quantidade de peçonha solúvel a ser injetada nos animais foi calculada de acordo com o valor do Coeficiente de Extinção (ϵ), obtido através da determinação de proteínas totais.

3.2.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS DA PEÇONHA DE *T. serrulatus* e DAS TOXINAS TsTX-I E TsTX-V

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), empregando-se o kit adquirido comercialmente (*Bio-Rad Protein assay*, Bioagency®) e confirmada pelo método da absorvância em 280/205 nm (SCOPES, 1974). Como padrão, foi usada a soroalbumina bovina (BSA).

Para a determinação de proteínas totais da peçonha liofilizada de *T. serrulatus*, foram pesados 5 mg e dissolvidos em 1 mL de água destilada, e para as toxinas TsTX-I e TsTX-V, 150 μ g, e diluídas em 1 mL de água destilada. As soluções contendo a peçonha ou toxinas foram centrifugadas a 12.000 r.p.m. (11270 *xg*) por 5 minutos, determinadas sua absorvância em 280 nm (solução sobrenadante), e diluídas para concentrações adequadas para a sensibilidade dos métodos.

3.2.3 ENSAIO DE LETALIDADE DA TsV

O ensaio de letalidade foi realizado por meio da determinação da dose letal 50% (DL_{50}) da TsV em camundongos machos Suiços (20-22 g) injetados com a mesma.

A TsV foi geometricamente diluída (fator 1,5) em 100 μ L de solução salina 0,9 % e administrada por via i.p, usando seringas descartáveis de 1mL e agulhas hipodérmicas de 12,7 $\times$ 0,45 mm. Foram empregadas 6 doses para cada teste e 10 animais por dose.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (30 $\times$ 18 $\times$ 15 cm) com tampa de metal e serragem, com água e alimentação *ad libitum*, por um período de 24 horas.

Os valores da DL_{50} e respectivos limites fiduciais, foram calculados pelo método de WEIL (1952).

3.2.4 PURIFICAÇÃO E CRITÉRIOS DE PUREZA DAS TOXINAS TSTX-I E TSTX-V

3.2.4.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DE *T. serrulatus*

A peçonha do escorpião *T. serrulatus* foi extraída e fracionada por cromatografia de troca iônica (catiônica) em coluna de CMC-52, segundo modificações do método descrito por ARANTES et al. (1989), como segue:

Uma amostra de 400 mg da peçonha liofilizada e dissecada de *T. serrulatus* foi suspensa em 2,5 ml de tampão AMBIC (NH_4HCO_3) 0,01 M, pH 7,8 a 0 °C. A suspensão foi centrifugada a 10.000 r.p.m. (12.100 xg), por 10 minutos a 0 °C, em centrífuga Sorvall® RC2-B. O sobrenadante foi retirado e o resíduo novamente suspenso em 2,0 mL de tampão gelado e centrifugado. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos, a mistura deixada em repouso por 6 horas a 0 °C e novamente centrifugada a 12.100 xg. por 10 minutos. A seguir, foi separado o sobrenadante de 4,3 mL para ser aplicado à coluna, sendo que 10 µL do mesmo foram diluídos em 1,0 mL de água destilada para a leitura da absorvância em 280 nm.

Uma coluna de vidro borossilicato de 2,5 cm x 63,0 cm foi preparada com CM-celulose-52 microgranular *Whatman*. O tratamento da resina de CMC-52 foi realizado da seguinte maneira: a resina foi suspensa em uma solução de NaOH 0,5 M e após 5 minutos, filtrada em funil com placa de vidro sinterizado sob pressão reduzida e exaustivamente lavada com água destilada até pH neutro. A seguir, foi suspensa em HCl 0,5 M por mais 5 minutos e novamente lavada com água destilada até pH neutro. Finalmente a resina foi lavada com AMBIC 0,01 M, pH 7,8, deaerada sob pressão reduzida e cuidadosamente colocada na coluna.

Após o empacotamento da coluna, a mesma foi levada para a câmara fria (4°C) e novamente lavada com AMBIC 0,01M por uma noite, até equilíbrio completo, testado por medida de condutividade. O fluxo foi então regulado para 26,7 mL/hora.

O extrato da peçonha foi aplicado à coluna e eluído inicialmente com AMBIC 0,01M, pH 7,8. A partir do tubo 156 (468 mL) iniciou-se um gradiente convexo de concentração do tampão de 0,01 M a 1,00 M.

O sistema utilizado para a obtenção do gradiente convexo de concentração consiste de um kitassato de 500 mL, contendo AMBIC 0,01 M, conectado à coluna e a um funil de separação contendo o tampão 1,0 M. Foram coletadas frações de 3,0 mL por tubo (em coletor digital automatizado SUPERFRAC, conectado a Unidade Controladora e Sistema Ultravioleta UV-1 e registrador REC 102 Pharmacia Biotech), suas absorvâncias determinadas em 280 nm e locadas

em função do número das mesmas. As frações correspondentes a cada pico de absorvâncias, designadas de I-XIII, foram reunidas e liofilizadas até completa remoção do sal.

A ausência de sais de amônio em todas as frações liofilizadas foi comprovada pelo teste qualitativo de Nessler.

3.2.4.2 DETERMINAÇÃO DO GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO

O valor de concentração do tampão foi obtido experimentalmente, através da medida da condutividade das frações nos tubos por meio de condutivímetro digital *DC-20 Digimed*.

Os valores de condutividade foram lançados em uma curva padrão, traçados com concentrações molares conhecidas do tampão NH_4HCO_3 , obtendo-se assim a concentração molar do tampão nos tubos.

3.2.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DAS FRAÇÕES XI E XIII DA PEÇONHA DE *T. serrulatus*

As amostras das frações XI e XIII, obtidas a partir da cromatografia da peçonha bruta, como descrito detalhadamente no item 3.2.4.1, foram dissolvidas em 500 μL de Tampão A (TFA 0,1% + AcN 5% em água bidestilada/deionizada) e centrifugadas por 5 minutos a 11.270 $\times g$. As subfrações foram purificadas em um Sistema de CLAE da *Shimadzu*, acoplado a um microcomputador PC-IBM *Pentium*[®] 450 MHz. O processo foi realizado à temperatura ambiente, fluxo de 1 mL/min, pressão máxima de 300 kgf/cm², com detector operando a 214 nm. A mistura automatizada dos tampões foi realizada por meio de 2 bombas *LC-10 AD_{VP}* do próprio sistema. Os tampões foram desgaseificados por saturação com gás hélio. Todo o processo foi monitorado pelo software *Shimadzu CLASS VP*[®] para *Windows*[™].

A amostra solúvel de cada fração descrita foi aplicada manualmente (por meio de um injetor Rheodyne com amostrador de 500 μL) a uma coluna analítica de fase reversa C-18 *Shim Pack CLC-ODS(M)* de 0,46 x 25 cm, partículas de 5 μm (*Shimadzu*), previamente equilibrada com o Tampão A. Após 5 minutos de eluição com o Tampão A, iniciou-se um gradiente linear de concentração de AcN, chegando até a 100 % do Tampão B (TFA 0,1% + AcN 60% em água bidestilada/deionizada) em 60 minutos, permanecendo nessa concentração por 2 minutos (para a fração XIII, correspondente a TsTX-I, esse tempo foi de 5 minutos e o processo completo de eluição foi de 60 minutos). Em seguida a coluna foi novamente equilibrada com o Tampão A, para uma posterior aplicação. O processo completo ocorreu em um período de 72 min.

3.2.4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) SEM SDS PARA PROTEÍNAS BÁSICAS

A eletroforese em placa de gel poliacrilamida sem agentes desnaturantes foi realizada pelo método de REISFELD et al. (1962) com profundas modificações, segundo descrito por ARANTES et al. (1989):

A) MONTAGEM DO SISTEMA :

O sistema de eletroforese utilizado foi o Minigel *Sigma*[®]. Duas placas de vidro (10 cm x 8 cm), espaçadas entre si por espaçadores de 0,75 mm, são imobilizadas verticalmente com o auxílio de pinças, de modo a formar entre elas um espaço retangular de 8 cm x 10 cm x 0,75 mm. Esta câmara é preenchida com a solução que dá origem ao gel.

B) PREPARO DO GEL:

O gel foi preparado a 10% (m/v) em acrilamida *Sigma*[®] (bisacrilamida : acrilamida, 0,8:30,0) tamponado a pH 4,5 por acetato de potássio 0,05 M e contendo 0,5% (v/v) de TEMED (*Sigma*[®]) e 0,1% (m/v) de persulfato de amônio como catalisadores e iniciadores da reação de polimerização do gel. O tampão do eletrodo foi β -alanina em ácido acético 0,035M, pH 4,5.

C) APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE CORRIDA:

As amostras foram dissolvidas em 10 μ L de solução saturada de sacarose p.a., em quantidade não determinada, mas suficiente para proporcionar uma boa visualização dos seus componentes.

As condições de voltagem, amperagem e potência foram determinadas e monitoradas por um sistema digital de Fonte de Eletroforese *EPS 3500 XL Pharmacia Biotech*[®] e variaram para cada eletroforese, sendo indicadas nas legendas das mesmas. Decorrido o tempo adequado, determinado pela presença do indicador fucsina básica no centro da placa, o gel foi retirado da mesma, mergulhado em água e, em seguida, corado por cerca de 3 horas com uma solução corante de Coomassie Brilliant Blue G-250 *Sigma*[®] a 0,2% (m/v) em metanol : água 1:1(v/v). O gel foi descorado e conservado em ácido acético a 7% (v/v) em água destilada.

3.2.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A seguir, segue descrição detalhada do procedimento cirúrgico para implante dos cateteres. Inicialmente, os animais (ratos Wistar machos de 280 - 360 g) previamente mantidos em jejum por cerca de 12 horas, foram anestesiados com 2,2,2, Tribromoetanol (*Acrós Organics*) na dose de 250 mg/kg, via i.p., diluído em salina 0,9%, por ultra-som, sem aquecimento.

A cirurgia foi feita sob condições de assepsia (os instrumentos cirúrgicos foram esterilizados com álcool 70%, mantidos em estufa a $\pm 100^{\circ}\text{C}$ e no local da cirurgia, foi feito assepsia com solução de polivinil pirrolidona iodo (PVP-I) em álcool a 70%).

As cânulas de polietileno (PE) estéreis (*Bencton & Dickinson*, CA, USA), foram preparadas fundindo-se uma PE₁₀ (0,28 mm d.i.; 0,61 mm d.e.) a uma PE₅₀ (0,58 mm d.i; 0,96 mm d.e) e preenchidas com salina fisiológica heparinizada 2% v/v e obstruídas em sua extremidade livre com pinos de metal. Em uma pequena incisão de cerca de 1cm na virilha previamente tricotomizada do animal, foi isolada a artéria femoral esquerda e, com auxílio de uma tesoura oftálmica *West Cott*, foi feita uma incisão nesta, onde cuidadosamente foi introduzido o segmento da cânula (PE₁₀, cerca de 3-4 cm) até aorta abdominal, e o cateter foi firmemente preso na artéria, por meio de fio cirúrgico. Em outra pequena incisão de cerca de ½ cm na face externa direita do músculo esterno-mastóideo, foi isolada a veia jugular e esta cateterizada com cânula flexível de silicone (*Bencton & Dickinson*, CA, USA, d.i. 0,50 mm, d.e. 0,85 mm), fixada a um pequeno suporte em látex cirúrgico e preenchida com salina fisiológica heparinizada a 2 % v/v. Após a introdução da mesma na jugular (um segmento $\pm 2,5$ cm), o suporte de látex foi suturado no referido músculo, para manter firmemente preso o cateter em sua posição. Ambos cateteres foram delicadamente conduzidos subcutâneamente com auxílio de um trocater estéril de aço inox (2,0 mm, d.e.), exteriorizados no dorso do animal (cintura supraescapular) e fixados com fio cirúrgico, de modo que, aproximadamente 2-3 cm de cada cateter ficasse em posição praticamente perpendicular ao dorso do animal.

Após o procedimento cirúrgico, o local da cirurgia sofreu assepsia preventiva adequada e os animais foram mantidos em recuperação em caixas individuais (30×18×15 cm) com serragem limpa, água e alimentação *ad libitum*, por um período de 30 – 36 horas em ambiente controlado, como descrito no item 3.1.2 acima.

Os cateteres implantados via artéria femoral esquerda até a aorta abdominal serviram para o registro direto da pressão arterial e coleta de sangue para determinação de catecolaminas plasmáticas e o implantado na veia jugular, para permitir a administração endovenosa da TsV e suas toxinas TsTX-I e TsTX-V.

3.2.6 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

A pressão arterial foi determinada em ratos Wistar machos pesando de 280-320 g, conscientes e não imobilizados e mantidos em gaiolas individuais. Após um período de 30-36 horas de recuperação do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos por um período mínimo de 6 horas no local, antes dos experimentos. O cateter femoral (exteriorizado no dorso do animal) foi conectado a um transdutor de pressão arterial (modelo *MLT0380 PowerLab*[®]) com sistema de lavagem e válvula para evitar o refluxo de sangue, evitando que o operador tocasse nos animais ou introduzisse as mãos dentro da gaiola, e as cânulas preenchidas com salina heparinizada 2% v/v. Este transdutor foi conectado a um sistema para pré-amplificação, transformação e registro de dados obtidos (modelo *ML820 Bridge Amplifier 2/20 Power Lab*[®]), acoplado a um PC-IBM AMD-K6™ 900 MHz e o registro, transformação, estocagem e análise de dados foi realizada pelo software *Chart V4.0.4™ for Windows*[®]. O equipamento foi prévia e cuidadosamente calibrado manualmente com um manômetro de mercúrio.

Os experimentos foram iniciados após a estabilização da pressão arterial (aproximadamente 30 minutos após terem sido conectados ao transdutor de pressão), em ambiente com poucos ruídos externos e temperatura variando de 23-26 °C, entre 11:00 e 17:00 horas.

Com base em experimentos preliminares empregando-se diferentes doses de TsV e toxinas, foram estabelecidas as seguintes doses para este estudo: 100 e 50 µg/kg de peçonha solúvel, 15 e 30 µg/kg de cada toxina TsTX-I ou TsTX-V, diluídas em 500 µL de salina 0,9% e administradas via cateter jugular, em fluxo contínuo de aproximadamente 25 µL/segundo, 10 minutos após o início do registro da pressão arterial. A MAP foi continuamente monitorada em tempo real por um período total de 2 horas após a administração da peçonha ou toxinas.

Os valores de MAP (6-10 animais) foram obtidos calculando-se a média de uma seção de 5 minutos do registro contínuo.

3.2.7 ANÁLISE DE CATECOLAMINAS EM PLASMA DE RATOS

Os níveis de catecolaminas em plasma de ratos foram determinados por CLAE, segundo técnica descrita por Forster e Macdonald (1999) para pequenos volumes de plasma (extração líquido-líquido e complexação com DPBEA e formação de par iônico) com pequenas modificações a partir do método descrito por Marques et al.(2002).

3.2.7.1 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DOS PLASMAS

Para estes experimentos foram utilizados plasmas de ratos machos Wistar, pesando 340-360 gramas. Após o período de recuperação do procedimento cirúrgico (30-36 h), os animais foram ambientados por cerca de 9-12 h no local da coleta, com alimentação e água *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados em ambiente com temperatura controlada de 20-23 °C, humidade relativa do ar de 65-75%, sempre no período de 8:00 às 14:00 h. Os animais foram injetados com solução salina 0,9 % (grupo controle), TsV (50 e 100 µg/kg) ou toxinas (15 e 30 µg/kg de cada toxina), diluídas em 500 µL de solução salina 0,9 % e administradas endovenosamente em fluxo contínuo de 25 µL/seg através de um cateter de silicone de 25 cm de comprimento, conectado ao cateter jugular propriamente dito.

O plasma foi obtido de sangue arterial e este coletado via cateter femoral, conectado também a um outro cateter heparinizado de cerca de 25 cm de comprimento, evitando contato direto do animal com o experimentador. Neste estudo, foram preconizados 4 diferentes tempos de coleta em um mesmo animal (num total de 6-10 animais por dose/tratamento): 10 minutos antes da administração de salina, TsV e das toxinas e 2,5, 30 e 90 minutos após a administração das mesmas. Precauções especiais foram tomadas no momento da coleta, para se evitar o estresse dos animais e outros relacionados ao disparo de baroreflexos e degradação de catecolaminas *ex vivo*.

O sangue foi coletado em fluxo contínuo de 600 µL/minuto por meio de uma seringa heparinizada de 3 mL, conectada ao cateter de silicone heparinizado de cerca de 25 cm, por sua vez conectado ao cateter femoral. O volume variou conforme o tratamento e o tempo, tendo-se em vista obter uma quantidade mínima adequada de plasma para detecção das catecolaminas e com um limite máximo de 0,9 % do peso corporal dos animais, dentro do tempo das 3 primeiras coletas. Após cada coleta, foram infundidos cerca de 500-700 µL de solução salina 0,9% pela mesma via e com as mesmas características de administração descritas para os controles ou tratamentos.

O sangue coletado foi imediatamente transferido para tubos cônicos de microcentrifuga (tipo *Eppendorf*[®]), previamente mantidos em gelo, contendo solução antioxidante (Glutathione *Sigma*[®] 60 mg/mL + EGTA 95 mg/mL, preparados em água bidestilada e deionizada) com pH ajustado para 7,18 (PEULER e JOHNSON, 1977) na proporção de 50 µL sol. antioxidante/mL de sangue. Os tubos foram homogeneizados, protegidos da luz e imediatamente imersos e mantidos em banho de gelo. O plasma foi obtido por centrifugação deste sangue a 5000 r.p.m. (2.440 xg) por 5 minutos, em temperatura de -3 a 0 °C sob vácuo, em centrífuga refrigerada *Beckman* mod. J2-21.

Após centrifugação, o plasma foi imediatamente transferido para tubos criogênicos, protegidos da ação da luz e conservados a - 85 °C até o processamento das amostras. O tempo entre a coleta do sangue e o congelamento dos plasmas variou de 2-3 horas.

3.2.7.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO E ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS ANALÍTICOS ESPECÍFICOS

As soluções estoques de bitartarato de noradrenalina, cloridrato de adrenalina, cloridrato de dopamina, cloridrato de metanefrina, cloridrato de dl-normetanefrina e cloridrato de 3-metoxitiramina (todos da *Sigma*[®]) foram preparadas na concentração de 1 mM em ácido acético 400 mM. As soluções-estoque foram diluídas em ácido acético 400 mM para obtenção das soluções de uso (solução mãe).

Devido a grande variação dos níveis de catecolaminas nos diferentes tratamentos e nos diferentes tempos, bem como os pequenos volumes de plasma coletados e valores em animais controles e antes dos tratamentos, foram preparadas diferentes concentrações de padrões de noradrenalina e adrenalina. Assim, foram preparadas as seguintes concentrações de padrões para noradrenalina: 2,00; 2,25; 2,50; 3,00; 5,00; 10,00; 15,00 e 20,00 pM/mL e 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 3,00; 4,00; 8,00 e 10,00 pM/mL para adrenalina (25 µL de cada padrão, preparados à partir da solução-mãe). Tendo em vista os baixos níveis de catecolaminas encontrados nos animais controles, 50 µL de cada padrão foram preparados nas seguintes concentrações: noradrenalina: 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00 e 4,00 pM/mL e adrenalina: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00 e 4,00 pM/mL.

As curvas de calibração (padrões) foram obtidas através da análise de alíquotas de 500 µL de tampão amônia 2 M, pH 8,8, enriquecidas com 25 µL ou 50 µL de cada uma das soluções padrão de noradrenalina e adrenalina.

Tendo em vista o emprego de diferentes concentrações de catecolaminas, bem como valores encontrados bem abaixo dos descritos para os referidos métodos e o emprego de 50 µL de solução-padrão (ao invés dos usuais 25 µL), alguns parâmetros analíticos específicos foram determinados com respeito à curva de calibração, linearidade, precisão e exatidão para os limites de quantificação e recuperação dos padrões extraídos.

A **curva de calibração** define, adequadamente, a relação existente entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento. As concentrações dos padrões devem ser escolhidas com base nas concentrações esperadas no estudo realizado. Em seguida, são calculadas as equações de regressão linear ($y = ax + b$) e os coeficientes de correlação (r^2).

A **linearidade** corresponde a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada dentro de uma determinada faixa (SWARTZ e KRULL, 1998). A linearidade dos métodos foi obtida de forma idêntica à da curva de calibração, estendendo-se a faixa de concentração até 20 pM/mL para noradrenalina e 10 pM/mL para adrenalina.

A **precisão** de um método analítico é a medida de erro randômico, e é definida como a concordância entre o resultado das replicatas de uma mesma amostra. É expressa em porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das medidas das replicatas (CAUSON, 1997). O valor numérico usado para quantificar a precisão é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo

$$CV = [S / K] \times 100, \text{ onde}$$

Onde, S = desvio padrão e

K = valor médio da relação [altura do padrão/concentração do padrão]

A **exatidão** representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor aceito como referência. Ela é melhor expressa como porcentagem de erro sistemático.

A exatidão foi avaliada utilizando os resultados experimentais obtidos na precisão, sendo expressa em porcentagem do erro sistemático.

$$\% \text{ de erro sistemático} = [(valor \text{ obtido} - valor \text{ real})/valor \text{ real}] \times 100$$

O **limite de quantificação** (LQ) representa a mais baixa concentração da substância analisada que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade (SWARTZ e KRULL, 1998). Para o LQ ser aceito, ele deve apresentar precisão e exatidão de até 20 % de acordo com o Center for Drug Evaluation and Research (1998).

Foram determinados 2 limites de quantificação para cada catecolamina : 0,75 pM/mL e 0,5 pM/mL para noradrenalina e adrenalina, respectivamente (para controles); para os tratamentos (com exceção dos animais injetados com TsTX-V e no tempo zero), 2,0 pM/mL para noradrenalina e 1,0 pM/mL para adrenalina. Para se determinar essas concentrações, foram construídas curvas de calibração para cada analito. Os valores foram obtidos pela média em triplicata dos valores da curva de calibração e o menor ponto em quintuplicata. Assim, foram determinados os valores de precisão e exatidão do limite de quantificação.

A **recuperação** de um método analítico é melhor estabelecido pela comparação da resposta de uma amostra extraída, em concentrações altas, médias e baixas, com outras não submetidas ao processo extrativo (chamado “curva seca”), representando 100 % da recuperação (CAUSON, 1997).

Embora recuperações próximas a 100 % sejam desejáveis, a extensão da recuperação de um analito pode ser aceita até na ordem de 60 %, se for precisa, exata e reprodutível de acordo com o Center for Drug Evaluation and Research, 1998.

A recuperação da noradrenalina foi obtida através da construção da curva com 5 concentrações (1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20 pM/mL) e da adrenalina com 4 concentrações (0,5; 2,0; 5,0; e 10,0 pM/mL) em duplicatas. As amostras não extraídas foram diretamente injetadas no cromatógrafo (25 µL da solução mãe, com exceção dos menores pontos, que foram injetados 50 µL). A porcentagem de recuperação foi calculada dividindo-se a resposta da curva extraída pela resposta da curva não extraída (curva seca) e multiplicando-se esse valor por 100, e , devido a ausência de padrão interno, a recuperação das catecolaminas foi obtida diretamente pela comparação da curva seca com a extraída.

3.2.7.3 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Amostras de plasma de ratos injetados com a TsV (100 e 50µg/kg) ou toxina TsTX-I (30 e 15 µg/kg) foram empregadas em diferentes proporções, completando-se sempre o volume para 500 µL. Para os animais controles e os injetados com TsTX-V, foi feito um “pool” com iguais volumes de plasma de 2 animais, e completados para 1000 µL (o volume de plasma foi maior, devido à baixa concentração de catecolaminas plasmáticas). Os volumes foram completados, quando necessário, com tampão amônia 2 M, pH 8,8. As amostras (500 ou 1000 µL) foram adicionadas de 500 µL de tampão amônia 2 M, pH 8,8 contendo 4 g/L de ácido difenilbórico etanolamina (DPBEA - *Sigma*[®]) e 5g/L de EDTA e de 1,5 mL de heptano contendo 3,5 g/L de brometo de tetraoctilamônio (ToABR - *Sigma*[®]) e 10 mL/L de octanol

(Merck). Os tubos foram agitados em mixer durante 3 minutos e centrifugados a 1.200 $\times g$ por 5 minutos. As fases orgânicas (1 mL) foram transferidas para novos tubos cônicos âmbar e adicionadas de 500 μL de octanol e 60 μL de ácido acético 400 mM. As misturas foram novamente agitadas durante 2 minutos e centrifugadas a 1.200 $\times g$ por 1 minuto (**Figura 1**). As fases aquosas inferiores (cerca de 50-55 μL) foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência. Os extratos foram mantidos em banho de gelo e protegidos da luz até análise.

3.2.7.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As catecolaminas foram isoladas em coluna de fase reversa LiChrocart[®] Purospher[®] C-18, de 125 x 3,0 mm *endcapped*, partículas de 5 μm (Merck) com pré-coluna similar e fase móvel o sistema isocrático constituído de tampão acetato de sódio (3,007g/L) + EDTA (0,124g/L) + SDS (0,0333g/L) e metanol 20 % ajustada a pH 5,1 com taxa de fluxo de 0,7 mL/min e pressão variando de 56-58 kgf/cm². A água usada no tampão foi purificada no Sistema de ultrapurificação de água Milli-Q[®] (Millipore[®]). A fase móvel foi filtrada em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm (Millipore[®]) e deaerada em Sistema de ultra-som T 50 Thornton e bomba a vácuo Marconi, acoplada em sistema de filtração Ultra-ware (Millipore[®]). Foi empregado para as análises um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] constituído por injetor manual Rheodyne mod. 7125 (amostrador de 50 μL), bomba LC-10 AD, operando a pressão máxima de 150 kgf/cm² e detector eletroquímico (potenciométrico) mod. L-ECD-6A com eletrodo de referência Ag/AgCl, operando com potencial de + 0,65 V. Os cromatogramas foram obtidos com o integrador Shimadzu CR-6A Chromatopac.

Os padrões extraídos das catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) foram sequencialmente cromatografados para cada 3-4 amostras de plasma. A altura do pico de eluição das catecolaminas no cromatograma foi utilizada para a determinação da concentração das mesmas, em pm/mL de plasma, levando-se em consideração a média da altura dos picos obtidos com as diferentes concentrações dos padrões extraídos (curva de calibração).

FIGURA 2 - Procedimento de extração para análise de catecolaminas em plasma
(com pequenas modificações do método de Marques et al, 2002)

3.2.8 ISOLAMENTO DE SINAPTOSOMAS CÓRTICO-CEREBRAIS (SCCR) E ESTRIADO-CEREBRAIS DE RATOS (SECR)

A fração sinaptosomal para ensaios de captação de neurotransmissores foi preparada usando o protocolo segundo Gray e Whittaker (1962), com pequenas modificações como descrito por Cecchini et al., 2004. Estes experimentos foram realizados com a intenção de correlacionar a ação das neurotoxinas TsTX-I e TsTX-V, bem como da TsV, sobre a captação de GABA, DA e L-Glu.

Os animais (ratos machos Sprague Dawley de 200-250 g) foram sacrificados por decapitação sem o uso de anestésicos. A seguir, foi feita uma incisão para retirada da pele da cabeça e outra incisão entre os forâmens oculares. O crânio foi aberto e o encéfalo exposto foi removido e colocado sobre uma placa de Petri gelada com papel umedecido em solução de sacarose 0,32 M. Rapidamente, o encéfalo foi dissecado, o córtex e o estriado cerebral foram separados e transferidos individualmente para béqueres contendo solução de sacarose 0,32 M. O volume de sacarose correspondeu a 10% (m/v) da solução. Os tecido cerebral foi homogeneizado a 900 r.p.m em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem LS-50 (haste em aço inox e pistão em Teflon®) por três séries de 3 vezes. Após este procedimento o material homogeneizado foi centrifugado a 1700 $\times g$ por 10 min a 4°C, em centrífuga Sorvall® RC-2B (Rotor SS-34).

Esta centrifugação produziu um precipitado (P1) composto de restos celulares, sangue e piócitos. O sobrenadante foi coletado e submetido à centrifugação a 21.000 $\times g$ por 20 min a 4°C. Esta centrifugação produziu um precipitado (P2) constituído de mitocôndrias, mielina e sinaptosomas. Este P2 foi, então, ressuspensionado em quantidade suficiente de solução gelada de sacarose 0,32 M e delicadamente homogeneizado a 900 r.p.m em homogeneizador Potter-Elvehjem e, a seguir, esta solução foi aplicada cuidadosamente sobre um gradiente de densidade descontínua de sacarose (10 mL) de 1,2 M - 0,8 M em tubos de celulose e submetido à ultracentrifugação a 60.000 $\times g$ por 60 min a 4°C em ultracentrífuga Beckman L-65-B (Rotor SW-27).

Três frações resultantes foram obtidas. A primeira fase (densidade de cerca de 0,32 à 0,8 M de sacarose), de cor branca-opalescente, constituída de mielina, foi aspirada e descartada. A segunda (densidade de cerca de 0,32 à 0,8 M de sacarose), de cor fracamente amarelada, era a fração constituída de sinaptosomas e a terceira, um precipitado denso, marrom, era constituída principalmente de mitocôndrias. Assim, a fração sinaptosomal foi coletada e transferida para

uma proveta previamente gelada e o volume medido. A solução sinaptosomal obtida foi diluída cuidadosamente com água ultrapura Milli-Q[®] gelada até uma concentração de 0,4 M.

Após esta diluição, os sinaptosomas foram submetidos à uma centrifugação de 24.400 xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi posteriormente descartado e o precipitado ressuspenso em volume apropriado de tampão Tyrode gelado (NaCl 136mM; KCl 5mM; KH₂PO₄ 2,5mM; MgSO₄ 1mM; Tris HCl 25mM; CaCl₂ 2mM; glicose 5mM, pH 7,4) e delicadamente homogeneizado.

O mesmo procedimento usada para obter SCCR foi empregado para obter SECR, embora com algumas diferenças. Após a primeira centrifugação à 1700 xg por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e submetido à uma segunda centrifugação de 21.000 xg por 20 min a 4°C. O precipitado resultante foi ressuspenso em tampão Tyrode gelado, composto de NaCl 136mM, ascorbato 1 mM, pargilina 50 µM, RO-41-0960 10 µM, KCl 5mM, KH₂PO₄ 2,5mM, MgSO₄ 1mM, Tris HCl 25mM, CaCl₂ 2mM, glicose 5mM, ajustado a pH 7,4. A adição de ácido ascórbico e pargilina (inibidor da enzima Monoamina Oxidase) ao tampão acima foi realizada a fim de se evitar a rápida oxidação e ou degradação da monoamina dopamina.

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinchonínico (BCA) (SMITH et al., 1985) empregando-se o kit da Pierce (*BCA protein assay*) adquirido comercialmente. A massa de proteína adicionada a cada poço de reação foi de aproximadamente 30-45 µg.

3.2.9 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE NEUROTRANSMISORES

Para a realização dos ensaios de captação de neurotransmissores, foram utilizados ³H-GABA, ³H-L-Glutamato (em SCCR) e ³H-Dopamina (em SECR), com atividades específicas de 36,20 Ci/mM, 22,50 Ci/mM e 60,00 Ci/mM, respectivamente, em uma concentração final de 100nM de cada componente radioativo, na ausência (controles) ou presença de diferentes concentrações de TsV, TsTX-V e TsTX-I, mostradas nos gráficos de cada experimento realizado, sendo conduzidos em temperatura ambiente, durante 20 minutos. A reação foi iniciada adicionando-se os sinaptosomas (100 µg/mL, concentração final) ao meio de incubação contendo os respectivos componentes radioativos. Como branco e para eliminar a interferência do *background* do GABA, L-Glu e DA, foram utilizados respectivamente o ácido nípecótico 60 mM (típico inibidor da recaptação de GABA), PCD 6,3 mM (inibidor da recaptação de glutamato) e GBR-12909 10 µM (dihidrocloreto de Vanoxerina, potente inibidor seletivo da recaptação de dopamina). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços e, ao final de 3

min de incubação com o material radioativo, cada poço foi aspirado e filtrado em Sistema de filtração/aspiração para placas com 96 poços *Brandel Systems XR-96-MS (PerkinElmer)*. A radioatividade foi contada em um Analisador de Cintilação *Wallac 1450 Microbeta/Trilux 1450-029 (PerkinElmer)* utilizando-se líquido de cintilação *OptiPhase Supermix (Wallac Perkin-Elmer)*.

Os dados foram transformados em velocidade de captação de ^3H -GABA, ^3H -L-Glu e ^3H -DA (CPM/min) em fmol/mg/min.

3.2.10 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE ^3H -GABA, ^3H -L-GLU³ e ^3H -DA NA AUSÊNCIA DE Ca^{+2} OU PRESENÇA DE TTX

Os sinaptosomas foram preparados da mesma forma como descrita no item 3.2.8 e 3.2.9. O tampão Tyrode utilizado foi preparado sem cálcio, sendo este substituído por 7,6 mM Sr^{+2} e EGTA 1 mM.

Após a incubação por 20 min à temperatura ambiente, o ensaio foi realizado como descrito no item anterior (3.2.9).

Os sinaptosomas estriatais foram incubados com 1 μM de TTX (bloqueador de canais de Na_v) por 30 min na presença de diferentes concentrações molares de TsTX-V como descrito para os ensaios de captação de ^3H -DA.

3.2.11 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE ^3H -GABA EM CÉLULAS COS-7

3.2.11.1 PREPARO DAS CÉLULAS COS-7

Células COS-7 são células imortalizadas originadas de rim de macaco verde africano, muito utilizadas para expressar uma série de transportadores e canais. Essas células foram usadas para expressar os transportadores de GABA GAT-1 e GAT-3

As células COS-7 foram mantidas em DMEM em frascos de cultura Corning® através de transferências feitas a cada três dias, utilizando-se o protocolo de transferência e lavadas com tampão PBS suficiente para cobrir todo o fundo do frasco.

O tampão foi aspirado e 1 mL de tripsina a 0,05% m/v foi adicionado ao meio seguindo-se de incubação de 5 min a 37°C para que as células se desprendessem do frasco. Após este procedimento, 12 mL de DMEM suplementado com SFB 10 % , 100 U/mL de penicilina G sódica e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina foram adicionados às células e 2 mL de suspensão foram

transferidos para um novo frasco mantido a 37°C sob atmosfera de 5% (v/v) de CO₂ e 95 % (v/v) ar, por mais três dias antes da próxima transferência.

No dia da transferência, as células foram transferidas para uma placa de 24 poços e no dia seguinte fez-se a transfixação das células com DNA dos transportadores gabaérgicos utilizando-se o Protocolo de Transferência *FuGENE 6™* (*FuGENE 6 Transfection Reagent, Roche*)

Os DNAs dos transportadores GAT-1 e GAT-3, originários de clonagem prévia, foram diluídos para 10 ng/μL e adicionados à células de *E. coli* DH5α. O antibiótico canamicina foi usado no meio de cultura bacteriana pra expressão de transportadores de GABA. Para extração do DNA expressado, foi empregado o kit *Maxiprep protocol (DNA Plasmid Max Kit)*.

3.2.11.2 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE ³H-GABA

Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços sendo que, dois dias antes do experimento, as células foram transfectadas com o DNA dos transportadores de GABA, GAT-1 ou GAT-3, utilizando-se vetor Citomegalovirus (CMV). O experimento foi realizado adicionando-se ³H-GABA ao meio contendo as células e os valores de captação de ³H-GABA foram medidos através de contador β. As células que receberam tratamento foram pré-incubadas por 20 min com TsTX-V nas concentrações de 0,046, 0,23 e 2,77 μM e em seguida foi adicionado o radioativo a uma concentração de 1 μM. Após 10 min de incubação, a reação foi interrompida, lavando-se as células 2 ou 3 vezes com PBS gelado e, em seguida, as células foram lisadas com 450 μL de uma solução de SDS a 0,1% em NaOH a 0,1 N. As placas foram colocadas em agitador por 20 min para que todas as células se desprendessem e 400 μL foram transferidos a um frasco próprio contendo 4,5 mL de líquido de cintilação. Os frascos foram contados em cintilador β e as contagens foram realizadas durante 1 minuto por frasco.

3.2.12 MONITORAMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE GLIOMA C6

3.2.12.1 PREPARO DAS CÉLULAS DE GLIOMA C6

As células glioma C6 são células indiferenciadas, originadas de tumor renal e constituem um sistema manipulável de células que expressam os componentes de uma célula neuronal. Originalmente clonadas de glioma de rato (BENDA e FAIVRE-BAUMAN, 1974),

estas células foram inicialmente cultivadas para formar uma única camada em placas de 24 poços, suplementadas com DMEM acrescido de 10% de SFB, penicilina (100U/mL) estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas à 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% (v/v) e ar (95%, v/v). Os experimentos foram realizados após as células terem atingido 80% da confluência.

Após o cultivo inicial em placas de 24 poços, as células de glioma C6 foram transferidas para lâminulas de vidro dentro de placas de seis poços e mantidas em meio DMEM na ausência de soro SFB, mas com as mesmas condições anteriores e utilizadas após dois dias da transferência. No experimento, a toxina estudada (TsTX-V) foi adicionada ao meio de cultura e as células mantidas a temperatura ambiente.

3.2.12.2 MONITORAMENTO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

No sentido de se avaliar as alterações induzidas pela TsTX-V sobre o potencial de membrana, foi utilizado o corante fluorescente sensível ao potencial de membrana DIBAC₄(3) (bis[ácido-(5)1,3-dibutilbarbiturico] trimethin-eoxolnol), exibindo absorbância de 493 nm e emissão de 516 nm. DIBAC₄(3) é um ânion lipofílico com alta permeabilidade em membranas celulares (RINK et al., 1980) que se torna fluorescente quando ligado a proteínas ou a membrana celular (BRAUNER et al., 1984; HE e CURRY, 1995; TAKENAKA et al., 1996; DALL'ASTA et al., 1997). A hiperpolarização reduz a fluorescência das células expostas ao DIBAC₄(3) através da mudança da concentração intracelular do ânion fluorescente e a despolarização aumenta a fluorescência através do aumento de permeabilidade da membrana celular, aumentando a concentração da sonda fluorescente dentro da célula (ZHANG et al, 2001).

As lâminulas contendo as células de Glioma C6 foram carregadas com DIBAC₄(3) e colocadas em um dispositivo apropriado de encaixe para poderem ser observadas, e a seguir, foi adicionada a TsTX-V (2,77 µM). As imagens foram captadas por microscópio confocal de varredura a laser de criptônio-argônio *Bio-Rad MRC-1000 - Bio-Rad* e microscópio invertido *Nikon Diaphot 200* equipado com lentes de 40X *Nikon PahnApo - Nikon Corporation*. A projeção das imagens foi analisada pelo software *Bio-Rad Laser Sharp 1024®*. Todos os controles foram submetidos a parâmetros idênticos aos testes para minimizar interferências visuais e habilitar comparações visuais diretas do corante fluorescente (ELIASOF et al, 1998).

3.2.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{+2} EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE AORTA DE RATOS.

3.2.13.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

O isolamento de células de músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Wistar normotensos (250-300 g) foi realizado segundo método descrito por Furspan e Webb (1990), com pequenas modificações. Os animais foram sacrificados por decapitação e um segmento de aorta torácica (15 mm) foi rapidamente isolado e mantido em solução fisiológica de Hank, com a seguinte composição: NaCl 140 mM, KCl 5,4 mM, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,44 mM, NaH_2PO_4 0,42 mM, CaCl_2 0,1 mM, NaHCO_3 4,17 mM, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 5,5 mM, EDTA 0,03 mM, HEPES 5,0 mM, ajustado para pH 7,4. A remoção de gorduras, tecido conjuntivo e camadas adventícia e endotelial foram realizados mecanicamente com material cirúrgico estéril e lupa cirúrgica. A camada muscular resultante recebeu pequenos cortes transversais para favorecer a ação enzimática no tecido durante o processo de digestão.

Para cada segmento da artéria, a solução enzimática utilizada foi composta por 5 mL de solução de Hank contendo 50 mg de albumina de soro bovino (BSA tipo V), 0,5 mg de inibidor de tripsina (tipo I-S), taurina 5 mM, ditioneitol 0,1 mM, 3 mg de collagenase (tipo I) e 3 mg de papaína. A digestão enzimática foi realizada sob agitação constante a 37°C e os tempos de incubação com solução enzimática foram padronizados em 50 min para digestão celular.

Após a digestão enzimática, os fragmentos digeridos de artéria foram removidos da solução enzimática e mantidos em solução de Hank sem íons Ca^{+2} , mas contendo BSA, inibidor de tripsina e taurina e lavados com a mesma solução de Hank por 4 vezes por centrifugação a 2.000 r.p.m por 2 minutos e pela substituição da solução desta a cada 15 min. A seguir, a dispersão das células MLV foi realizada delicadamente por repetidas aspirações em pipeta de vidro tipo Pasteur de ponta esmerilhada. Todos os procedimentos foram realizados em ausência de Ca^{+2} para minimizar o encurtamento das células durante a manipulação. A viabilidade das células em suspensão foi testada com Azul de Tripam, preparado em solução salina (5 mg/mL) em câmara de Neubauer. Para o cultivo, foram utilizadas suspensões de células com viabilidade acima de 90 %.

3.2.13.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE MLV

A suspensão de células foi centrifugada durante 2 minutos a 1.000 rpm. As células foram ressuspensas em 600 µL de DMEM estéril, suplementado com SFB 10 %, glutamina

2 mM e solução antibiótica (Penicilina G sódica 10000 U/mL e Estreptomicina 10 mg na concentração final de 1%). As células foram cultivadas em lamínulas de vidro de 32 mm de diâmetro e acondicionadas em placas de 6 poços. No centro de cada lamínula foram semeados 200 μ L da suspensão de células e a seguir, mantidas em estufa à 37 °C, com atmosfera de CO₂ 5% (v/v) e 95 % de O₂ (v/v) por 12 horas, para sedimentação e adesão das células. Após esse período, foram acrescentados mais 2 mL de DMEM (às células de MLV aderidas). O carregamento das células de MLV com a sonda fluorescente Fura-2/AM foi realizado logo após esse período de repouso.

3.2.13.3 CARREGAMENTO DAS CÉLULAS DE MLV COM A SONDA FURA-2/AM

As medidas da concentração de Ca⁺² intracelular foram realizadas através da utilização do indicador fluorescente de Ca⁺², Fura-2, na forma acetoximetil éster (Fura-2/AM). Fura-2/AM é um derivado do Fura-2, que possui 5 grupos acetoximetil éster ligados aos grupos COO⁻ da molécula de Fura-2, por ligações éster. Esta molécula é bastante hidrofóbica e assim ela entra facilmente dentro das células, através da membrana plasmática. Uma vez dentro das células, esterases citoplasmáticas clivam os grupamentos acetoximetil da molécula de Fura-2, resultando em um componente que é altamente carregado e que não pode cruzar a membrana celular, e assim fica retida no citoplasma, se ligando com uma alta e específica afinidade a íons Ca⁺², constituindo assim uma das melhores sondas fluorescentes para medir a [Ca⁺²]_C. (ROE et al., 1990; GRYNKIEWICZ et al. 1985)

A solução estoque de Fura-2/AM (Sigma®) 10 mM (dissolvida em Dimetilsufóxido) foi diluída (1 μ L) em 25 μ L de BSA (fração livre de ácidos graxos) 25% (m/v) em água Milli-Q® e sonificado por 1 minuto. A seguir, a solução contendo Fura-2/AM recebeu solução de Hank contendo uma concentração suficiente de Ca²⁺ 1,6 mM e BSA (Fração V) 0,1% (m/v) em quantidade suficiente para 1 mL, resultando em uma concentração final de Fura-2/AM 5 μ M, e sonificada por mais 4 minutos. Este procedimento favorece a incorporação da sonda quando em contato com a membrana citoplasmática das células de MLV.

As células aderidas em lamínulas foram então incubadas com 1 mL de solução de Fura-2/AM (5 μ M) em estufa à 37°C com atmosfera de CO₂ 5% (v/v) e 95 % de O₂ (v/v), durante 40 minutos, sob proteção da luz, para o carregamento das células com a sonda fluorescente.

Após o período de carregamento, a lamínula foi montada em câmara aquecida a 37°C e as células foram imersas com solução de Hank.

A câmara contendo as células estava acoplada a um Microscópio para fluorescência de luz invertida *Nikon Diaphot D104B* (Nikon Corporation), equipado para epifluorescência e

focalizadas com objetiva de fluorescência de imersão a óleo com aumento de 40 vezes *Nikon PahnApo*. As células foram lavadas durante cerca de 20 minutos por meio de perfusão contínua com solução de Hank no fluxo de 2 mL/min, para eliminação total do Fura-2/AM não incorporado, bem como para total desesterificação pelas esterases citoplasmáticas. Foram utilizadas células que apresentaram intensidade de fluorescência acima de 4×10^6 contagens/seg.

3.2.13.4 MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO CITOPASMÁTICO ($[Ca^{+2}]_c$)

As células foram excitadas com luz proveniente de lâmpada de xenônio (75 Watts) através de filtros *X-1016T* para o Fura-2 em comprimentos de ondas alternados de 340 e 380 nm, por um conjunto de filtros, integrantes do Sistema para Medida de Íons Intracelulares *Delta Ran* mod. *RM-F* (*Photon Techonolgy International*) controlado por computador IBM-PC Pentium™ 900 MHz.

A fluorescência emitida das células foi detectada por uma foto-multiplicadora após a passagem por um espelho dicróico para comprimento de onda de 510 nm. Os sinais de emissão foram captados e processados pelo computador e software Felix® (*Photon Techonolgy International*). A razão entre a fluorescência nos comprimentos de onda de 340 e 380 nm foi utilizada para calcular a concentração citoplasmática de Ca^{+2} de acordo com a equação descrita por Grynkiewicz et al. (1985):

$$[Ca^{+2}] = K_d \times (F - F_{\min} / F_{\max} - F) \times (Sf_2 / Sb_2)$$

Onde:

K_d : constante de dissociação in vitro do Fura-2/AM;

F : razão de fluorescência obtida em 340 nm e 380 nm ;

$F_{\max}$: razão da intensidade de fluorescência em presença de condições saturantes de Ca^{+2} que ocorre com o tratamento com ionomicina (ionóforo de Ca^{+2})

$F_{\min}$: representa a razão de fluorescência em concentração mínima de Ca^{+2} , que ocorre com a adição de EGTA;

Sf_2 / Sb_2 : razão entre os sinais em 380 nm nas soluções contendo ionomicina e EGTA.

As concentrações máxima e mínima de Ca^{+2} foram previamente estabelecidas pelo tratamento das células com Krebs contendo Ca^{+2} 1,6 mM e ionomicina e Krebs zero- Ca^{+2} e EGTA 2 mM, respectivamente.

O K_d para o Fura-2 foi previamente calculado em condições experimentais. Os resultados serão apresentados e analisados pelas razões de fluorescência e pela concentração estimada de $[Ca^{+2}]_c$ obtida pela fórmula acima.

3.2.13.5 PROTOCOLOS ESPECÍFICOS PARA MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$

A) MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO BASAL DE Ca^{+2} CITOPLASMÁTICO

As células MLV de aorta de ratos foram perfundidas com solução de Hank (pH 7,4; 37°C) e a concentração basal de Ca^{+2} foi medida antes de qualquer estímulo.

B) MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$ EM PRESENÇA DE KCl 60 mM

Após a determinação da $[Ca^{+2}]_c$ basal, as células foram perfundidas com solução de Hank, contendo KCl 60mM e determinada a $[Ca^{+2}]_c$. O KCl nesta concentração (60mM) promove intensa despolarização e foi usado como parâmetro para comparação com os efeitos despolarizantes da TsV e neurotoxinas.

C) MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$ EM PRESENÇA DA TsV

Após a determinação da $[Ca^{+2}]_c$ basal, as células foram perfundidas com TsV nas concentrações previamente estabelecidas de 100 e 500 µg/mL, dissolvida em solução de Hank. Para a preparação da TsV usada nestes experimentos, a peçonha liofilizada foi suspendida em solução de Hank, e centrifugada a 11.270 xg por 5 minutos. A seguir foi determinada a absorvância do sobrenadante em comprimento de onda de 280 nm e calculada a concentração da TsV de acordo com o valor do ϵ , obtido através da dosagem de proteínas totais (item 3.2.2).

D) MEDIDA DA $[Ca^{+2}]_c$ EM PRESENÇA DAS NEUROTOXINAS TstX-V E TstX-I

Após a determinação da $[Ca^{+2}]_c$ basal, as células foram perfundidas com ambas neurotoxinas nas concentrações previamente estabelecidas de 50 e 100 µg/mL. As neurotoxinas foram dissolvidas em solução de Hank e centrifugadas a 11.270 xg por 5 minutos. A seguir foram determinadas as absorvâncias dos sobrenadantes em comprimento de onda de 280 nm e calculada a concentração de cada solução contendo a respectiva neurotoxina, de acordo com o valor do ϵ , obtido através da dosagem de proteínas totais (item 3.2.2).

3.2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os experimentos *in vivo*, envolvendo determinação de catecolaminas plasmáticas e pressão arterial, os grupos tratados (peçonha e toxinas, nas 2 doses administradas) foram comparados entre si e frente aos controles pela metodologia paramétrica de comparação múltipla entre grupos, através da determinação das significâncias entre as diferentes médias de tratamentos, utilizando a Análise de Variância a um critério (ANOVA *one way*) seguido pelo *pós-hoc* teste de *Tukey-Kramer* com níveis de significância em $p < 0,01$ e $p < 0,05$, empregando-se o software *GraphPad InStat*™ v2.02.

Os experimentos de captação de neurotransmissores em SCCR, SECR e em células COS-7 foram feitos em triplicatas e repetidos por, no mínimo, 3 vezes. Os resultados estão apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores obtidos com o número indicado de animais. O Teste *t* de Student foi usado para calcular a significância estatística frente aos controles, e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para as determinações estatísticas desses experimentos, foi usado o software *Graph Pad Prism*® v.3.00.

Os experimentos de determinação da concentração de Ca^{+2} intracelular em células de músculo liso de aorta de ratos foram realizados em triplicatas e os resultados estão apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores obtidos com o número indicado de animais (cada experimento foi empregado a aorta de 1 único animal). As comparações foram feitas com as toxinas e o TsV entre si ou comparadas frente ao estímulo despolarizante (KCl 60 mM). O Teste *t* de Student foi usado para calcular a significância estatística e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para as determinações estatísticas desses experimentos, foi usado o software *Graph Pad Prism*® v.3.00.

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO DA TSV E DAS TOXINAS TSTX-I E TSTX-V

O coeficiente de extinção obtido para este lote de peçonha foi de 1,75 ou seja, uma solução contendo 1 mg de proteína solúvel por mL de solução apresentou absorvância de 1,75 em 280 nm, enquanto que do da TsTX-I foi de 4,2 e o da TsTX-V foi de 2,85.

Estes valores são importantes para a determinação exata da quantidade de peçonha e toxinas a serem usadas nos experimentos subsequentes.

4.2 ENSAIO DE LETALIDADE

A dose letal 50 % (DL₅₀) por via i.p. da peçonha solúvel do escorpião *T. serrulatus* (e seus respectivos limites fiduciais) em camundongos foi de **661,38** (466,54 a 937,59) µg/kg.

4.3 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DE *T. serrulatus*

A peçonha solúvel de *Tityus serrulatus* foi cromatografada em coluna de CMC-52, como descrito no item 3.2.4.1, forneceu 13 frações, denominadas: I-XIII (FIGURA 2). A percentagem de recuperação para esta cromatografia foi de 95,36% (TABELA II), em termos de A_{280 nm}.

TABELA II - Recuperação das frações obtidas da cromatografia da peçonha de *T. serrulatus*

FRAÇÕES OBTIDAS	% DO ELUÍDO *
I	22,90
II	6,25
III	0,63
IV	1,20
V	3,90
VI	1,20
VII	3,15
VIII	17,68
IX	6,40
X	3,68
XI	3,20
XII	3,22
XIII	11,25
Tubos Laterais	10,7
Recuperação Total	95,36

* A recuperação foi calculada pela absorvância em $\lambda = 280\text{nm}$.

FIGURA 3 - Cromatografia de troca catiônica em carboximetil-celulose-52 do extrato obtido de 400 mg da peçonha solúvel de *T. serrulatus* em coluna de 2,4 x 63,0 cm, equilibrada com tampão AMBIC (NH_4HCO_3) 0,01M, pH 7,8. Fluxo de 26,7mL/hora, com volume coletado por tubo de 3,0 mL, em temperatura de 4°C. A amostra foi inicialmente eluída com 468 mL de AMBIC 0,01M, pH 7,8 iniciando-se a seguir um gradiente convexo de concentração do mesmo tampão de 0,01 a 1,0 M.

4.4 CLAE DAS FRAÇÕES XI E XIII DA PEÇONHA DE *T. serrulatus*

Através da análise cromatográfica em coluna analítica de fase reversa C-18, foi possível 3 principais componentes da fração XI, denominados **XI-1**, **XI-2** e **XI-3** (**FIGURA 4**). Os picos de absorvância estão bem separados, e o mesmo perfil foi obtido em outros cromatogramas, com as respectivas frações, evidenciando que o método possui ótima resolução e reprodutibilidade. A fração XI, o componente **XI-3** correspondeu à **TsTX-V** (α -toxina), que por sua vez representou cerca de 62,95 % desta fração (**TABELA III**) e aproximadamente 2,02 % da peçonha solúvel. Já para a fração **XIII**, correspondente à **TsTX-I** (β -toxina) foi obtido pico simétrico único, evidenciando sua pureza já na primeira cromatografia. O perfil cromatográfico obtido com a **TsTX-I** serviu também como critério de pureza desta toxina (**FIGURA 5 E TABELA IV**).

FIGURA 4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de 2,3 mg da fração XI da TsV em coluna analítica de fase reversa C-18 (0,46 x 25 cm, partículas de 5 μ m), previamente equilibrada com TFA 0,1 % (v/v), fluxo de 1mL/min. A amostra foi eluída com gradiente de concentração linear de AcN (0-100%) em 0,1 % (v/v) de TFA (Tampão A: TFA 0,1% + AcN 5% e Tampão B: TFA 0,1 % + AcN 60 %).

TABELA III - Recuperação das subfrações obtidas a partir da CLAE da fração XI da TsV, como mostrado na **FIGURA 4**.*

SUBFRAÇÕES OBTIDAS	RECUPERAÇÃO (%)	TEMPO DE RETENÇÃO (Min)
XI-1	10,573	19,6
XI-2	5,619	25,7
XI-3 (TsTX-V)	62,949	29,1
SUBFRAÇÕES SECUNDÁRIAS	20,859	-
RECUPERAÇÃO TOTAL	100	-

* A FIGURA 4 e a TABELA IV são valores representativos de uma cromatografia

FIGURA 5 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de 2,5 mg da fração XIII em coluna analítica de fase reversa C-18 (0,46 x 25 cm, partículas de 5 μ m), previamente equilibrada com TFA 0,1 % (v/v), fluxo de 1mL/min. A amostra foi eluída com gradiente de concentração linear de AcN (0-100%) em 0,1 % (v/v) de TFA (Tampão A: TFA 0,1% + AcN 5% e Tampão B: TFA 0,1 % + AcN 80 %).

TABELA IV – Recuperação das subfrações obtidas a partir da CLAE da fração XIII da TsV como mostrado na **FIGURA 5**.*

SUBFRAÇÕES OBTIDAS	RECUPERAÇÃO (%)	TEMPO DE RETENÇÃO (Min)
XIII (TsTX-I)	100	25,558

* A FIGURA 5 e a TABELA IV são valores representativos de uma cromatografia

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) SEM AGENTES DESNATURANTES PARA PROTEÍNAS BÁSICAS

A **Figura 6** mostra o resultado obtido da eletroforese das frações originadas da cromatografia da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. A fração XIII (TsTX-I) apresentou banda eletroforética única, indicando sua pureza já na primeira cromatografia, conforme padronizado por Arantes et al. (1989).

FIGURA 6 - PAGE sem agentes desnaturantes das 13 frações obtidas da cromatografia da TsV

1. Fração I	6. Fração VI	11. Fração XI
2. Fração II	7. Fração VII	12. Fração XII
3. Fração III	8. Fração VIII	13. Fração XIII (TsTX-I)
4. Fração IV	9. Fração IX	14. Fucsina básica
5. Fração V	10. Fração X	

Gel de poliacrilamida a 10%, tampão β -alanina/ácido acético 0,035 M, pH 4,5. Pré-corrida de 1 hora a 80 V e de 8 a 6 mA. Corrida de 2h a 80V e de 5,8 a 3,8 mA. Corado por 3h com Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,2% em água:metanol, 1:1, v/v), e descorado com ácido acético a 7% (v/v).

A **FIGURA 7** mostra, o resultado obtido da eletroforese dos principais componentes originados da CLAE em coluna analítica de fase reversa C-18 da fração XI da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. A α -neurotoxina TsTX-V (XI-3) apresentou banda eletroforética única e característica, indicativo de sua pureza.

FIGURA 7 - PAGE sem agentes desnaturantes dos componentes da Fração XI obtida da cromatografia da TsV

1. Fucsina básica	6. Fração XI-2
2. Peçonha solúvel (5 μ L)	7. Fração XI-3 (TsTX-V)
3. Peçonha solúvel (10 μ L)	8. vazio
4. Fração XI	
5. Fração XI-1	

Gel de poliacrilamida a 10%, tampão β -alanina/ácido acético 0,035 M, pH 4,5. Pré-corrida de 30 minutos a 100 V e de 30 a 20 mA. Corrida de 1h e 20 min a 100 V e de 20 a 15 mA. Corado por 4h com coomassie brilliant blue G-250 (0,2% em água:metanol, 1:1, v/v), e descorado com ácido acético a 7% (v/v).

4.6 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) EM RATOS INJETADOS COM AS TOXINAS DA TSV

A **FIGURA 8** mostra o registro representativo da pressão arterial média (PAM) em rato injetado com dose única de peçonha (250 µg/kg). A dose levou a uma intensa hipertensão seguida por grande instabilidade da PAM, subsequente queda da mesma e morte do animal em menos de 20 minutos após administração da TsV.

Baseado em experimentos prévios, foram estabelecidas doses de 100 e 50 µg/kg para a TsV e 30 e 15 µg/kg de cada toxina TsTX-I e TsTX-V

Tendo em vista os resultados obtidos com a determinação da PAM, verifica-se efeito pressor máximo em 2,0-3,5 minutos após administração das toxinas ou da peçonha, para ambas as doses (**FIGURA 10**). Observa-se também uma grande instabilidade e intensas oscilações no perfil temporal da PAM (indicativo de vasoespasmos), com efeitos mais intensos para a TsV e a TsTX-I, nas doses utilizadas (**FIGURA 11**).

FIGURA 8 - Registro contínuo representativo da pressão arterial de rato injetado com TsV (250 µg/kg) monitorado em tempo real, obtido diretamente da aorta abdominal via cateter femoral conectado a um transdutor de pressão arterial e unidade de pré-amplificação e registro.
A seta representa o momento da administração da peçonha.

FIGURA 9 - Registro contínuo representativo da PAM em ratos injetados com : **A)** TsV (100 µg/kg); **B)** TsTX-I (30 µg/kg); **C)** TsTX-V (30 µg/kg), monitorados em tempo real e obtidos diretamente da aorta abdominal via cateter femoral conectado a um transdutor de pressão arterial e unidade de pré-amplificação e registro. As setas representam o momento da administração da peçonha ou toxinas.

A peçonha (100 µg/kg) induziu intenso e duradouro aumento na PAM, semelhante ao observado para a TsTX-I (30 µg/kg). Não houve grande diferença entre o efeito hipertensor causado pela peçonha e TsTX-I para ambas as doses. O efeito hipertensor para a TsV e a TsTX-I se estendeu até 90 minutos após administração das mesmas. Já a TsTX-V induziu efeito hipertensor menor em relação à TsV e a TsTX-I ($p<0,01$) em todos os tempos e verificou-se tal efeito somente nos primeiros 25 minutos após administração da mesma. Após 90 minutos, na dose de 30 µg/kg, a TsTX-V induziu efeito hipotensor significativo ($p<0,05$).

Nos animais tratados com a TsV, verificou-se intenso lacrimejamento com estrias de sangue e hipersalivação, após 20-30 minutos, acompanhado por dificuldade respiratória (25-40 minutos), com sintomas mais intensos nas doses maiores. Já para a TsTX-I, estes sintomas foram, de maneira geral, mais intensos e apareceram em 5-10 minutos com dificuldade respiratória observada em 15-20 minutos. Para a TsTX-V verificou-se os sintomas acima citados, em intensidade bem menor. Apesar dos poucos efeitos sobre a PAM, esta produz, por outro lado, uma intensa e dramática agitação no animal, provocando algumas vezes convulsões, desconforto, irritação, comportamento agressivo e de fuga e intensa coceira, sintomas os quais perduraram por até 35 minutos após a administração da toxina.

FIGURA 10 - PAM de ratos conscientes e não imobilizados, injetados i.v. com: **A)** TsV (50 e 100 µg/kg); **B)** TsTX-I (15 e 30 µg/kg) e **C)** TsTX-V (15 e 30 µg/kg). Valores representam a média e o EPM (5-10 animais) em cada tempo. Todos os valores são significativamente diferentes comparados ao controle ($p < 0,01$) exceto antes do tempo 0 ou quando indicados abaixo:

NS não significativo

** $p < 0,05$ toxinas vs controles

O tempo 0 representa o momento da administração da TsV, toxinas ou salina.

FIGURA 11 - Gráfico da média da diferença na PAM entre os animais tratados com TsV ou toxinas e o controle, para cada tempo estabelecido (2,5, 30 e 90 min) após respectivos tratamentos

Os efeitos da peçonha e de cada toxina foram comparados dose a dose

* $p < 0,01$ em relação à TsV

** $p < 0,05$ em relação à TsV

♦ $p < 0,01$ em relação à TsTX-I

♦♦ $p < 0,01$ em relação à TsTX-I

4.7 ANÁLISE DE CATECOLAMINAS EM PLASMA DE RATOS

O sistema exibiu excelente resolução na separação da mistura de catecolaminas, e os picos de eluição ficaram bem separados, definidos e característicos. Na mistura de catecolaminas extraída, o primeiro pico a ser eluído foi o da noradrenalina, seguido da adrenalina, normetanefrina, metanefrina, dopamina e 3-metoxitiramina (**FIGURA 12**)

FIGURA 12- Perfil cromatográfico representativo da sequência de eluição de uma solução de catecolaminas:

1. Noradrenalina	4. Metanefrina
2. Adrenalina	5. Dopamina
3. Normetanefrina	6. 3-Metoxitiramina

A cromatografia foi feita em coluna de fase reversa C-18 com partículas de 5 μm , 124 x 3 mm, fase móvel: tampão acetato de sódio (3,007g/L) + EDTA (0,124g/L) + SDS (0,0333g/L) + metanol 20 %, pH 5,1 com fluxo de 0,7 mL/min e detector eletroquímico com eletrodo Ag/AgCl, operando a + 0,65 V

Na metodologia empregada, foi possível detectar apenas duas das catecolaminas: noradrenalina e adrenalina, na análise cromatográfica do plasma de ratos (tanto em animais controle quanto em injetados com a TsV ou toxinas).

Tendo em vista a extração de possíveis interferentes de natureza endógena, além das catecolaminas propriamente ditas, do plasma destes animais, foram realizados testes preliminares onde amostras de plasmas foram extraídas e submetidas à análise cromatográfica, com tempo de corrida de 60 minutos, onde foi detectado somente a presença de um pico de natureza desconhecida, com tempo de retenção (tR) de aproximadamente 36 minutos (**FIGURA 13**), não coincidindo com os tempos de retenção dos padrões de catecolaminas, como mostrado na **FIGURA 12**. Portanto, os plasmas de ratos não apresentaram componentes endógenos que pudessem ser extraídos e eluídos, interferindo assim na análise cromatográfica. Os picos mostraram-se simétricos, característicos, e os tempos de retenção bastante reprodutíveis, mantidas as mesmas condições cromatográficas.

FIGURA 13 - Cromatograma representativo da eluição dos picos de catecolaminas (NA e ADR) extraídas de plasma de ratos tratados: **A)** salina 0,9% i.v (1000 μ L plasma) e **B)** TsV (100 μ g/kg, i.v) (500 μ L plasma), coletados 2,5 minutos após cada tratamento.

A cromatografia foi realizada em coluna de fase reversa C-18 com partículas de 5 μ m, 124 x 3 mm, fase móvel: tampão acetato de sódio (3,007g/L) + EDTA (0,124g/L) + SDS (0,0333g/L) + metanol 20 % e pH 5,1 com fluxo de 0,7 mL/min e detector eletroquímico com eletrodo Ag/AgCl, operando a + 0,65 V.

Com vistas às baixas concentrações plasmáticas de catecolaminas em animais controles, alguns parâmetros cromatográficos analíticos específicos, como curvas de calibração e linearidade, bem como limites de quantificação ficaram abaixo daqueles descritos por Marques et al (2002). Por esse motivo, alguns desses parâmetros analíticos foram re-validados. Os resultados das curvas de calibração e linearidade, com inclusão do limite de quantificação para determinação dos níveis de catecolaminas plasmáticas em animais controles (e estendendo-se aos animais tratados com TsTX-V), bem como os valores dos coeficientes de correlação r^2 e a equação das retas para ambas catecolaminas, são mostrados na **FIGURA 14**. A **FIGURA 15** apresenta a curva de calibração e linearidade, bem como os valores do coeficiente de correlação r^2 e a equação das retas de ambas catecolaminas, para a determinação de catecolaminas plasmáticas em animais tratados com a TsV ou com TsTX-I. No primeiro caso, foram extraídos amostras de 50 μ L/mL de cada padrão (pois foram empregadas quantidades de 500 a 1000 μ L de plasma) e no segundo caso, 25 μ L, pois foram empregadas quantidades de até 500 μ L de plasma.

As **TABELAS V** e **VI** mostram os valores de precisão e exatidão dos limites de quantificação para a determinação de noradrenalina e adrenalina plasmáticas em animais controles e tratados com TsTX-V e para animais tratados com a TsV e TsTX-I, respectivamente. A **TABELA VII** mostra os resultados obtidos na avaliação da recuperação média referente ao processo de extração de catecolaminas em plasma de ratos.

Com relação à curva de calibração e linearidade, ambas exibiram coeficiente de correlação r^2 acima de 0,98, indicando ótima correlação entre as diferentes concentrações dos padrões e a resposta do detector (altura dos picos), tanto para a curva destinada aos controles quanto para a curva destinada aos animais tratados, mesmo com o limite de quantificação incluso. Este foi determinado como 0,75 pM/mL para NA e 0,5 pM/mL para ADR (controles, empregando-se 50 μ L de cada padrão, realizado em quintuplicata) e 2,0 e 1,0 pM/mL para Na e ADR, respectivamente, para os animais injetados com a TsV ou TsTX-I (empregando-se 25 μ L de cada padrão, realizado em triplicata). O limite de quantificação representa a menor concentração detectada pelo equipamento dentro do limite de confiabilidade, onde a precisão e a exatidão estão abaixo de 20%, de acordo com o preconizado pelo Center for Drug Evaluation and Research (1998). O método também exibiu boa recuperação, mesmo para baixas as concentrações, com uma média de 70 % de recuperação para NA e 76 % de recuperação para ADR.

FIGURA 14 - Curva de calibração (A) e linearidade (B) para determinação de catecolaminas plasmáticas (NA e ADR), com a inclusão da concentração no limite de quantificação (0,75 pM/mL para NA e 0,5 pM/mL para ADR), empregando-se 50 μ L para cada concentração. Cada ponto representa a média de 3 padrões em triplicata e a menor concentração de cada catecolamina (limite de quantificação), a média de 5 padrões em quintuplicata.

FIGURA 15 - Curva de calibração (A) e linearidade (B) para determinação de catecolaminas plasmáticas (NA e ADR), com a inclusão da concentração no limite de quantificação (2 pM/mL para NA e 1 pM/mL para ADR), empregando-se 25 μ L para cada concentração. Cada ponto representa a média de 3 padrões em triplicata .

TABELA V - Valores de precisão e exatidão do limite de quantificação da NA e ADR.
(usados como referência para determinação de catecolaminas plasmáticas nos controles e animais injetados com TsTX-V).

CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES * (pM/mL)	VALOR OBTIDO (pM/mL)	PRECISÃO (CV, %)	EXATIDÃO (% DE ERRO)
NORADRENALINA			
0,75	0,68	15,5	9,3
ADRENALINA			
0,5	0,43	11,8	12,8

* Foram empregados 50 µL de cada padrão

CV = coeficiente de variação; n=5

TABELA VI – Valores de precisão e exatidão do limite de quantificação da NA e ADR.
(usados como referência para determinação de catecolaminas plasmáticas em animais injetados com TsV e TsTX-I).

CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES * (pM/mL)	VALOR OBTIDO (pM/mL)	PRECISÃO (CV, %)	EXATIDÃO (% DE ERRO)
NORADRENALINA			
2	1,8	12,5	10,0
ADRENALINA			
1	0,87	14,9	13,5

* Foram empregados 50 µL de cada padrão

CV = coeficiente de variação; n=5

TABELA VII – Resultados obtidos na avaliação da recuperação média referente ao método de determinação de catecolaminas plasmáticas

CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES EXTRAÍDOS (pM/mL)	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)
Noradrenalina	
1,0*	72,50
2,0	68,80
5,0	70,10
10,0	73,75
20,0	71,50
ADRENALINA	
0,5*	82,00
1,0	73,25
2,0	72,50
5,0	76,50
10,0	78,00

* Empregados 50 µL do padrão

A **FIGURA16** mostra os níveis plasmáticos de NA (A) e ADR (B) em animais controles (injetados com salina 0,9 % i.v.) e em animais injetados com TsV (100 e 50 µg/kg) ou toxinas TsTX-I e TsTX-V (30 e 15 µg/kg de cada) em 4 tempos, no mesmo animal (6-10 animais por tratamento): 10 minutos antes e 2,5, 30 e 90 minutos após os tratamentos. Não houve diferença significativa nos diferentes tempos, em animais tratados com salina (controle). Entretanto, TsV e toxinas induziram significativo aumento nos níveis de ambas as catecolaminas (com o máximo em 2,5 minutos, caindo gradualmente ao longo do tempo), e este aumento permaneceu significativo ao longo de todos os tempos analisados. O aumento mais significativo se deu com a TsV na dose de 100 µg/kg (cerca de 12-22 vezes). TsTX-I, na dose de 30 µg/kg, teve praticamente metade do efeito da peçonha (100µg/kg) (cerca de 6-12 vezes) seguida pela TsTX-V (3-5 vezes). A NA foi a catecolamina cujo nível plasmático permaneceu mais elevado.

Portanto, foi mostrado um aumento nos níveis plasmáticos de NA e ADR, com concomitante aumento na PAM em ratos conscientes e não imobilizados injetados com a TsV ou toxinas (**FIGURAS 10, 11 e 16**)

FIGURA 16 - Níveis plasmáticos de: **A)** NA; **B)** ADR, 10 minutos antes e 2,5, 30 e 90 minutos após administração endovenosa de salina 0,9 % (controles), TsV (100 e 50 µg/kg) ou toxinas TsTX-I e TsTX-V (30 e 15 µg/kg de cada uma). Os diferentes tempos de coleta foram realizados em um mesmo animal. As colunas representam a média (n=6-10 animais) e as barras, o erro padrão das médias. Os efeitos da TsV e de cada toxina foram comparados dose à dose.

* $p < 0,01$ em relação à TsV

** $p < 0,05$ em relação à TsV

◆ $p < 0,01$ em relação à TsTX-I

◆◆ $p < 0,05$ em relação à TsTX-I

4.8 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

Os efeitos da TsV e toxinas TsTX-I e TsTX-V na captação dos neurotransmissores triciados ^3H -L-glutamato ^3H -dopamina e ^3H -GABA, foram realizados ensaios de incubação com TsV e toxinas com o SCCR preparado a partir de córtex ou corpo estriato cerebral de ratos (SECR), dependendo do neurotransmissor a ser estudado. Os resultados dos ensaios com ^3H -L-Glu estão representados nas **FIGURAS 17 e 18** (TsV e TsTX-V, respectivamente); com ^3H -DA nas **FIGURAS 19, 20 e 21** (TsV, TsTX-I e TsTX-V, respectivamente) e com ^3H -GABA nas **FIGURAS 22, 23 e 24** (TsV, TsTX-I e TsTX-V, respectivamente). Os experimentos realizados com e sem a presença de Ca^{+2} extracelular ou com TTX, foram comparados entre si.

Neste trabalho, não foram verificados quaisquer efeitos significativos da TsTX-V (até a concentração de $2,77\mu\text{M}$) e da TsV ($3,9\text{ ng/mg}$ de proteína sinaptosomal) sobre a captação de L-Glu (**FIGURAS 17 e 18**). Não foram realizados experimentos de captação de L-Glu com a TsTX-I, visto que esta toxina está presente em grandes concentrações na TsV (aproximadamente 16 %) e esta não apresentou ação significativa sobre a captação deste neurotransmissor.

A captação de DA foi significativamente diminuída quando os SECR foram previamente incubados com a TsV, em todas as concentrações empregadas (**FIGURA 19**).

A TsTX-V também inibiu significativamente a captação de DA, mas de maneira dose-dependente e de 90 % em altas concentrações (**FIGURA 21**). Quando tetrodotoxina $1\mu\text{M}$ (bloqueador de canal para Na^+) foi adicionada, não foram observadas quaisquer alterações na captação de dopamina pela TsTX-V (**FIGURA 21**). Portanto, a inibição da captação de DA pela TsTX-V é dependente de canais para Na^+ sensíveis à tetrodotoxina. Com relação a ausência de Ca^{+2} extracelular não podemos afirmar que o mecanismo de inibição da captação da DA pela TsTX-V é dependente deste íon, uma vez que em determinadas concentrações, houve até um aumento da inibição da captação de DA na ausência de Ca^{+2} extracelular e em outras concentrações, não.

Para a TsTX-I, houve pequena, porém significativa ($p<0,05$) inibição na captação deste neurotransmissor, a partir da concentração de $0,75\mu\text{M}$

A **FIGURA 22** mostra a ação da TsV sobre a captação de GABA. A peçonha foi capaz de reduzir a captação de GABA em ambas as situações, apesar que, quando os íons Ca^{+2} foram removidos por EGTA e substituídos por íons Sr^{+2} , houve uma redução deste efeito sobre a captação do neurotransmissor, especialmente em baixas concentrações. TsTX-V igualmente diminuiu a captação de ^3H -GABA de uma maneira dose-dependente com inibição máxima de

aproximadamente 70% (**FIGURA 24**) Em experimentos com doses de até 5 μ M da neurotoxina TsTX-I, tanto em presença quanto na ausência de extracelular não houve nenhum efeito sobre a captação do mesmo (**FIGURA 23**).

FIGURA 17 - Gráfico representativo do ensaio de captação de $^3\text{H-L-glutamato}$ em SCCR na presença de concentrações crescentes de TsV. As colunas representam a média (n=3, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

FIGURA 18 - Gráfico representativo do ensaio de captação de $^3\text{H-L-Glutamato}$ em SCCR na presença de concentrações molares crescentes da neurotoxina TsTX-V. As colunas representam a média ($n=3$, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

FIGURA 19 - Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-Dopamina em SCER na presença de concentrações crescentes de TsV. As colunas representam a média (n=3, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

* Alteração significativa em relação ao controle $p < 0,01$

** Alteração significativa em relação ao controle $p < 0,05$

FIGURA 20 - Gráfico representativo do ensaio de captação de ^3H -Dopamina em SCER na presença de concentrações molares crescentes da neurotoxina TsTX-I.

As colunas representam a média ($n=3-4$, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

****** Alteração significativa em relação ao controle $p<0,05$

FIGURA 21 - Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-Dopamina em SCER na presença de concentrações molares crescentes da neurotoxina TsTX-V. O experimento foi realizado em presença de Ca²⁺ (2 mM) ou ausência do mesmo (substituído por Sr²⁺ + EGTA 1 mM) e na presença de Tetrodotoxina (TTX) 1 μM (adicionada previamente aos SCER 30 minutos antes dos ensaios de captação)

As colunas representam a média (n=3, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

* Significativo em relação ao controle (P<0.01)

** Significativo em relação ao controle (P<0.05)

♦ Significativo em relação aos experimentos na ausência de Ca²⁺ (p<0.01)

♦♦ Significativo em relação aos experimentos na ausência de Ca²⁺ (p<0.05)

+ Significativo em relação aos experimentos em presença de Ca²⁺ (p<0.01)

++ Significativo em relação aos experimentos em presença de Ca²⁺ (p<0.05)

NS Não significativo em relação aos experimentos com TTX

FIGURA 22 - Gráfico representativo do ensaio de captação de ³H-GABA em SCCR na presença de concentrações crescentes de TsV. O experimento foi realizado em presença de Ca²⁺ (2 mM) ou ausência do mesmo (substituído por Sr²⁺ + EGTA 1 mM). As colunas representam a média (n=3, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

* Alteração significativa em relação ao controle $p < 0,01$

** Alteração significativa em relação ao controle $p < 0,05$

FIGURA 23 - Gráfico representativo do ensaio de captação de $^3\text{H-GABA}$ em SCCR na presença de concentrações molares crescentes da neurotoxina TsTX-I. O experimento foi realizado em presença de Ca^{+2} (2 mM) ou ausência do mesmo (substituído por Sr^{+2} + EGTA 1 mM). As colunas representam a média ($n=3$, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

FIGURA 24 - Gráfico representativo do ensaio de captação de $^3\text{H-GABA}$ em SCCR na presença de concentrações molares crescentes da neurotoxina TsTX-V. O experimento foi realizado em presença de Ca^{+2} (2 mM). As colunas representam a média (n=3, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

* Alteração significativa em relação ao controle $p < 0,01$

** Alteração significativa em relação ao controle $p < 0,05$

Os transportadores presentes nas células neuroniais são os responsáveis pela captação dos neurotransmissores da fenda sináptica. Para verificar se a inibição do transporte de ^3H -GABA pela ação da neurotoxina TsTX-V ocorre diretamente sobre seus transportadores (**FIGURA 25**), dois dos transportadores de GABA (GAT-1 e GAT-3) foram expressos em sistema heterólogo de células COS-7. Neste sistema, não foi possível evidenciar a inibição da captação de ^3H -GABA pela TsTX-V, mostrando que sua ação não envolve diretamente nenhum dos transportadores avaliados.

FIGURA 25 - Gráfico representativo da captação de ^3H -GABA pelas células COS-7 expressando os transportadores heterólogos GAT-1 e GAT-3. Após incubação com a neurotoxina TsTX-V em diferentes concentrações molares, por 20 minutos, realizou-se o ensaio de captação deste neurotransmissor. Tanto para o transportador GAT-1 como para o GAT-3 não houve inibição significativa. As colunas representam a média ($n=3$, em triplicata) e as barras, o erro padrão das médias.

Como nos ensaios de captação de DA e GABA, a TsTX-V produziu um perfil semelhante de inibição, foi testada a capacidade desta α -toxina em alterar o potencial de membrana de uma célula neuroexcitável. Para isso foi utilizado um sistema manipulável de células que expressam os componentes de uma célula neuronal. O sistema de escolha foram células de glioma C6.

As células de glioma C6 foram previamente incubadas com uma sonda fluorescente DIBAC₄(3). A **FIGURA 26** mostra o progressivo aumento de fluorescência ao se adicionar a TsTX-V 2,77 μ M ao meio. Na **FIGURA 26A** observa-se o controle, sem a adição de agente despolarizante. De **26B** a **26F**, verifica-se o aumento progressivo desta fluorescência, em consequência da entrada da sonda na bicamada lipídica da célula, devida à despolarização provocada pela TsTX-V. Na **Figura 26F** (4 minutos após adição da TsTX-V), verifica-se fluorescência máxima, devido a intensa despolarização provocada pela TsTX-V.

FIGURA 26 - Microscopia confocal das células de glioma C6. **(A)** Controle; **(B)** Imediatamente após a adição da TsTX-V ($2,77 \mu\text{M}$); **(C)**, **(D)**, **(E)** e **(F)** : aumento progressivo da fluorescência em 1,2,3 e 4 minutos após adição da TsTX-V. Aumento de 40 X. Sonda fluorescente DIBAC₄(3) – A intensidade da fluorescência é proporcional a intensidade da despolarização da membrana das células.

4.9 DETERMINAÇÃO DA $[Ca^{+2}]_c$ EM CÉLULAS DE MLV DE AORTA DE RATOS

O efeito farmacológico da TsV sobre a concentração citoplasmática de Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_c$) em células do músculo liso vascular (MLV) da aorta de ratos em cultura foi estudado.

O carregamento das células do MLV de aorta de ratos foi realizado com a sonda fluorescente fura-2 AM (contagens/segundo) e a posterior análise da razão das intensidades de fluorescência nos comprimentos de onda 340/380 nm é proporcional à concentração de Ca^{+2} citoplasmática ($[Ca^{+2}]_c$).

A **FIGURA 27** apresenta registros representativos do carregamento das células do MLV de aorta de ratos com a sonda fluorescente fura-2 AM (contagens/segundo) e da razão das intensidades de fluorescência (340/380 nm) após a perfusão das células com KCl 60 mM (controle) e com TsV nas concentrações de 100 μ g/mL e 500 μ g/mL. Os traçados representativos das **FIGURA 27B, C e D** mostram que tanto no grupo controle positivo (KCl) quanto nos grupos de células estimuladas com as diferentes concentrações de TsV, houve aumento da $[Ca^{+2}]_c$.

O aumento da $[Ca^{+2}]_c$ após a perfusão das células com 100 μ g/mL de TsV ($0,066 \pm 0,011$; $n=3$; $p < 0,05$) foi menor em relação ao controle com KCl 60 mM ($0,147 \pm 0,015$; $n=3$) ou quando comparado ao efeito produzido após a perfusão com 500 μ g/mL de TsV ($0,169 \pm 0,022$; $n=3$) mostrando ser dose-dependente (**FIGURA 28**).

FIGURA 27 - Registros representativos de experimentos com células MLV de aorta de ratos. **A)** Carregamento das células com a sonda fluorescente FURA-2/AM (contagens/seg) Razão das intensidades de fluorescência (340/380 nm) após a perfusão das células com : **B)** KCl 60 mM **C)** TsV 100 $\mu\text{g/mL}$ e **D)** TsV 500 $\mu\text{g/mL}$.

FIGURA 28 - Efeito da perfusão de KCl 60 mM e de TsV sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos. Resultados expressos pela razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) (média $\pm$ E.P.M.).

□ controle (KCl 60 mM) (n=3);

■ TsV 100 μ g/mL (n=3)

■ TsV 500 μ g/mL (n=3).

* Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$) e em relação à concentração de TsV 500 μ g/mL ($p < 0,01$).

A **FIGURA 29** mostra o aumento significativo da $[Ca^{+2}]_c$ após a perfusão com TsV em relação ao controle (KCl 60 mM, 100%): 100 μ g/mL ($49,60 \pm 2,58$ %; n=3; $p < 0,05$) ; 500 μ g/mL ($103,66 \pm 5,17$ %; n=3).

A **FIGURA 30** apresenta registros representativos do carregamento das células do MLV de aorta de ratos com a sonda fluorescente FURA-2/AM (contagens/segundo) e da razão das intensidades de fluorescência (340/380 nm) após a perfusão das células com KCl 60 mM (controle) e com as toxinas TsTX-I e TsTX-V, ambas nas concentrações de 50 μ g/mL. O traçado representativo das **FIGURA 30B, 30C e 30D** mostram que tanto no grupo controle positivo (KCl) quanto nos grupos de células estimuladas com as toxinas TsTX-I e TsTX-V houve aumento da $[Ca^{+2}]_c$.

FIGURA 29 - Efeito da perfusão de TsV sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de rato. Resultados expressos em porcentagem da razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) em relação ao controle (KCl 60 mM) (média $\pm$ E.P.M.)

■ TsV 100 μg/mL (n=3)

■ TsV 500 μg/mL (n=3).

* Diferença significativa em relação à concentração de TsV 500 μg/mL ($p < 0,01$).

O aumento da $[Ca^{+2}]_c$ após a perfusão das células com 50 μg/mL da toxina TsTX-I ($0,056 \pm 0,006$; n=3; $p < 0,05$) e TsTX-V ($0,070 \pm 0,011$; n=3; $p < 0,05$) foi menor em relação ao controle com KCl 60 mM ($0,131 \pm 0,002$; n=3). Não houve diferença significativa no aumento da $[Ca^{+2}]_c$ quando as toxinas TsTX-I e TsTX-V (50 μg/mL) foram comparadas entre si (**FIGURA 31**).

A **FIGURA 32** mostra o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ após a perfusão das células de MLV com as toxinas TsTX-I e TsTX-V em relação ao controle (KCl 60 mM): TsTX-I 50 μg/mL ($43,92 \pm 3,06$ %; n=3); TsTX-V 50 μg/mL ($52,56 \pm 8,33$ %; n=3).

FIGURA 30 - Registros representativos de experimentos com células MLV de aorta de ratos.
A) Carregamento das células com a sonda fluorescente FURA-2/AM (contagens/seg)
Razão das intensidades de fluorescência (340/380 nm) após a perfusão das células
com : **B)** KCl 60 mM **C)** TsTX-I 50 $\mu\text{g/mL}$ e **D)** TsTX-V 50 $\mu\text{g/mL}$

FIGURA 31 - Efeito da perfusão de KCl 60 mM e das toxinas TsTX-I e TsTX-V (50 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos. Resultados expressos pela razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) (média ± E.P.M.).

□ controle (KCl 60 mM) (n=3);

■ TsTX-I 50 µg/mL (n=3)

■ TsTX-V 50 µg/mL (n=3).

* Diferença significativa em relação às toxinas TsTX-I e TsTX-V ($p < 0,01$).

FIGURA 32 - Efeito da perfusão das toxinas TsTX-I e TsTX-V (50 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de rato. Resultados expressos em porcentagem da razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) em relação ao controle (KCl 60 mM) (média ± E.P.M.).

Já ao perfundir das células com a toxina TsTX-I na concentração de 100µg/mL ($0,155 \pm 0,015$; n=3) houve um significativo aumento da $[Ca^{+2}]_c$ tanto em relação ao KCl 60 mM ($0,131 \pm 0,002$; n=3) ($p < 0,05$) quanto em relação a TsTX-V na mesma concentração ($0,105 \pm 0,014$; n=3) ($p < 0,01$) (**FIGURA 33**).

A **FIGURA 34** mostra o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ após a perfusão das células de MLV com as toxinas TsTX-I e TsTX-V, ambas na concentração de 100 µg/mL em relação ao controle (KCl 60 mM): TsTX-I ($121,8 \pm 8,9$ %; n=3); TsTX-V ($79,5 \pm 6,1$ %; n=3).

FIGURA 33 - Efeito da perfusão de KCl 60 mM e das toxinas TsTX-I e TsTX-V (100 µg/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos. Resultados expressos pela razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) (média $\pm$ E.P.M.).

□ controle (KCl 60 mM) (n=3);

■ TsTX-I 100 µg/mL (n=3)

■ TsTX-V 100 µg/mL (n=3).

** Diferença significativa em relação ao KCl 60 mM (controle) ($p < 0,05$).

♦ Diferença significativa em relação à TsTX-V 100 µg/mL ($p < 0,01$).

FIGURA 34 - Efeito da perfusão das toxinas TsTX-I e TsTX-V (100 μ g/mL de cada) sobre a $[Ca^{+2}]_i$ em células de MLV de aorta de rato. Resultados expressos em porcentagem da razão de emissão de fluorescência da sonda FURA-2/AM (340/380 nm) em relação ao controle (KCl 60 mM) (média $\pm$ E.P.M.)

** Diferença significativa em relação ao KCl 60 mM (controle) ($p < 0,05$).

♦ Diferença significativa em relação à TsTX-I 100 μ g/mL ($p < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

Peçonhas de escorpiões constituem uma vasta fonte de polipeptídeos bioativos. Um grande número de toxinas tem sido purificado da peçonha de diferentes espécies e usadas como ferramentas específicas para estudo da caracterização e do papel de canais iônicos. Neste contexto, canais para Na^+ são tão essenciais para o funcionamento neuronal que tornaram-se alvos durante a evolução de várias toxinas, desempenhando um papel muito importante na toxicidade de peçonhas que as contêm.

Este trabalho descreve o isolamento de duas potentes neurotoxinas da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* (buthidae) que atuam em canais para Na^+ voltagem-dependentes: a β -neurotoxina TsTX-I (TOLEDO e NEVES, 1976; ARANTES et al., 1989) e a α -neurotoxina TsTX-V (ARANTES et al, 1994; MARANGONI et al, 1995) e seus efeitos sobre a liberação de catecolaminas e pressão arterial em ratos conscientes e não imobilizados, bem como os efeitos sobre a captação de importantes neurotransmissores do SNC, GABA, L-glutamato e dopamina, em sinaptosomas cerebrais de ratos.

O trabalho descreve ainda os efeitos destas toxinas na concentração citoplasmática de cálcio em células de músculo liso vascular de aorta de ratos.

Os estudos das propriedades químicas de peçonhas de escorpiões sul-americanos, que pertencem à subfamília *Tityinae*, foram realizados principalmente com peçonhas obtidas das duas espécies mais comuns e perigosas para o homem: *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Verificou-se através de suas respectivas DL_{50} , em camundongos, que a peçonha de *T. serrulatus* é duas a três vezes mais tóxica que a de *T. bahiensis* (BÜCHERL, 1953).

O coeficiente de extinção da TsV, bem como de suas toxinas, foi determinado para viabilizar a injeção da dose desejada de proteínas solúveis, as quais são responsáveis pela toxicidade da peçonha. Através destes estudos, foi possível verificar que, para este lote de peçonha, o valor do coeficiente de extinção foi de 1,75 e as proteínas solúveis representam aproximadamente 48,5% da massa total da peçonha liofilizada. As toxinas TsTX-I e TsTX-V apresentaram coeficiente de extinção de 4,2 e 2,85, respectivamente.

A dosagem de proteínas totais da peçonha e das toxinas foi feita pelo método do Coomassie, baseado na metodologia descrita por Bradford (1976). O método é preciso e envolve relativamente pequenas concentrações de proteínas solúveis. A dosagem também foi confirmada pelo método da absorvância em 280/205 nm (SCOPES, 1974) e feita uma média entre os valores obtidos para todas elas.

A confirmação da toxicidade da TsV foi realizada através da determinação da dose letal 50% (DL₅₀), e o método de Weil (1952) foi escolhido para o cálculo da mesma e seus respectivos limites fiduciais. No experimento de DL₅₀, foi observado que a TsV possui uma toxicidade alta (cerca de 613 µg/kg), valores estes aproximados aos obtidos em trabalho anterior (VASCONCELOS et al., 2004).

A cromatografia da peçonha bruta, conforme descrito por Arantes et al.(1989), foi o primeiro passo para o isolamento e a purificação das toxinas empregadas neste trabalho. Através desta cromatografia de troca catiônica, foram obtidos treze picos: denominados I - XIII. A TsTX-I, eluída como pico XIII na cromatografia em CMC-52, representou aqui 11,25 % da peçonha solúvel. Assim, em função de sua abundância na TsV e sua elevada toxicidade, a TsTX-I desempenha um importante papel nos acidentes por picadas de *T. serrulatus*.

A simetria do pico de eluição é indicativo da homogeneidade da amostra, o que foi posteriormente confirmado através de eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes, onde a TsTX-I apresentou banda eletroforética única. A CLAE em coluna de fase reversa C-18 desta toxina, apresentou pico único e simétrico, confirmando a sua alta pureza. Assim, a TsTX-I é abundante na TsV e de fácil purificação, pois já é obtida pura na primeira cromatografia. A CLAE, além de confirmar a pureza desta toxina, ainda garante a retirada total do bicarbonato de amônia residual da primeira cromatografia.

A neurotoxina TsTX-V foi isolada a partir da fração XI por CLAE em coluna de fase reversa C-18 usando tampões contendo AcN e TFA. Esta técnica de isolamento de neurotoxinas escorpiônicas vem sendo empregada com grande frequência, apresentando certas variações em suas metodologias (POSSANI et al., 1999, 2000). Pode-se verificar através da análise dos perfis cromatográficos obtidos a ótima resolução e reprodutibilidade deste método no isolamento desta toxina.

A cromatografia da fração XI resultou, além da TsTX-V (XI-3) em outros 2 componentes, denominados XI-1 e XI-2. O rendimento médio do pico XI-3 (TsTX-V) foi de aproximadamente 62,95 % da fração XI, que correspondente, por sua vez, a aproximadamente 2,2 % da TsV. A pureza desta toxina foi demonstrada pela eluição como pico simétrico no perfil cromatográfico da CLAE e pela banda eletroforética única, por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sem SDS para proteínas básicas, realizada pelo método de Reisfeld et al. (1962) com profundas modificações, segundo descrito por Arantes et al. (1989).

As duas toxinas que atuam em canais para Na⁺, TsTX-I e TsTX-V, desempenham papel importante na toxicidade da peçonha, pois apresentam DL₅₀ aproximadamente 4 vezes menor que a da TsV. A TsTX-I tem uma DL₅₀ de 76 ± 9 µg/kg (i.v.) e a TsTX-V de 94 ± 7 µg/kg

(i.v.) e a peçonha solúvel de $375 \pm 45 \mu\text{g/kg}$ (ARANTES et al., 1994). As ações sinérgicas das duas classes de neurotoxinas que atuam em canais para Na^+ , bem como as toxinas que atuam em canais para K^+ são as responsáveis pelos drásticos efeitos tóxicos da peçonha.

Ao lado da TsTX-V, outras importantes α -toxinas são conhecidas, como a TsTX-III (SAMPAIO et al., 1983) e a Tityustoxina (TsTX, também chamada de Ts3 ou Toxina IV-5.(BECERRIL et al., 1997).

Para avaliar os efeitos das duas toxinas da TsV sobre a liberação de catecolaminas e os efeitos sobre a pressão arterial, os experimentos (determinação de catecolaminas plasmáticas e medida direta da pressão arterial) foram realizados em ratos conscientes e não imobilizados, previamente cateterizados, visto que diversas publicações relatam interferência de anestésicos gerais (como barbituratos, uretana, cloralose, halotano, ciclopropano, cloridrato de cetamina) com a atividade simpatoadrenal e aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas por estresse induzido por imobilização (POPPER et al., 1977; AZEVEDO et al., 1979; ARMSTRONG et al., 1982; KVETNANSKÝ et al., 1992; TSUNODA et al., 2001; GROUZMAN et al., 2003). A anestesia por uretana, por exemplo, altera a resposta pressora mediada por receptores α_2 -adrenérgicos (ARMSTRONG et al., 1982) e barbitúricos tem uma ação depressora adrenomedular (BAUM et al., 1985). Foi relatado que a cateterização arterial é o mais preciso método de coleta de amostras de sangue (GROUZMAN et al., 2003). A determinação da pressão arterial média (PAM) foi feita por método direto invasivo, ou seja, por meio de cateterização da artéria femoral e registro da PAM diretamente da aorta abdominal. Esta é uma das melhores, mais precisas e sensíveis das técnicas usadas para estudos de pressão arterial em animais de pequeno porte (VAN VLIET et al., 2000). Outra grande vantagem da técnica é que o animal pode permanecer consciente e livre em sua própria gaiola, o experimentador não entra em contato direto com o animal, a pressão monitorada em tempo real e os registros obtidos ficam armazenados para posterior análise, justificando o uso destes procedimentos no presente trabalho.

As doses de TsV (50 e 100 $\mu\text{g/kg}$) e toxinas (15 e 30 $\mu\text{g/kg}$, para cada toxina) foram escolhidas baseadas em suas respectivas DL_{50} (ARANTES et al., 1989, 1994). A maior dose empregada foi aproximadamente um terço menor que as respectivas DL_{50} , para evitar um provável choque.

Os resultados dos experimentos mostraram que a TsV, bem como as toxinas, injetadas endovenosamente, induziram efeito pressor máximo 2 a 3,5 minutos após a administração das mesmas. A TsTX-I (30 $\mu\text{g/kg}$) bem como a peçonha (100 $\mu\text{g/kg}$) tiveram efeitos hipertensivos

praticamente equipotentes, manifestando-se logo após a injeção e apresentando longa duração (90 min). Foram observadas intensas oscilações no perfil dos registros após administração da TsV e TsTX-I, indicativo de espasmos arteriais.

A TsV (100 e 50µg/kg) mostrou uma ação discretamente mais intensa, e que, a despeito da dose, provavelmente foi devido à ação sinérgica de toxinas que atuam em canais para Na⁺ (α e β-toxinas) e toxinas que bloqueiam canais para K⁺, com já descrito.

Todos as peçonhas de escorpiões são conhecidas por causarem pronunciada hipertensão em vítimas humanas e em animais experimentais (GUERON & YARON, 1970; CORRADO et al., 1974; MOSS et al., 1973; FREIRE-MAIA et al., 1974; AZEVEDO et al., 1983; SAMPAIO et al., 1991; OMRAN et al., 1992; HERING et al., 1993; ARANTES et al., 1994; FOUCART et al., 1994; WANG et al., 1994; FREIRE-MAIA et al., 1995; ISMAIL et al., 1995; FATANI, 1998; ZEGHAL et al., 2000; De DÁVILA et al., 2002; ABROUG et al., 2003), com exceção daquelas que contém alto conteúdo de histamina (ISMAIL et al., 1975) ou baixa toxicidade.

Estes efeitos hipertensivos são considerados o maior fator etiológico responsável pelo desenvolvimento de falência cardíaca e edema pulmonar induzidos pela peçonha (FREIRE-MAIA e CAMPOS, 1989; GUERON et al., 1992).

SAMPAIO et al. (1991) relataram que ratos anestesiados com uretana e injetados com a TsTX-I (112µg/kg, i.v.) mostraram um curto pico hipertensivo, seguido por intensa diminuição na PAM. Efeitos semelhantes foram descritos em ratos anestesiados com pentobarbital sódico (ANDRADE et al., 2004), onde a fração gama de *T. serrulatus* ou TsTX-I (80 µg/100 g) induziu um curto, porém pronunciado pico pressor (3 min) na PAM, com progressiva e intensa queda abaixo dos valores normais. Os resultados obtidos neste trabalho não corroboram com estes estudos prévios, uma vez que foi observado somente aumento na PAM para a TsTX-I. Esta diferença pode ser justificada pelas altas doses, bem como pela interferência de anestésicos usados por estes autores.

Apesar de sua alta toxicidade, a TsTX-V mostrou baixo efeito pressor sobre a PAM (até 30 minutos), comparado a TsV ou TsTX-I, com progressivo decréscimo na PAM, chegando até a causar um pequeno efeito hipotensivo, com redução de $-7,5 \pm 1,75$ mmHg ($p < 0,05$) em relação ao controle (90 min).

Arantes et al. (1994) foram os primeiros a caracterizar a TsTX-V como uma α-toxina que aumenta a duração do potencial de ação de fibras B de nervo vago de coelho e observaram somente efeitos hipertensivos de longa duração em ratos anestesiados com uretana e injetados com essa toxina. A principal diferença em essencial entre os protocolos descritos nesse trabalho

e os descrito por aqueles autores é o anestésico uretana. Esses resultados suportam a interferência de anestésicos gerais sobre os efeitos pressores induzidos por toxinas escorpiônicas.

Este é o primeiro trabalho a descrever e a mostrar os efeitos da peçonha de *T. serrulatus*, bem como das toxinas TsTX-I e TsTX-V, sobre a pressão arterial em ratos conscientes e não imobilizados, por meio de registro direto da mesma pela aorta abdominal via catéter femoral.

Os efeitos cardiovasculares do envenenamento escorpiônico são atribuídos à maciça liberação de catecolaminas de terminais nervosos adrenérgicos e noradrenérgicos (GUERON et al., 1992; WANG et al., 1994; ZEGHAL et al., 2000). Os efeitos tóxicos de catecolaminas sobre o sistema cardiovascular são provocados pelo acúmulo de Ca^{+2} intracelular (alteração iônica de Ca^{2+}) com aumento na taxa cardíaca e pressão arterial e aumento do consumo de oxigênio cardíaco (GUERON e YARON, 1970).

SOFER e GUERON (1990) mostraram que a peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* induz em animais experimentais um dramático aumento na pressão arterial acompanhado por uma massiva descarga de catecolaminas no sangue.

A atividade de outras peçonhas também foi avaliada anteriormente. FOUCART et al. (1994), trabalhando com a peçonha do escorpião *Buthus Martensii* Karsh (família butidae), observaram pequeno, porém significativo e rápido, aumento na pressão arterial e níveis plasmáticos de noradrenalina (não adrenalina) na dose de 100 $\mu\text{g/kg}$. Em doses menores não foi observado qualquer efeito hipertensivo.

Em situações fisiológicas normais onde há uma elevação da pressão arterial, os barorreceptores arteriais (inseridos nas paredes vasculares da aorta e das carótidas) despolarizam-se e os potenciais de ação são transmitidos para o sistema nervoso central, por meio de nervos aferentes. Após o processamento destas informações no SNC, são promovidos ajustes autonômicos simpático e parassimpático, no sentido de se normalizar a pressão arterial em níveis adequados à perfusão dos diferentes órgãos e tecidos.

Assim, o sistema nervoso simpático é um dos principais reguladores da homeostase da pressão sanguínea. Desde que as catecolaminas são liberadas de terminais nervosos simpáticos e da medula da glândula adrenal, sua dosagem no sangue constitui-se em um dos parâmetros usados para estudar a função simpatoadrenal.

Os efeitos da TsV e toxinas sobre os níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina foram determinados em ratos conscientes e não imobilizados. Outras catecolaminas, tais como dopamina e metabólitos, não foram detectados pela metodologia empregada. Precauções especiais foram tomadas durante a coleta de sangue, no sentido de evitar estresse e outros

potenciais artefatos relacionados ao disparo de barorreflexos ou ainda a rápida degradação de catecolaminas *ex vivo*.

A análise quantitativa de catecolaminas é importante no diagnóstico da hipertensão arterial, mal de Parkinson, esquizofrenia, epilepsia, etc. Noradrenalina e adrenalina são os principais mediadores da atividade do sistema nervoso simpático. A concentração dessas catecolaminas em diferentes matrizes biológicas é frequentemente usada no diagnóstico e monitoramento de certas doenças e também como indicador potencial do efeito direto ou indireto de drogas, medicamentos e toxinas que atuam no sistema nervoso simpático (HOLLENBACH et al., 1998; TSUNODA et al., 1999; WOOD e HALL, 2000).

A análise de catecolaminas em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico, inicialmente descrita em 1973 (KISSINGER et al, 1973) ainda apresenta um desafio nos dias atuais. Desde a década de 70, diversas modificações em termos de preparação da amostra e de condições do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo introduzidas com o propósito de atingir melhoria da seletividade e sensibilidade com diminuição do volume da amostra e do tempo da análise. O procedimento de extração inicialmente baseava-se no princípio de adsorção das catecolaminas em alumina em pH 8,6, com posterior eluição em pH entre 1 e 2. O método de extração em alumina apresenta o inconveniente de co-eluição de componentes endógenos do plasma com as catecolaminas. Na década de 80 foi descrito um procedimento alternativo de extração envolvendo a complexação do grupamento diol das catecolaminas com o ácido difenilbórico, seguida da formação de par iônico para a extração do complexo para o solvente orgânico. Com o intuito de melhoria da seletividade, outros autores introduziram um material trocador de cátions antes da extração das catecolaminas para o solvente orgânico. O procedimento de extração em duas etapas foi posteriormente referido como causa de baixas recuperações (SMEDES et al., 1982; KRSTULOVIC, 1982; ANTON e SAYRE, 1962; MACDONALD e LAKE, 1985; BOULOUX et al., 1985; CANDITO et al., 1996; GANHAO et al., 1991; HOLLENBACH et al., 1998).

A análise de catecolaminas em plasma também é descrita por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência após reação de derivação com fluorescamina, o-ftalaldeído, dansilação ou método do tri-hidroxindol (oxidação do grupamento catecol e rearranjo em meio alcalino) (DIAMANT e BYERS, 1975; KRSTULOVIC e POWELL, 1979). Os métodos apresentam sensibilidade compatível com as concentrações basais de catecolaminas no plasma da ordem de pmol/mL. Os inconvenientes restringem-se a introdução de etapa adicional na análise, não especificidade dos agentes de derivação e exigência de precisão no

tempo da reação de derivação com o risco de resultados errôneos (KRSTULOVIC e POWELL, 1979; FORSTER e MACDONALD, 1999).

Neste estudo, foi empregado o método para análise de catecolaminas em plasma humano descrito por Forster e Macdonald (1999) com modificações propostas por Marques et al (2002). O método utiliza procedimento de extração líquido-líquido e formação de par iônico, com determinação por CLAE e detector eletroquímico.

Originalmente descrito para análise de catecolaminas em plasma humano, a metodologia passou por uma adaptação e re-validação com vistas na extração de possíveis componentes endógenos, presentes no plasma de ratos, que poderiam causar interferência tanto na etapa de extração líquido-líquido, quanto na eluição dos picos. O emprego de 500 µL de plasma, descrito a partir da metodologia de Marques et al. (2002) foi insuficiente para quantificar as catecolaminas em plasma de animais não tratados (controles). Assim, realizou-se inicialmente uma cromatografia com extrato de plasmas de animais injetados por pelo menos 60 minutos, para verificar quais catecolaminas estariam presentes em quantidades passíveis de detecção e se haveria algum interferente. Pelo cromatograma representativo, verifica-se que as únicas catecolaminas extraídas, eluídas e capazes de serem quantificadas foram a NA e ADR, mesmo em animais injetados com a TsV (100 µg/kg, i.v.). O cromatograma também mostra a presença de um pico de natureza desconhecida, provavelmente um componente endógeno que, presente no plasma, foi extraído e eluído, mas que não coincidiu com o tempo de retenção de nenhuma outra catecolamina, portanto, não interferindo na análise e quantificação da NA e ADR.

O problema de quantificação dos níveis das duas catecolaminas em animais controles foi resolvido empregando-se quantidades próximas a 1000 µL de plasma, sendo que esta quantidade foi obtida de um “pool” do plasma de 2 ratos em proporções iguais. Assim, para a quantificação de catecolaminas nestes plasmas, foram determinados e avaliados limites de quantificação menores do que o descrito no método proposto. Foram obtidas novas curvas de calibração e linearidade tanto para os controles quanto para os tratamentos, tendo-se em vista que os valores para os controles ficaram abaixo do limite de quantificação apresentado no método descrito por Marques et al. (2002) (cerca de 0,6 pM/mL para adrenalina e 1 pM/mL para noradrenalina).

Para obtenção dos valores das catecolaminas por mililitros de plasma, foram empregados 50 µL de cada solução padrão, ao invés dos 25 µL descrito no método original, pois neste método empregava-se 500 µL de plasma, e os valores eram dados por mililitro de plasma. Assim, foram obtidas curvas linearidade e calibração, para a determinação dos níveis de catecolaminas, com alto coeficiente de correlação (r^2 acima de 0,99), tanto para os controles

quanto para os tratamentos, e os parâmetros analíticos específicos referentes a precisão e exatidão do limite de quantificação ficaram abaixo dos 20%, como preconizado pelo Center for Drug Evaluation and Research (1998). O método também exibiu boa recuperação, mesmo para as baixas concentrações, com uma média de 70 % de recuperação para NA e 76 % de recuperação para ADR.

Concluiu-se que o método proposto e seus devidos parâmetros analíticos re-validados, apresentam-se apropriados para a determinação de NA e ADR em plasma de ratos tratados com peçonha ou toxinas, bem como sensível o suficiente para quantificar essas catecolaminas em volumes de plasma próximos de 1 mL em animais controles.

As catecolaminas foram extraídas do plasma por complexação com o ácido difenilbórico etanolamina (DPBEA), por formação de um complexo entre o borato e a catecolamina diol em pH alcalino e formação de par iônico com o brometo de tetraocilamônio e extração para o solvente orgânico heptano:octanol. A extração principal é seguida de uma segunda extração em fase aquosa (ácido acético 400 mM). A retenção da amina polar como a noradrenalina é seletivamente afetada pela concentração do íon-par e os constituintes ácidos da amostra são afetados seletivamente pelo pH.

Hollenbach et al (1998) relatam concentrações de NA no plasma humano de $2,11 \pm 0,24$ pmol/mL e concentrações de ADR e DA aproximadamente 10 e 100 vezes inferiores às daquelas da noradrenalina, respectivamente.

Já em plasma de ratos, há relatos de níveis variáveis destas catecolaminas, variando como controles, conscientes ou anestesiados, de 1 a 2 pM/mL para NA e 0,3 a 1 pM/mL para ADR (BAECHTOLD et al., 2001; BLANC et al., 2000; ZEGHAL et al. 2000, ABROUG et al., 2003).

Neste trabalho, foram encontrados níveis plasmáticos de cerca de 0,6 pM/mL para ADR e 1,0 pM/mL para ADR em animais controles. Estes níveis encontram-se dentro da média relatada na literatura, mostrando que a metodologia de coleta desenvolvida também mostrou-se apropriada. Foram realizadas 4 coletas em um mesmo animal, com o devido cuidado em se retirar no máximo 0,9 % de sangue do mesmo nas 3 primeiras coletas (para evitar possível hipovolemia, que poderia desencadear mecanismos reflexos de controle da pressão arterial). A primeira coleta foi usada como controle interno e as coletas subsequentes foram feitas baseadas nos picos pressores e no final do tempo de monitorização da PAM.

Níveis máximos de catecolaminas foram registrados em 2,5 minutos, seguindo-se uma gradual queda dos mesmos, para todos os tratamentos. A TsV (100µg/kg) induziu o maior aumento, cerca de 22-24 vezes maior que o controle (para ambas catecolaminas), seguida pela

toxina TsTX-I, na dose de 30 µg/kg (cerca de 10-12 vezes), e, mesmo após 90 min da administração das mesmas, os valores ainda permaneceram elevados

Observa-se portanto, para a peçonha e a toxina TsTX-I, uma elevação na PAM com concomitante aumento dos níveis de NA e ADR. Apesar de demonstrarem efeitos pressóricos equivalentes em praticamente todo perfil observado, a TsV induziu aumento significativamente maior (quase 2 vezes) de catecolaminas plasmáticas do que sua toxina, TsTX-I, em todos os tempos analisados. Deve-se salientar, porém, que as doses utilizadas da peçonha também foram maiores (100 e 50 µg/kg).

A α -neurotoxina TsTX-V, mais uma vez, demonstrou ter efeitos significativamente menores que os da TsV e o da TsTX-I, na capacidade de induzir liberação de catecolaminas (com níveis plasmáticos cerca de 3-5 maior que o controle), mas ainda permanecendo maiores que acima do controle após 90 min. Todavia, estes efeitos observados sobre a liberação de catecolaminas não puderam explicar a ligeira queda na PAM de ratos injetados com essa toxina (30 µg/kg).

Em resumo, TsV, TsTX-I e TsTX-V evocaram uma resposta simpatoadrenal rápida, intensa e de longa duração, mostrada pelos altos níveis plasmáticos de catecolaminas (efeito máximo em 2,5 minutos, aproximadamente) seguido por uma gradual redução nestes níveis, mas permanecendo significativamente maiores que os controles após 90 minutos.

A intensa resposta simpatoadrenal induzida pela TsV pode ser explicada pela potente ação sinérgica de toxinas que atuam em canais para Na⁺ e K⁺, com aumento da liberação de altos níveis plasmáticos de catecolaminas, como observado neste trabalho. Assim, TsV ou toxinas induzem a dramático aumento na pressão arterial, acompanhado por maciça descarga de catecolaminas no sangue, semelhante ao observado com a peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (GUERON et al., 1990).

Diferentes peçonhas de escorpiões afetam a liberação de catecolaminas de maneira diferente. Foucart et al. (1994) relataram pequeno aumento (cerca de 2 vezes) nos níveis plasmáticos de NA (ADR permaneceu inalterada), 15 min após injeção intravenosa da peçonha do escorpião *Buthus martensii* Karsch (100 µg/kg) em ratos não anestesiados. A peçonha do escorpião *Buthus occitanus* (300 µg/kg i.v.), todavia, induziu um rápido (3,6 min) aumento de cerca de 30-40 vezes nos níveis de catecolaminas plasmáticas em ratos anestesiados, com concomitante pico pressor máximo de cerca de 78 mmHg acima dos valores da linha de base (ZEGHAL et al., 2000).

De Dávila et al. (2002) demonstraram em vítimas humanas picadas por *T. zulianus* que os efeitos cardiovasculares e edema pulmonar estão correlacionados diretamente com as alterações de NA e, conseqüentemente, o quadro de gravidade dos acidentes também.

Abroug et al. (2003) empregando a metodologia de ensaio radioenzimático para determinação de NA e ADR em plasma de cães anestesiados, descreveram que a peçonha do escorpião *Androctonus australis* induz um aumento de quase 40 vezes nos níveis destas catecolaminas, 5 min após injeção da fração tóxica G₅₀ da peçonha de *Androctonus australis* Hector (50 µg/kg, i.v.). Eles mostraram que mediadores adicionais que são muito potentes sobre o tônus vascular (neuropetídeo Y, endotelina-1) ou aqueles provavelmente secretados como consequência da disfunção cardiovascular (peptídeo natriurético atrial) são liberados logo após o envenenamento escorpiônico e provavelmente são a causa de muitos aspectos fisiopatológicos que caracterizam a síndrome.

Os mecanismos pelos quais o envenenamento escorpiônico provoca ativação do sistema nervoso simpático são provavelmente mistos. Estudos experimentais indicam que ele induz a liberação de noradrenalina e acetilcolina pela ação em receptores pré-sinápticos periféricos e viscerais (FREIRE-MAIA, 1995).

Wang et al. (1994) observaram que a vasoconstrição induzida pela peçonha foi inibida pelo antagonista α -adrenérgico prazosin e que a vasoconstrição induzida por essa peçonha não é resultante de um efeito direto da mesma.

A vasoconstrição por substâncias pressórias, além daquelas envolvidas com a atividade simpática, também tem é como causa desta hipertensão causada por peçonhas de escorpiões, experimentalmente e em casos humanos. Foi observado em estudos experimentais com peçonhas de diferentes escorpiões (*Centruroides sculpturatus*, *Leiurus quinquestriatus* e *Mesobuthus tamulus*) que estas aumentam a atividade da renina-angiotensina plasmática, sugerindo que o fenômeno hipertensivo pode estar parcialmente relacionado ao aumento da formação da angiotensina II, conseqüente à elevada atividade da renina plasmática (RADHA KRISHNA MURTHY e VAKIL, 1988; GUERON et al., 1992).

Ainda que ambas toxinas atuem em canais para Na⁺, A TsTX-I mostrou efeito mais intenso sobre a liberação de catecolaminas e pressão arterial que a TsTX-V. Assim, é possível que a toxicidade da TsTX-V não seja relacionada somente à habilidade para liberar catecolaminas, indicando que outros neurotransmissores, tais como acetilcolina, podem estar envolvidos nesta toxicidade. A hipotensão terminal, observada com a TsTX-V, apesar dos altos níveis de catecolaminas plasmáticas, pode ser justificada desta forma. Cininas e prostaglandinas

também podem estar envolvidas na hipotensão terminal induzidas pelo envenenamento escorpiônico (ISMAIL et al., 1992).

Fatani et al. (1998) mostraram que cininas podem estar envolvidas nos efeitos cardiovasculares e letais induzidos pela peçonha do escorpião *L. quinquestriatus* em coelhos.

Em conclusão, os efeitos induzidos pela TsV e pela TsTX-I são muito similares, indicando que esta toxina tem importante papel na gênese da hipertensão e letalidade relacionada ao envenenamento por *T. serrulatus*. Catecolaminas são, provavelmente, os principais mediadores responsáveis pela hipertensão induzida pelas toxinas escorpiônicas que atuam em canais para Na^+ . Parece que a toxicidade da TsTX-V não está relacionada somente a sua habilidade para liberar catecolaminas, indicando que outros neurotransmissores podem estar envolvidos com sua toxicidade. Em adição, é possível que diferenças observadas nos efeitos induzidos por TsTX-I e TsTX-V sejam devidos a alterações estruturais entre canais para Na^+ presentes em vários tipos de inervações. Esta interpretação é consistente com os resultados obtidos por Bomfim et al. (2005) em músculo retrator peniano com as toxinas TsTX-I e TsTX-V, mostrando efeitos distintos entre elas.

Espera-se, portanto que as diferentes classes de toxinas escorpiônicas que atuam em canais para Na^+ (α e β -neurotoxinas), possam também modular, de diferentes maneiras, a liberação ou captação de neurotransmissores do SNC, tanto os excitatórios, quanto os inibitórios e os neurotransmissores monoaminérgicos, como a dopamina.

Observações em nosso laboratório nos mostram que ratos injetados com as duas classes de toxinas isoladas da peçonha de *T. serrulatus* (α - e β -toxinas) por via intraperitoneal e especialmente por via endovenosa, mostram reações e comportamentos distintos. Enquanto que a TsTX-I induz um quadro típico de ativação do sistema nervoso parassimpático (hipersalivação, micção abundante, lacrimejamento com estrias de sangue, dificuldade respiratórias, aumento da PAM), a TsTX-V induz um quadro com poucas manifestações decorrentes da ativação do parassimpático, porém é freqüente a observação de convulsões, mioclonias, aumento da agressividade, inquietação motora, “sacudidelas”, tremores e comportamento de fuga em animais injetados com essa toxina. Já a TsV, em doses próximas à DL_{50} , observamos efeitos predominantes da primeira, com algumas manifestações da segunda (dados não mostrados).

Tem se afirmado que as α -toxinas escorpiônicas são altamente ativas em cérebro de mamíferos (para revisão, ver GORDON e GUREVITZ, 2003). A habilidade de várias dessas α -toxinas para diferenciar entre distintos canais para Na^+ dão margem ao estudo do papel

funcional e distribuição de subtipos de canais em células e tecidos (GORDON e GUREVITZ, 2003).

O glutamato é o aminoácido mais abundante no cérebro de mamíferos e funciona como um neurotransmissor predominantemente excitatório. Por outro lado, o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório encontrado em todo SNC. O sistema dopaminérgico cerebral tem um papel central no controle dos movimentos, liberação de hormônios e comportamentos complexos. Devido a alta relevância desses neurotransmissores, drogas que interferem com a liberação ou captação desses, podem apresentar poderosa ação fisiológica e podem ser usados como ferramentas para o estudo da função sináptica, sistemas de neurotransmissão ou desenvolvimento de úteis agentes terapêuticos.

Os transportadores de NT dependentes de Na^+ compreendem duas distintas famílias, uma abrangendo os carreadores de aminoácidos excitatórios e a outra incluindo transportadores de aminas biogênicas, GABA e glicina. Para ambas famílias de carreadores, o transporte do substrato é ligado ao co-transporte de íons sódio abaixo de um gradiente de concentração (AMARA, 1996).

Diversas evidências indicam que sinaptosomas são um modelo válido para estudar terminais nervosos e membranas neuronais *in vitro*, uma vez que apresenta praticamente todos os constituintes de uma terminação nervosa. Sinaptosomas podem manter um potencial de membrana negativo no interior, apresentam canais para Ca^{+2} sensíveis à voltagem ao exibir liberação de neurotransmissores dependentes deste íon. Outros trabalhos mostraram a presença de canais para Na^+ sensíveis à tetrodotoxina e estimulados pela veratridina (para revisão, ver KRUEGER et al., 1980).

Os resultados desse trabalho mostraram que TsV e TsTX-V foram efetivos na inibição da captação de ^3H -GABA e ^3H -DA, mas não para a captação de ^3H -Glu, sugerindo que as duas famílias de carreadores de NT apresentam diferentes mecanismos de transporte, com distinta sensibilidade a despolarização induzida pela abertura de canais para Na^+ ou Ca^{+2} . Na presença de Ca^{+2} as toxinas escorpiônicas atuam no canal para Na^+ , permitindo um aumento na entrada do íon, que por sua vez leva a abertura de canais para Ca^{+2} e um aumento na despolarização.

Transportadores de dopamina (DAT) estão localizados predominantemente nos terminais dopaminérgicos e estão altamente concentrados no estriado (MILLER et al., 1999; UHL, 1998). Alguns autores especulam que os DAT um alto gradiente iônico e, portanto, uma grande demanda de energia. A captação de ^3H -DA pelos sinaptosomas mostrou significativa diminuição, quando previamente incubada com TsV (cerca de 70 % de inibição) ou TsTX-V (cerca de 90 % de inibição). A inibição da captação de ^3H -DA foi dose dependente, alcançando

efeito máximo aproximadamente em 0,7 μM de TsTX-V. Na presença de Ca^{+2} , a captação de $^3\text{H-DA}$ que quando aquele é substituído por Sr^{+2} , como pode ser observado nos experimentos controle (ou seja, na ausência da toxina), mas os resultados mostraram que a TsTX-V induziu significativa diminuição na captação de $^3\text{H-DA}$, ambas na presença ou ausência de Ca^{+2} , indicando que este efeito ocorre independentemente de íons Ca^{+2} . A

A redução da captação de $^3\text{H-DA}$ induzida pela TsTX-V foi totalmente abolida pela TTX, que inibe especificamente a permeabilidade dos canais para Ca^{+2} , sem, contudo, afetar canais para K^+ ou Ca^{+2} – dependentes de voltagem (EVANS, 1972; NARAHASHI, 1974). Estes resultados sugerem que o efeito observado foi uma consequência da ação da TsTX-V sobre os canais para Na^+ -dependentes de voltagem.

O efeito bloqueador da TTX sobre a liberação de neurotransmissor induzidas por toxinas escorpiônicas é bem documentado (SAMPAIO et al., 1997; FERNANDES et al., 2004a, 2004b), mas a TsTX-VII, outra toxina da TsV, foi capaz de induzir a liberação de NT de sinaptosomas de cérebro de ratos e este efeito não foi bloqueado pela TTX (SAMPAIO et al., 1997). Os efeitos estimulatórios da TiTX- γ e TsTX sobre a liberação de DA foram bloqueados por TTX, indicando mais uma vez a dependência dos canais para Na^+ (FERNANDES et al., 2004a, 2004b).

TsV e TsTX-V foram efetivos em inibir a captação de $^3\text{H-GABA}$, que mostra uma similar dose-dependência, observada para a captação de $^3\text{H-DA}$, sugerindo que ambos transportadores apresentam mecanismos muito similares, sendo afetados da mesma maneira pela toxina. Este resultado corrobora com o fato que esses carreadores pertençam à mesma família de transportadores.

Como demonstrado pelos presentes resultados, a redução da captação de $^3\text{H-GABA}$ é mais intensa na presença de Ca^{+2} , especialmente em baixas concentrações, mas este efeito também acontece em sua ausência. Está claro, portanto, que a inibição da captação pode ser intensificada por uma adicional despolarização causada pela abertura dos canais para Ca^{+2} e conseqüente aumento da concentração de Ca^{+2} no citoplasma, mas outro mecanismo não dependente de íons Ca^{+2} pode estar envolvido no efeito observado.

Neurônios e células gliais acumulam neurotransmissores que são dependentes do co-transporte de Na^+ , através do qual a energia estocada pelo transporte eletroquímico transmembrana pode ser usado para mover o soluto para dentro da célula (GEGELACHVILI, 1998; HE e CURRY, 1995; TRENDLENBURG, 1991). Este é provavelmente o principal mecanismo para finalizar a transmissão sináptica. O processo de captação ou o sistema de

transporte são acoplados não somente ao sódio, mas também a íons adicionais, como o K^+ ou Cl^- .

A despeito do fato de que β -toxinas podem causar a liberação dopamina em fatias do córtex cerebral de ratos (FERNANDES et al., 2004) e que esta liberação é dependente de canais para Na^+ , mas não dependente de Ca^{2+} extracelular e . que esta classe de toxinas escorpiônicas causam pequeno aumento nas concentrações totais de $[Na^+]_i$ e $[Ca^{+2}]_i$, mas induzem significativa liberação de glutamato (MASSENSINI et al., 1998), em nossos experimentos, a TsTX-I mostrou fraca atividade inibitória na captação de 3H -dopamina e nenhuma atividade inibitória na captação de 3H -GABA, com ou sem a presença de Ca^{+2} extracelular. Portanto, embora ambos mecanismos de liberação e captação de NT possam depender de gradientes eletroquímicos, onde o canal para Na^+ pode ter importante papel, a modulação deste canais pode resultar em diferentes respostas frente a ação desta classe de toxina.

Constatado o efeito de inibição da captação do neurotransmissor GABA em SCCR pela neurotoxina TsTX-V, procurou-se reproduzir este resultado em culturas de células que expressam unicamente os transportadores gabaérgicos. Para isso foram utilizados os sistemas de células heterólogas COS-7 para expressarem transportadores de GABA. Foram clonados e expressos em células COS-7 os transportadores de GABA, GAT-1 e GAT-3.

O uso de células que expressam transportadores, como células COS-7 tem auxiliado muito nos estudos sobre mecanismos de transporte, demonstrando que os transportadores de membrana são co-transportadores, os quais transportam sódio e freqüentemente íons cloro (KUHAR e ZARBIN, 1978), juntamente com o neurotransmissor (JOHNSTONE, 1990).

Quando células COS-7 foram usadas para expressar transportadores de GABA, não foi possível reproduzir os resultados obtidos em SCCR, mesmo em concentrações de 2,77 μM . Uma provável explicação para isso é que a TsTX-V não age diretamente sobre os transportadores GAT-1 e GAT-3, mas sim em suas adjacências. Tal fato é evidenciado pela inibição da atividade desta toxina quando TTX foi adicionada à reação.

Estes sistemas heterólogos de células que expressam os componentes neuronais não são células neuronais, portanto não possuem todos os componentes que uma célula do SNC possui, incluindo canais iônicos dependentes de voltagem que desempenham importante papel no gradiente eletrogênico das células e no seu potencial de membrana. Dentre estes canais está o canal de Na^+ , importante alvo descrito até agora para esta α -neurotoxina.

A inibição da captação dependente de Na^+ em sinaptosomas pela TsTX-V é consistente com a ação proposta de α -neurotoxina em canais para Na^+ . Esta classe de neurotoxinas

retardam a inativação dos canais para Na^+ e induzem um prolongamento da fase de despolarização do potencial de ação. Isso resulta em um rápido aumento da concentração de Na^+ sinaptosomal e, assim, em redução do potencial eletroquímico do gradiente de Na^+ , que é conhecido por energizar a captação de NT dependente de Na^+ . A inibição da captação de NT pela TsTX-V pode ter sido uma consequência direta da redução do gradiente de Na^+ transmembrana.

Apesar de sinaptosomas representarem uma apropriada preparação para estudar os eventos relacionados ao mecanismo de captação, todavia, o pequeno tamanho destas preparações impede o registro do potencial de membrana usando procedimentos eletrofisiológicos. Para driblar este problema e confirmar a despolarização induzida pela TsTX-V, uma vez que em todos os ensaios de captação de NT ela produzia perfil semelhante de inibição, foi testada a capacidade desta α -toxina em alterar o potencial de membrana de uma célula. Para isso foram utilizados um sistema manipulável de células que expressam os componentes de uma célula neuronal. O sistema de escolha foi células de glioma C6, previamente incubados com a sonda fluorescente DIBAC₄(3). O ensaio confocal indica que a toxina causa despolarização de células de glioma C6, evidenciado pela máxima fluorescência em 3 min, sugerindo que a TsTX-V age, pelo menos em parte, alterando o equilíbrio eletrogênico da célula. Resultados semelhantes foram obtidos com crotoxina (da peçonha de *Crotalus durissus*) e peçonha de *Micrurus* (Coral), quando esta neurotoxina inibiu a captação de GABA e glutamato pela alteração do potencial de membrana (CECCHINI et al., 2004; 2005).

Os resultados dos trabalhos envolvendo captação de NT suportam a hipótese da participação de canais para Na^+ na inibição da captação de ^3H -DA e ^3H -GABA por sinaptosomas, em presença da TsV e TsTX-V. Estas reduzem a captação destes NT, mas não de ^3H -Glu. Provavelmente a captação de ^3H -Glu não foi afetada por causa do mecanismo da entrada sinaptosomal de Na^+ através de transportadores contra o gradiente não é tão relevante para ^3H -Glu como este é para a captação de ^3H -DA e ^3H -GABA.

Em conclusão, a redução da captação de ^3H -DA e ^3H -GABA é devido a despolarização induzida pela entrada de Na^+ em consequência da ação da toxina em canais para Na^+ -dependentes de voltagem, afetando o gradiente de Na^+ transmembrana, que é importante para a captação de NT.

Este estudo providencia uma interessante perspectiva a cerca da modulação da captação de NT via manipulação farmacológica das propriedades dos canais para Na^+ e que pode levar a um melhor entendimento de seus papéis fisiológicos e patológicos.

Cox et al. (1997) demonstraram a presença de canais para Na^+ sensíveis à TTX em células de MLV de aorta humana mantidas em cultura. Outros estudos também demonstraram a presença de canais para Na^+ sensíveis à voltagem em células de artérias coronárias e pulmonares humanas em cultura (JAMES et al., 1995; QUIGNARD et al., 1997). Ativadores de canais para Na^+ , veratridina e batracotoxina, mostraram que podem causar uma contração lenta em aorta isolada de rato, sendo esta contração mediada por canais para Na^+ (SHINJOH et al., 1991). Portanto, a modulação da entrada de Na^+ via canais para Na^+ sensíveis a TTX em músculo liso vascular pode ter um papel fundamental em seus processos de acoplamento-excitação-contracção.

Em comum com outros tipos de células, as correntes desses canais para Na^+ dependentes de voltagem ativam e inativam rapidamente. Assim, foi sugerido que estes canais podem contribuir com o potencial de repouso de membrana (COX et al., 1997).

Van Renterghen e Lazdunski (1991) demonstraram a existência em células de MLV de canais para Na^+ não dependentes de voltagem, que são ativos na ausência de algum estímulo externo. Estes canais também não apresentaram sensibilidade a TTX e a toxina polipeptídica de anemona marinha (*Anemonia sulcata*) – Toxina II – conhecida por alterar a atividade de Na^+ dependentes de voltagem.

Neste trabalho, foi realizado um estudo para se verificar os efeitos farmacológico da TsV e toxinas TsTX-I e TsTX-V sobre $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células de MLV de aorta de ratos em cultura

O carregamento das células do MLV de aorta de ratos foi realizado com a sonda fluorescente Fura-2 AM. Esta é uma das mais comuns e precisas sondas empregadas para este tipo de experimento, constituindo-se em um dos quelantes mais utilizados para medida da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ através da utilização de sua fluorescência. O Fura-2 apresenta um K_d de aproximadamente 100 nM, que é a concentração aproximada do $[\text{Ca}^{+2}]_i$ em condições basais. Uma célula carregada com Fura-2 pode ser observada ao microscópio e tratada com vários estímulos que façam com que a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ aumente.

As toxinas e a peçonha mostraram que são capazes de produzir aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células musculares lisas, provavelmente por interagir com canais para Na^+ sensíveis à voltagem presentes na membrana das células, induzindo a despolarização das mesmas, o que leva à abertura dos canais de Ca^{+2} e consequente aumento de $[\text{Ca}^{+2}]_c$.

O aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células musculares lisas produzido pelo TsV mostrou ser concentração dependente; considerando-se os efeitos observados com as duas doses avaliadas da peçonha.

As toxinas TsTX-I e TsTX-V são capazes de produzir aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em células musculares lisas, nas duas concentrações testadas (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, a resposta com a concentração maior foi muito mais intensa para a TsTX-I (quase 3 vezes maior que para a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$). Estes resultados mostram que a peçonha e as toxinas apresentam ação direta sobre as células do músculo liso vascular, levando ao aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} que, por sua vez, desencadeia o mecanismo de contração destas células. Os resultados sugerem também que a TsTX-I tem uma ação direta maior sobre o mecanismo envolvido no influxo de Ca^{+2} , uma vez que a resposta a uma concentração maior foi muito mais intensa. Esta vasoconstrição pode potencializar a ação das catecolaminas liberadas pela peçonha.

Como ambas toxinas apresentaram efeitos semelhantes neste modelo experimental, pode-se inferir que os canais para Na^+ dependentes de voltagem, presentes neste tipo de célula, possuem sítios de interação para α - (TsTX-V) e β -toxinas (TsTX-I).

O aumento da $[Ca^{+2}]_c$ induzido pelas toxinas é observado logo após o início da perfusão das mesmas (menos de 2 minutos), sendo detectada em tempos menores que a induzida pelo aumento do K^+ no meio externo, indicando haver uma alta afinidade das células por estas toxinas.

O mecanismo preciso de ação de muitos componentes de peçonhas permanece desconhecido, mas o que se conhece é que muitos deles exercem sua ação através de interações com componentes específicos de membrana, tais como os canais iônicos. Estas interações específicas fazem de peçonhas e seus constituintes um atrativo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou ferramentas no estudo de alvos moleculares presentes nas membranas de células.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados dos experimentos obtidos, podemos concluir que:

Os efeitos induzidos pela peçonha e TsTX-I foram muito similares, indicando que esta toxina tem importante papel na gênese da hipertensão e letalidade da peçonha de *T. serrulatus*

Catecolaminas são provavelmente os principais mediadores responsáveis pela hipertensão induzida por toxinas que atuam em canais para Na^+ ;

É provável que a toxicidade da TsTX-V não seja relacionada apenas à sua habilidade para liberar catecolaminas, indicando que outros neurotransmissores podem estar envolvidos em sua ação;

Nos ensaios de inibição da captação dos neurotransmissores de ^3H -GABA, ^3H -L-glutamato e ^3H -dopamina em sinaptosomas cerebrais de ratos, a TsTX-V mostrou ter os efeitos mais significativos. A inibição da captação de ^3H -dopamina observada é dependente de canais para Na^+ . A TsTX-V não atua diretamente nos transportadores GAT-1 e GAT-3, expressos em células COS-7, mas promove intensa rápida e intensa despolarização em gliomas C6;

A redução da captação de ^3H -DA e ^3H -GABA é devido a despolarização induzida pela entrada de Na^+ em consequência da ação da TsTX-V em canais para Na^+ -dependentes de voltagem, afetando o gradiente de Na^+ transmembrana, que é importante para a captação de NT.

Ambas as classes de toxinas estudadas, representadas pela TsTX-I e TsTX-V, bem como a TsV são capazes de produzir aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células musculares lisas provavelmente por interagir com canais para Na^+ sensíveis à voltagem presentes na membrana das células, induzindo a despolarização das mesmas, o que leva a abertura dos canais de Ca^{+2} e consequente aumento de $[\text{Ca}^{+2}]_c$. A TsTX-I mostrou-se mais potente nesta preparação, visto que uma dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ causou efeito muito mais intenso do que a TsTX-V na mesma concentração.

Em resumo, é possível que as diferenças observadas sobre os efeitos induzidos pela TsTX-I e TsTX-V sejam consequência de alterações estruturais entre canais para Na^+ presente em vários tipos de tecidos e inervações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ABROUG, F.; NOUIRA, S.; EL ATROUS, S.; BESBES, L.; BOUKEF, R.; BOUSSARSAR, M.; MARGHLI, S.; EURIN, J.; BARTHELEMY, C.; EL AYEB, M.; DELLAGY, K.; CARAYON, A. A canine study of immunotherapy in scorpion envenomation. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 29, p. 2266-2276, 2003.

AMARA, S.G. Neurotransmitter transporters: new insights into structure, function and pharmacology. **Rev. Bras. Biol.**, São Paulo, v 56, p. 5-19, 1996.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A. Acidentes por escorpiões, **Arq. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 64, n.4, p. 212-216, 1990.

ANDRADE, M.V.; CARAMEZ, M.P.R.; ABREU, E.M.N.N.; DOLNIKOFF, M.; OMAR, E.D.; VELASCO, I.T.; CUNHA-MELO, J.R. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. **Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.**, New York, v. 138, p. 97-104, 2004.

ANTON A.H.; SAYRE, D. F. Study of factors affecting aluminium oxide-trihydroxyindole procedure for analysis of catecholamines, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 138, p. 360, 1962.

ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionalization of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 8, p. 907-916, 1989.

ARANTES, E.C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A. e GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1199, p. 69-75, 1994.

* Elaborada de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas, **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002.

ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. What is tityustoxin? **Toxicon**, Oxford, v. 30, p. 786-789, 1992.

ARMSTRONG, J.M.; LEFÈVRE-BORG, F.; SCATTON, B.; CAVERO, I. Urethane Inhibits cardiovascular Responses Mediated by the Stimulation of Alpha-2 Adrenoceptores in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda v. 223, p. 524-535, 1982.

AZEVEDO, A.D.; SILVA, A.B.; CUNHA-MELO, J.R.; FREIRE-MAIA, L. Cardiovascular and respiratory effects induced by a purified scorpion toxin (tityustoxin) in unanesthetized rats. **Toxicon**, Oxford, v. 21, p. 753-759, 1983.

AZEVEDO, A.D.; CUNHA-MELO, J.R.; FREIRE-MAIA, L. Arterial hypertension and pulmonary edema induced by catecholamines in unanesthetized rats. **Pharmacol Res Commun.**, New York, v. 1, p.157-67, 1979.

BAECHTOLD, F.; CAVADAS, C.; GASSER, D.; MARKERT, M.; GROUZMANN, E.; PETERSON, K.L.; WAEBER, B.; FEIHL, F. Cardiovascular effects of fentanyl in conscious rats. **Pflugers Arch.**, Berlin, v.443, p. 155-166, 2001.

BAGHCI, S.; DESHPANDE, S.B. Indian red scorpion (*Buthus tamulus*) venom-induced augmentation of cardiac reflexes is mediated athrough the mechanisms involving kinins in urethane anaesthetized rats. **Toxicon**, Oxford, v. 36, p. 309-320, 1998.

BAJJALIEH, S.M.; SCHELLER, R.H. The biochemistry of neurotransmitter secretion. **J. Biol Chem.**, San Francisco, v. 270, p. 1971-1974, 1995.

BASUDEV, H.; ROMANO-SILVA, M.A.; BRAMMER, M.J.; CAMPBELL, I.C. Effects of sodium on PKC translocation; relationship to neurotransmitter release. **Neuroreport.**, London, v. 6, p. 809-812, 1995.

BAUERFEIND, R.; JELINEK, R.; HUTTNER, W.B. Synaptotagmin I- and II-deficient PC12 cells exhibit calcium-independent, depolarization-induced neurotransmitter release from synaptic-like microvesicles. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 364, p. 328-334, 1995.

BAUM, D.R.; HALTER, J.B.; TABORSKY, G.J. Jr.; PORTE D. Jr. Pentobarbital effects on plasma catecholamines: temperature, heart rate and blood pressure. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 248, p. E95-E100, 1985.

BAWASKAR, H.S.; BAWASKAR, P.H. Management of cardiovascular manifestation of poisoning of the indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*). **Br. Heart. J.**, Londres, v. 68, p. 478-480, 1992.

BAWASKAR, H.S.; BAWASKAR, P.H. Prazosin for vasodilatador treatment of acute pulmonary oedema due to scorpion sting. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 81, p. 719-729, 1987.

BAWASKAR, H.S.; BAWASKAR, P.H. Prazosine in management of cardiovascular manifestation of scorpion sting. **Lancet**, Londres, v. 1, 510-511, 1986.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience: Exploring the Brain**. Montreal: Williams & Wilkins, 1996, 280 p.

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

BECHIS, G.; SAMPIERI, F.; YUAN, P.M.; BRANDO, T.; MARTIN, M.F.; DINIZ, C.R.; ROCHAT, H. Amino acid sequence of Toxin VII, a β toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.122, p.1146-53, 1984.

BENDA, P., FAIVRE-BAUMAN, A. Glutamate accumulation by a clone of glial cells. **Brain**, Washington, v.76, p.371-375, 1974.

BENNETT, J.P. JR.; LOGAN, W.J.; SNYDER, S.H. Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 21, p. 1533-1550, 1973.

BICALHO, A. F. X.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. M.; GOMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA, M. A. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. **Neuroscience**, Oxford, v.113, p. 115-123, 2002.

BLANC, J.; LAMBERT, G.; ELGHOZI, JL. Endogenous rennin and related short-term blood pressure variability in the conscious rat. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 394, p. 311-320, 2000.

BOMFIM, J.H.G.G.; GODOY, M.A.F.; GIGLIO, J.R.; de OLIVEIRA, A.M.; ARANTES, E.C. Effects induced by *Tityus serrulatus* venom and its toxins TsTX-I and TsTX-V on the rat isolated retractor penis muscle. **Pharmacology**, New York, v. 73, p. 190-198, 2005.

BORDEN, L.A. GABA transporter heterogeneity: Pharmacology and cellular localization. **Neurochem Int.**, Oxford, v. 29, p. 335-56, 1996.

BOULOUX, P.; PERRET, D.; BESSER, G.M. Methodological considerations in the determination of plasma catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Ann. Clin. Biochem.**, Londres, v. 22, p. 194-203, 1985.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCARETCHI, F; BARACAT, E.C.; NOGUEIRA, R.J.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F.A.; FONSECA, M.R.; TOURINHO, F.S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 37, p. 331-336, 1995.

BÜCHERL, W. Escorpião e escorpionismo no Brasil. 2.Atividade das peçonhas de *Tityus serrulatus* e *T. bahiensis* sobre camundongos. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 25, p. 83-108, 1953.

CANDITO, M.; BREE, F.; KRSTULOVIC, A.M. Plasma catecholamine assays: calibration with spiked plasma *versus* aqueous solutions. **Biomed. Chromatogr.**, Londres, v. 10, p. 40-42, 1996.

CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D.; MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent potassium channels by a novel scorpion toxin. **Nature**, Londres, v. 296, p. 90-91, 1982.

CARDOSO, J.L.; FAN, W.H.R.; ARAÚJO, A.A.; SANTALÚCIA, M.; LOPES, J.M. Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990-1993). **Rev. Soc. bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 10, 1995.

CARVALHO, F.F.; NENCIONI, A.L.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R.; DORCE, V.A. Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, Tarrytown, v. 60, p. 7-14, 1998.

CATERRAL, W.A. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. **Physiol. Rev.**, Washington, v.72, p. 15S, 1992.

CATERRAL, W.A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 55, p. 953-985, 1986.

CATTERALL, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, Cambridge, v. 26, p. 13-25, 2000.

CATTERALL, W.A. The molecular basis of neuronal excitability. **Science**, Washington, v. 223, p. 653-661, 1984.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chrom. B**, Amsterdam, v. 689, p.175-180, 1997.

CECCHINI, A. L.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; AMARA, S.; ARANTES, E. C. Inhibition of glutamate and GABA synaptosomes uptake by crotoxin, the major neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **JVAT incl. Trop. Dis.**, Botucatu, v.10, p. 260-279, 2004.

CECCHINI, A.L.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; AMARA, S.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp (Coral) snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. Part A.**, New York, v. 140, p. 125-134, 2005.

CESTÉLE, S.; CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxins action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, Paris, v. 82, p. 883-892, 2000.

CESTÈLE, S.; QU, Y.; ROGERS, J.C.; ROCHAT, H.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Voltage Sensor-Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by α -Scorpion Toxin Bound to the S3–S4 Loop in Domain II. **Neuron**, Cambridge, v. 21, p. 919–931, 1998.

CESTÈLE, S.; STANKIEWICZ, M.; MANSUELLE, P.; DE WAARD, M.; DARGENT, B.; GILLES, N.; PELHATE, M.; ROCHAT, H.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; GORDON, D. Scorpion α -like toxins, toxic to both mammals and insects, differentially interact with receptor site 3 on voltage-gated sodium channels in mammals and insects. **Eur. J. Neurosci.**, Paris, v. 11, p. 975–985, 1999.

CHA A.; RUBEN, P.C.; GEORGE, A.L. JR; FUJIMOTO, E.; BEZANILLA F. Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na^+ channel fast inactivation. **Neuron**, Cambridge, v. 22, p. 73–87, 1999.

CHANDA, B.; BEZANILLA, F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. **J. General Physiol.**, New York, v. 120, p. 629–645, 2002.

CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MOREIRA-FERREIRA, A.M.; do NASCIMENTO CORDEIRO, M.; MARIA, W.S.; RICHARDSON, M.; DINIZ, C.R. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello Campos). In: **Envenomings and Their Treatments** (BON, C.; GOYFFON, M., eds). Fondation Marcel Mérieux, Lyon, p. 183-195, 1996.

CHEN, H.; HEINEMANN, S.H. Interaction of scorpion α -toxins with cardiac sodium channels: binding properties and enhancement of slow inactivation. **J. Gen. Physiol.**, New York, v. 117, p. 505–518, 2001.

CHUANG, R.S.I.; JAFFE, H.; CRIBBE, L.; PEREZ-REYES, E.; SWARTZ, K.J. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. **Nat. Neurosci.**, New York, v. 1, p. 668-674, 1998.

CONCEICAO, I.M.; LEBRUN, I; CANO-ABAD, M.; GANDIA, L.; HERNANDEZ-GUIJO, J.M., LOPEZ, M.G.; VILLARROYA, M.; JURKIEWICZ, A.; GARCIA, A.G. Synergism between toxin-gamma from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and veratridine in chromaffin cells. **Am J Physiol.**, Bethesda, v. 274, p. C1745-1754, 1998.

CORRADO, A.P.; ANTONIO, A.; DINIZ, C.R. Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*), an usual sympathetic postganglionic stimulant. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 164, p. 253-258, 1968.

CORRADO, A.P.; RICCIOPPO NETTO, F.; ANTONIO, A. The mechanism of the hypertensive effect of Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus* Lutz and Mello), **Toxicon**, Oxford, v. 12, p. 145-150, 1974.

COUTINHO NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1975.

COUTINHO-NETO, J.; ABDUL-GHANI, A.S.; NORRIS, P.J.; THOMAS, A.J.; BRADFORD, H.F. The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitter from cerebral cortex *in vivo* and *in vitro*. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 35, p. 558-565, 1980.

COX, R.H.; ZHOU, Z.; TULENKO, T.N. Voltage-gated sodium channels in human aortic smooth muscle cells. **J Vasc Res.**, Basel, v. 35, p.310-317, 1998.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S. Escorpionismo. In: **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.C.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr., V. (Eds)., São Paulo: Sarvier, p. 198-208, 2003.

CUPO, P.; MENEZES, J.B.; HERING, S.E. Escorpionismo en la Región de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Aspectos epidemiológicos, in 10^o CONGRESSO LATINO AMERICANO DE TOXICOLOGIA, La Habana, Cuba, 1998. **Livro resumo**, La Habana, Associação latino americana de Toxicologia, 1998a, p. 175.

CUPO, P.; OLIVEIRA, J.S.M.; FIGUEIREDO, F.; KAZAVA, D.K.; HERING, S.E. Escorpionismo en la Región de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Óbitos ocorridos, in 10^o CONGRESSO LATINO AMERICANO DE TOXICOLOGIA, La Habana, Cuba, 1998. **Livro resumo**, La Habana, Associação latino americana de Toxicologia, 1998b, p. 175.

DALL'ASTA, V., GATTI, R., ORLANDINI, G., ROSSI, P. A., ROTOLI, B. M., SALA, R., BUSSALATI, O., GAZZOLA, G. C. Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol loaded cells. **Exp Cell Res**, New York, v.231, p.260-268, 1997.

DANBOLT, N.C.; CHAUDHRY, F.A.; DEHNES, Y.; LEHRE, K.P.; LEVY, L.M.; ULLENSVANG, K.; STORM-MATHISEN, J. Properties and localization of glutamate transporters. **Prog Brain Res.**, Amsterdam, v. 116 p. 23-43, 1998.

DE BIN, J.A.; MAGGIO, J.E.; STRICHARTZ, G.R. Purification and characterization of choleroxin, a chloride channel ligand from venom of the scorpion. **Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)**, Washington, v. 264, p. C361-C369, 1993.

De DÁVILA, C.A.M; DÁVILA, D.F.; DONIS, J.H.; BELLABARBA, G.A.; VILLARREAL, V.; BARBOZA, J.S. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1339-1346, 2002.

DENAC, H.; MEVISSSEN, M.; SCHOLTYSIK, G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, Berlin, v. 362, p. 453-479, 2000.

DIAMANT, J.; BYERS, S.O. A precise catecholamine assay for small plasma samples. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 85, p. 768-693, 1975.

DINIZ, C.R. Venoms of Tityinae: chemical and pharmacological aspects of Tityinae venoms. In BETINNI, S. **Handbook of Experimental Pharmacology: Arthropod Venoms**, vol. 48. Berlin, Springer-Verlag, 1978, cap. 14, p. 379-394.

DINIZ, C.R.; GONÇALVES, J.M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone eletrophoresis. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 41, p. 470-477, 1960.

DINIZ, C.R.; GONÇALVES, J.M. Some chemical and pharmacological properties of brazilian scorpion venoms In: BUCKLEY, E.E.; PORGES, N. **Venoms**. Washington; A.A.A.S. Press, 1956. p. 131-144.

DORCE, V.A.; SANDOVAL, M.R.; Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on the GABAergic and dopaminergic systems of the rat brain. **Toxicon**, Oxford, v. 32, p.1641-1647, 1994.

ELIASOF, S.; ARRIZA, J.L.; LEIGHTON, B.H.; KAVANAUGH, M.P.; AMARA, S.G. Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. **J Neurosci**, Washington, v. 18, p. 698-712, 1998.

ENGELBORGHES, S.; D'HOOGHE, R.; DE DEYN, P.P. Pathophysiology of epilepsy. **Acta Neurol Belg**, Bruxelles, v. 100, p. 201-213, 2000.

EVANS, M.H. Tetrodotoxin, saxitoxin, and related substances: their applications in neurobiology. **Int. Rev. Neurobiol.**, New York, v. 15, p. 83-166, 1972.

EVANS, M.H. Tetrodotoxin, saxitoxin, and related substances: their applications in neurobiology. **Int Rev Neurobiol.**, New York, v. 15, p. 83-166, 1972.

FARO, L.R.; DO NASCIMENTO, J.L.; ALFONSO, M.; DURAN, R. Protection of methylmercury effects on the in vivo dopamine release by NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 42, p. 612-618, 2002.

FATANI, A.J.; FURMAN, B.L.; ZEITLIN, I.J. The involvement of plasma kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetised rabbits, **Toxicon**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 523-536, 1998.

FERNANDES, V.M.; MASSENSINI, A.R.; PRADO, M.A.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M.V. Effects of alpha-scorpion toxin, tityustoxin, on the release of [³H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. **Neurochem Int.**, Oxford, v. 44, p. 91-97, 2004b.

FERNANDES, V.M.; NICOLATO, R.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, R.S.; PRADO, M.A.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. Beta-scorpion toxin induces the release of gamma-[³H]aminobutyric acid in rat brain slices. **Neuroreport**, London, v. 12, p. 2911-2913, 2001.

FERNANDES, V.M.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMES, D.A.; PRADO, M, A.; SANTOS, T.M.; GOMEZ M.V. Dopamine release evoked by beta scorpion toxin, *Tityus gamma*, in prefrontal cortical slices is mediated by intracellular calcium stores. **Cell Mol. Neurobiol.**, New York, v. 24, p. 757-767, 2004a.

FONTECILLA-CAMPS, J.C.; HABERSETZER-ROCHAT, C.; ROCHAT, H. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 7443-7447, 1988.

FORSTER, C.D; MACDONALD, I.A. The assay of the catecholamine content of small volumes of human plasma. **Biomedical Chromatography**, Londres, v. 13, p. 209-215, 1999.

FOUCART, S.; WANG, R.; MOREAU, P.; SAUVÉ, R.; DE CHAMPLAIN, J.; YAMAGUCHI, N.; BAI, L.; LU, XR. Effects of *Buthus martensii* Karsh scorpion venom on the release of noradrenaline from *in vitro* and *in vivo* rat preparations. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Montreal, v. 72, p. 855-861, 1994.

FOZZARD, H.H.; HANCK, D.A. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 76, p. 887-927, 1996.

FREIRE-MAIA, L. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J. Toxicol. Toxin Reviews**, New York, v. 14, p. 423-435, 1995.

FREIRE-MAIA, L.; AZEVEDO, A.D.; COSTA VAL, V.P. Respiratory arrhythmias produced by purified scorpion toxin in the rat. **Toxicon**, Oxford, v. 11, p. 255-257, 1973.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. On the treatment of cardiovascular manifestations of scorpion envenomation (reply letter). **Toxicon**, Oxford, v.25, p.125-130, 1987.

FREIRE-MAIA, L.; PINTO, G.I.; FRANCO, I., Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 188, p. 207-213, 1974.

FREIRE-MAIA, L; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C.L., ODELL, G.V. (Eds). Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics, **Proceedings of the 9 th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins**. Stillwater, Oklahoma, Pergamon Press, 1989, p. 139-159.

FURSPAN, P.B.; WEEB, R.C. Potassium channels and vascular reactivity in genetically hypertensive rats. **Hypertension**, Dallas, v. 15, p. 687-691, 1990.

GALVEZ, A.; GIMENEZ-GALLEGO, G. REUBEN, J.P.; ROY-CONTANCIN, L.; FEIGENBAUM, P.; KACZOROWSKI, G.J.; GARCIA, M.L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, v. 265, p.11083, 1990.

GANHAO, M.F.; HATTINGH, J.; HURWITZ, M.L.; PITTS, N.I. Evaluation of a simple plasma catecholamine extraction procedure prior to high-performance liquid chromatography na electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 564, p. 55-66, 1991.

GARCIA, M.L.; GAO, Y.D.; McMANUS, O.B.; KACZOROWSKI, G.J. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 739-748, 2001.

GEGELACHVILI G.; SCHOUSBOE A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. **Brain Res. Bull.**, New York, v. 45, p. 233-238, 1998.

GIANGIACOMO, K.M.; GARCIA, M.L.; MCMANUS, O.B. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. **Biochemistry**, Washington, v. 31 p. 6719-6727, 1992.

GILLES, N.; BLANCHET, C.; SHICHOR, I.; ZANINETTI, M.; LOTAN, I.; BERTRAND, D.; GORDON, D. A scorpion α -like toxin that is active in insects and mammals reveals an unexpected specificity of distribution of sodium channel subtypes in rat brain neurons. **J.Neurosci.**, Washington, v. 19, p. 8730–8739, 1999.

GIMENEZ-GALLEGO, G.; NAVIA, M.A.; REUBEN, J.P.; KATZ, G.M.; KACZOROWSKI, G. J. and GARCIA, M. L. Purification, sequence, and model structure of carybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 85, p. 3329-3333, 1988.

GOMEZ, M.V. Purificação e caracterização da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*. **Tese de doutorado**. Escola Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1967.

GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Mem.Inst.Butantan Simp.Internac.**, São Paulo, v.33, p.899-902, 1966.

GOMEZ, M.V.; FARRELL, N. The effect of tityus toxin and ruthenium red on the release of acetylcholine from slices of cortex of rat brain. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 24, p. 1103-1107, 1985.

GORDON, D.; GILLES, N; BERTRAND, D.; MOLGO, J.; NICHOLSON, G.M.; SAUVIAT, M.P.; BENOIT, E.; SHICHOR, I.; LOTAN, I.; GUREVITZ, M.; KALLEN, R.G.; HEINEMANN, S.H. Scorpion toxins differentiating among neuronal sodium channel subtypes: nature's guide for design of selective drugs. In: Menez, a. (Ed.), **Perspectives in Molecular Toxinology**, Willey, Chinchester, England, 2002, p. 215-238.

GORDON, D.; GUREVITZ, M. The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. **Toxicon**, Oxford, v. 41, p. 25-28, 2003.

GORDON, D.; ILAN, N.; ZILBERBERG, N.; GILLES, N.; URBACH, D.; COHEN, L.; KARBAT, I., FROY, O.; GAATHON, A.; KALLEN, R.G.; BENVENISTE, M.; GUREVITZ, M. An 'Old World' scorpion beta-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 270, p. 2663-70, 2003.

GORDON, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; CESTELE, S.; KOPEYAN, C.; CARLIER, E.; BENKHALIFA, R.; PELHATE, M.; ROCHAT, H. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, p. 8034-8045, 1996.

GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M.; ZINN-JUSTIN, S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, New York, v. 17, p. 131-159, 1998.

GRAY, E. G. AND WHITTAKER, V. P. The isolation of nerver endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. **J Anat**, New York, v.96, p.79-87, 1962.

GROUZMANN, E.; CAVADAS, C.; GRAND, D., S.; BRUNNER, H.R.; MAZZOLAI, L. Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. **Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.**, Berlin, v. 447, p. 254-258, 2003.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R.Y. A new generation of Ca^{+2} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 260, p. 3440-3450, 1985.

GUERON, M.; ADOLPH, R.J.; GRUPP, I.L.; GABEL, M.; GRUPP, G.; FOWLER, N.O. Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 45, p. 979-986, 1980.

GUERON, M.; ILIA, R.; SHAHAK, E.; SOFER, S. Renin and aldosterone levels and hipertension following envenomation in humans by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 30, p. 765-767, 1992.

GUERON, M.; ILIA, R.; SOFER, S. The cardiovascular system after scorpion envenomation. A Review. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, New York, v. 30, p. 245-258, 1992.

GUERON, M.; MARGULIA, G.; Arthropod poisons and the cardiovascular system. **Am. J. Emerg. Med.**, New York, v. 18, p. 708-714, 2000.

GUERON, M.; MARGULIA, G.; SOFER, S.; Echocardiographic and radionuclide angiographic observation following scorpion envenomation by *Leiurus quinquestriatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 28, p. 1005-1009, 1990.

GUERON, M.; OVSYSHCHER, I. What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation? **Toxicon**, Oxford, v. 25 (2), p.121-124, 1987.

GUERON, M.; YAROM, R. Cardiovascular manifestation of severe scorpion sting. Clinic pathologic correlations. **Chest**, Chicago, v. 57, p. 156-162, 1970

GUREVITZ, M.; GORDON, D.; BEN-NATAN, S.; TURKOV, M.; FROY, O.; KARBAT, I.; ANGLISTER, J.; SHAANAN, B.; PELHATE, M.; ADAMS, M.E. Diversification of neurotoxins by C-tail “wiggling” – a scorpion recipe for survival. **FASEB J.**, Bethesda, v. 15, p. 1201-1205, 2001.

GUREVITZ, M.; ZILBERBERG, N.; FROY, O.; TURKOV, M.; WILUNSKY, R.; KARBAT, I.; ANGLISTER, J.; SHAANAN, B.; PELHATE, M.; ADAMS, M.E.; GILLES, N.; GORDON, D. Diversification of toxic sites on a conserved protein scaffold – a scorpion recipe for survival. In: MENEZ, A. (Ed.), **Perspective in Molecular Toxinology**, Chichester: Willey, 2002, p. 239-253.

GWEE, M. C. E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M.; CHEAH, L.S. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Victoria, v. 29, p. 795-801, 2002.

GWEE, M.C.E.; GOPALAKRISHNAKONE P.; CHEAH, L.S.; WONG, P.T.H.; GONG, J.P.; KINI, R.M. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, New York, v. 15, p. 37-57, 1996.

HARVEY J.; WEDLEY, S.; FINDLAY, J.D.; SIDELL, M.R.; PULLAR, I.A. Omega-Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium-induced release of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, dopamine, gamma-aminobutyric acid and glutamate from rat brain slices. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 35, p. 385-92, 1996.

HARVEY, A.L. Scorpion envenoming: An introduction. **Toxicon**, Oxford, v. 32, p. 1007, 1994.

HASSANI, O.; MANSUELLE, P.; CESTELE, S.; BOURDEAUX, M.; ROCHAT, H.; SAMPIERI, F. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts gamma) from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Eur J Biochem.**, Oxford, v. 260, p. 76-86, 1999.

HE, P. AND CURRY, F.E. Measurement of membrane potential of endothelial cells in single perfused microvessels. **Microvasc Res**, Amsterdam, v.50, p.183-198, 1995.

HEINEMANN, S.H.; TERLAU, H.; IMOTO, K. Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. **Pflügers Arch.**, Berlin, v. 422, p. 90–92, 1992.

HENRIQUES, M.C; GOMEZ, M.V. The effect of scorpion venom tityustoxin on the uptake of calcium in synaptosomes. **Brain Res Bull.**, New York, v. 7, p. 255-259, 1981.

HERING, E.S., JURCA, M., VICHI, F.L., AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P. Reversible cardiomyopathy in patients with severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*: evolution of enzymatic, electrocardiographic and echocardiographic alterations. **Ann. Trop. Paediatr.**, London, v. 13, p. 173-182, 1993.

HODGKIN, A.L.; HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerves. **J. Physiol.**, London, v. 117, p. 500–544, 1952.

HOLLENBACH, E; SCHULZ, C.; LEHNERT, H. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4hydroxyphen-ethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures. **Life Sci**, Oxford, v. 63, p. 737-750, 1998.

HOLMES, J.C.; SCHNEIDER, F.H. Pentobarbitone inhibition of catecholamines secretion. **Brit. J. Pharmacol.**, London, v.16, p. 205-213, 1973.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**, Oxford, v. 33, p. 825-858, 1995.

ISMAIL, M.; EL ASMAR, M.F.; OSMAN, O.H. Pharmacological studies with scorpion (*Palamneus gravimanus*) venoms: evidence for the presence of histamine. **Toxicon**, Oxford, v. 13, p. 49-56, 1975.

ISMAIL, M.; FATANI, A.J.; DABEES T.T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors. **Toxicon**, Oxford, v. 30, p. 1257-1279, 1992.

ISMAIL, M.; GHAZAL, A.; EL-FAKAHANI, E.E. Cardiovascular effects of venom from the scorpion *Buthus occitanus Amoreuxii*. **Toxicon**, Oxford, v. 18, p. 327-337, 1980.

IVERSEN, L.L. Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 41, p. 571-591, 1971.

IVERSEN, L.L.; NEAL, M.J. The uptake of [3H]GABA by slices of rat cerebral cortex. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 15, p. 1141-1149, 1968.

JAMES, A.F.; OKADA, T.; HORIE, M. A fast transient outward current in cultured cells from human pulmonary artery smooth muscle. **Am J Physiol.**, Bethesda, v. 268, p. H2358-2365, 1995.

JOHNSTONE, R.M. Ion-coupled cotransport. **Curr Opin Cell Biol.**, Philadelphia, v. 2, p. 735-41, 1990.

KHVOTCHEV, M.; LONART, G.; SUDHOF, T.C. Role of calcium in neurotransmitter release evoked by alpha-latrotoxin or hypertonic sucrose. **Neuroscience.**, Oxford, v. 101, p. 793-802, 2000.

KISSINGER, P.T.; REFSHAUGE, C.; DREILING, R.; ADAMS, R.N. Electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. **Anal. Lett.**, New York, v. 6, p.465, 1973.

KOESTER, J. Voltage-gated ion channels and the generation of the action potential. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (Ed.). **Principles of Neural Sciences**, 3 rd. ed, Connecticut, Appleton & Lange, p. 104-118, 1991.

KRISHNA MURTHY, K.R.; The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The physiological basis of the role of insulin in scorpion envenoming. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v. 6 , p. 4-51, 2000.

KROGSGAARD-LARSEN, P.; FROLUND, B.F.; FALCH, E. Inhibitors of gamma-aminobutyric acid transport as experimental tools and therapeutic agents. **Methods Enzymol.**, New York, v. 296, p.165-75, 1998.

KRSTULOVIC, A.M. Investigations of catecholamines metabolism using high performance chromatography: analitical methodology and clinical applications. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 229, p. 1, 1982.

- KRSTULOVIC, A.M.; POWELL, A.M. Use native fluorescence measurements and stopped-flow scanning technique in the high-performance liquid chromatography analysis of catecholamines and related compounds. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 171, p. 345-356, 1979.
- KRUEGER, B.K.; BLAUSTEIN, M.P.; RATZLAFF, R.W. Sodium channels in presynaptic nerve terminals. Regulation by neurotoxins. **J Gen Physiol.**, New York, v. 76, p. 287-313, 1980.
- KUHAR, M.J.; ZARBIN, M.A. Synaptosomal transport: a chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds. **J Neurochem.**, Oxford, v. 31, p. 251-256, 1978.
- KUKULJAN, M.; LABARCA, P.; LATORRE, R.; Molecular determinants of ion conduction and inactivation in K⁺ channels. **Am. J. Physiol.**, Washington, v. 268, p. C535-C556, 1995.
- KVETNANSKÝ, R.; GOLDSTEIN, D.S.; WEISE, V.K.; HOLMES, C.; SZEMEREDI, K.; BAGDY, G.; KOPIN, I.J. Effects of Handling or Immobilization on Plasma Levels of 3,4-Dihydroxyphenylalanine, Catecholamines and Metabolites in Rats. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 58, p. 2296-2302, 1992.
- LANDON, C.; SODANO, P.; CORNET, B.; BONMATIN, J.M.; KOPEYAN, C.; ROCHAT, H.; VOVELLE, F.; PTAK, M. Refined solution structure of the anti-mammal and anti-insect LqIII scorpion toxin: comparison with other scorpion toxins. **Protein**, New York., v. 28, p. 360-374, 1997.
- LANGLEY, K.; GRANT, N.J. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? **Neurochem Int.**, Oxford, v. 31, p. 739-57, 1997.
- LEGROS, C.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. Les toxines de venins de scorpions. **Bull. Soc. Zool. Fr.**, Paris, v. 124, p. 127-137, 1999.
- LEVIEL, V. The reverse transport of DA, what physiological significance ? **Neurochem Int.**, Oxford, v. 38, p. 83-106, 2001.
- LIPKIND, G.M.; FOZZARD, H.A. A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K⁺ channels. **J. Membr. Biol.**, New York, v.158, p. 187-196, 1997.
-

LIPPENS, G. NAJIB, J., WODAK, S.J.; TARTAR, A. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. **Biochemistry**, Washington, v. 34, p. 13-21, 1995.

LOURENÇO, W.R.; VON EICKSTEDT, V.R.D. Escorpiões de importância médica. In :**Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.C.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr., V. (Eds)., São Paulo: Sarvier, p. 182-197, 2003.

MACDONALD I.A; LAKE D.M An improved technique for extracting catecholamine from body- fluids, **J. Neurosci Methods**, Amsterdam, v.13, p.239-248, 1985.

MAGALHÃES, M. PEREIRA, M.; AMARAL, C.F.; REZENDE, N.; CAMPOLINA, D. Serum levels of cytokines in patients envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 1155-1164, 1999.

MAGER, S.; KLEINBERGER-DORON, N.; KESHET, G.I.; DAVIDSON, N.; KANNER, B.I.; LESTER, H.A. Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. **J Neurosci.**, Washington, v. 16, p. 5405-5414. 1996.

MARANGONI, S.; GHISO, J.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, B.; FRANGIONE, B. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **J. Protein Chem.**, New York, v.9 n.5, p. 595-601, 1990.

MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; DA SILVA, C.A.; CARNEIRO, E.M.; GONÇALVES, A.A.; OLIVEIRA, B. Amino acid sequence of TsTX, an α -toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K^+ permeability of β -cells from isolated rat islets of Langerhans. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1243, p. 309-314, 1995.

MARCOTTE, P.; CHEN, L.Q.; KALLEN, R.G.; CHAHINE, M. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin γ on voltage-gated Na^+ channels. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 80, p. 363–369, 1997.

MARQUES, M.P.; COELHO, E.B.; DOS SANTOS, N.A.; GELEILETE, T.J.; LANCHOTE, V.L. Dinâmics and kinetic disposition of nisoldipine enantiomers in hypertensive patients presenting with type-2 diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 58, p. 607-614, 2002.

MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; COURAUD, F.; Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In: CHANG, L.W., DYER, R.S. (Ed.), **Handbook on Neurotoxicology**, New York, Marcel Dekker, p. 683-716, 1995.

MASSENSINI, A. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; GOMEZ, M.V. Sodium channel toxins and neurotransmitter release. **Neurochem Res.**, New York, v. 28, p. 1607-1611, 2003.

MASSENSINI, A.R.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. **Neuropharmacology.**, Oxford, v. 37, p. 289-297, 1998.

MATTHEWS, G; VON GERSDORFF. Calcium dependence of neurotransmitter release. **Neuroscience**, Oxford, v. 8, p. 329-334, 1996.

MEBS, D. **Venomous and Poisonous Animals: a handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists**. Stuttgart, Medpharm GmbH Scientific Publishers, 2002, 339 p.

MENEZ, A.; ONTEMS, F.; ROUMESTAND, C.; GILQUIN, B.; TOMA, F. Structural basis for functional diversity of animal toxins. **Proc. R. Soc. Edinburgh**, Edinburgh, v. 99B, p. 83-103, 1992.

MEVES, H.; SIMARD, J.M.; WATT., D.D. Interactions of scorpion toxins with the sodium channels. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 479, p. 113-132, 1986.

MILLER, C. Shaker shakes out potassium channels. **Trends Neurosci.**, Cambridge, v. 11, p.185-186, 1988.

MILLER, G.W.; GAINETDINOV, R.R.; LEVEY, A.I.; CARON, G.M. Dopamine transporters and neuronal injury. **Trends. Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 20, p. 424-429, 1999.

MINISTÉRIO BRASILEIRO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, Brasil. 1998.

MIRANDA, D.M.; ROMANO-SILVA, M.A.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; MORAES-SANTOS, T.; DE MARCO, L.; PRADO, M.A.; GOMEZ, M.V. Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. **Brain Res Bull.**, New York, v. 54, p. 533-536, 2001.

MIRANDA, F.; KUPEYAN, C.; ROCHAT, H.; ROCHAT, C.; LISSITZKY, S. Purification of animal toxins, isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* (Hector), *Buthus occitamus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 16, p. 514-523, 1970.

MITROVIC, N.; GEORGE, A.L. Jr.; HORN, R. Independent versus coupled inactivation in sodium channels. *Role of the domain 2, S4 segment*. **J. General. Physiol.**, New York, v. 111, p. 451-462, 1998.

MOHAMED, A. H. Notes on the toxin of egyptian scorpion. **Biochem. J.**, Londres, v. 38, p. 284 - 285, 1944.

MOREL, J.L.; HUGUES, M. Contribution des toxines peptidiques à l'approche pharmacologique de la diversité des canaux calciques. **C. R. Soc. Biol.**, Paris, v. 192, p. 549-566, 1998.

MORRISSETTE, J.; BEURG, M.; SUKHAREVA, M.; CORONADO, R. Purification and characterization of ryanotoxin, a peptide with actions similar to those of ryanodine. **Biophys J.**, Bethesda, v. 711, p. 707-721, 1996.

MOSS, J.; KAZIC, T.; HENRY, D.P.; KOPIN, I.J. Scorpion venom induced discharge of catecholamines accompanied by hypertension. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 54, p. 381-385, 1973.

NARAHASHI, T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 54, p. 813-889, 1974.

NENCIONI, A.L.; CARVALHO, F.F.; LEBRUN, I.; DORCE, V.A.; SANDOVAL, M.R. Neurotoxic effects of three fractions isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 86, p. 149-155, 2000.

NENCIONI, A.L.A.; LEBRUN, I.; DORCE, V.A.C. A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v. 74, p. 455-463, 2003.

NICOLATO, R.; FERNANDES, V.M.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, R.S.; PRADO, M.A.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. Release of gamma- $^{(3)}\text{H}$ aminobutyric acid in rat brain cortical slices by alpha-scorpion toxin. **Neurosci Lett.**, Limerick, v. 325, p. 155-158, 2002.

NOVELLO, J.C.; ARANTES, E.C.; VARANDA, W.A.; OLIVEIRA, O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. TsTX-IV, a short chain four-disulfite-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca^{+} -activated K^{+} channels. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 651-660, 1999.

OHIZUMI, Y. Application of physiologically active substances isolated from natural resources to pharmacological studies. **Jpn. J. Pharmacol.**, Kyoto, v. 73, p. 263-289, 1997.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GARCIA, B.I.; LOPEZ-GONZALEZ, I.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; ULENS, C.; TYTGAT, J.; FELIX, R.; DARSZON, A.; POSSANI, L.D. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca^{2+} and Na^{+} channels. **Biochem Biophys Res Commun.**, San Diego, v. 29, p. 562-568, 2002.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; GURROLA, G.B.; POSSANI, L.D.; A novel structural class of K^{+} -channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. **Biochem J.**, London, v. 315, p.977-981, 1996.

OLIVERA, B.M.; CRUZ, L.J. Conotoxins, in retrospect. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 7-14, 2001.

OMRAM, MAA; ABDELRAHMAN M.S.; NABIL, Z.I. Effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* (H and E) venom on rats herat-rate and blood pressure. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 61, p. 111-121, 1992.

PETERSON, N.A.; RAGHUPATHY, E. Developmental transitions in uptake of amino acids by synaptosomal fractions isolated from rat cerebral cortex. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 21, p. 97-110, 1973.

PEULER, J.D.; JOHNSON, G.A. Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. **Life Sci.**, Oxford, v. 21, n.5, p.625-36, 1977.

PINHEIRO, C.B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, Copenhagen, v. 59, p. 405–415, 2003.

POLIKARPOV, I.; MATILDE-JUNIOR, M.S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; TEPLYYAKOV, A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. **J. Mol. Biol.**, London, v. 290, p. 175–184. 1999.

POPPER, C.W.; CHIUEH, C.C.; KOPIN, I.J. Plasma catecholamine concentrations in unanesthetized rats during sleep, wakefulness, immobilization and after decapitation. **J Pharmacol Exp Ther.**, Bethesda, v. 202, p.144-8, 1977.

POSSANI, L.D.; ALAGÓN, A.C.; FLETCHER JR., P.L.; ERICKSON, B.W. Purification and properties of mamalian toxins form the braziliam scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello). **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 180, p. 394-403, 1977.

POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur. J. Biochem**, Berlin, v. 264, p. 287-300, 1999.

POSSANI, L.D.; MARINO, E.; CORONA, M.; BOLYVAR, F.; BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, Paris, v. 82, p. 861–868, 2000.

POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; MOCHCA-MORALES, J.; SUENDSEN, I. Purification and chemical characterization of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello). **Carlsberg Res. Commun.**, Copenhagen, v. 46, p. 195-205. 1981.

POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; SUENDSEN, I.; RODE, G.S.; ERICKSON, B.W. Toxins from the brazilian scorpion venom *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello): primary structure and sequence comparison by metric analysis. **Biochem. J.**, Londres, v. 229, p. 739-750, 1985.

POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; SVENDSEN, I. The primary structure of noxiustoxin: a potassium channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **Carlsberg Res. Commun.**, Copenhagen, v. 47, p.285-289, 1982.

POSSANI, L.D.; SELISKO, B.; GURROLA, G. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channel. In DARBON, H.; SEBATIER, J.M. (Ed.) **Perspective in Drug Discovery and Design** v. 15/16, Holland, Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 15-40.

QUIGNARD, J.F.; RYCKWAERT, F.; ALBAT, B.; NARGEOT, J.; RICHARD, S. A novel tetrodotoxin-sensitive Na⁺ current in cultured human coronary myocytes. **Circ Res.**, Baltimore, v. 80, p. 377-382, 1997.

RADHA KRISHNA MURTHY, K.; VAKIL, A.E. Elevation of plasma angiotensin levels in dogs by Indian red scorpion (*B. tamulus*) venom and its reversal by administration of insulin and tolazoline. **Ind. J. med. Res.**, Bombay, v. 88, p. 376-379, 1988.

RAGSDALE, D.S.; MCPHEE, J.C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. **Science**, Washington, v. 265, p. 1724-1728, 1994.

REISFIELD, R.A.; LEWIS, W.J.; WILLIAMS, D.F. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, Londres, v. 195, p. 281-283, 1962.

RHOADS, D.E.; PETERSON, N.A.; SANKARAN, H.; RACHUPATHY, E. Inhibitory effects of scorpion venom on the uptake of amino acids by synaptosomes and synaptosomal membrane vesicles. **Biochemical Pharmacol.**, Oxford, v. 31, p. 1875-1879, 1982.

RINK, T.J.; MONTECUCCO, C.; HESKETH, T.R.; TSIEN, R.Y. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 595, p. 15-30, 1980.

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

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C.; POSSANI, L.D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon**, Oxford, v. 46, p. 831-844, 2005.

ROE, W.W; LEMASTERS, J.J.; HERMAN, B. Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 11, p.63-73, 1990.

ROGERS, J.C., QU, Y.; TANADA, T.N.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Molecular determinants of high affinity binding of α -scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular in domain IV of the Na⁺ channel α -subunit. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, p. 15950–15962, 1996.

ROGOWSKI, R.S.; KRUEGER, B.K.; COLLINS, J.H.; BLAUSTEIN, M.P. Tityustoxin K α blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by α -dendrotoxin in synaptosomes. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.**, New York, v. 91, p. 1475-1479, 1994.

ROMANO-SILVA, M.A.; RIBEIRO SANTOS, R.; GOMEZ, M.V.; MORAES-SANTOS, T.; BRAMMER, M.J. Tityustoxin-mediated Na⁺ influx is more efficient than KCl depolarization in promoting Ca⁺² dependent glutamate release from synaptosomes. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 199, p. 90-92, 1994.

ROSSI, D.J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. **Nature**, Basingstoke, v. 403 p. 316-21, 2000.

RUDNICK, G.; CLARK, J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1144, p. 249-263, 1993.

SALGADO, A.H.; PRADO, M.A.; MORAES-SANTOS, T.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. Tityustoxin-induced release of ATP from rat brain cortical synaptosomes. **Neurosci Lett.**, Limerick, v. 229, p. 113-116, 1997.

SAMPAIO, S. V.; COUTINHO-NETO, J.; ARANTES, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; GIGLIO, J. R. TsTX-VII, a new toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom able to induce the release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes not blocked by tetrodotoxin. **Biochem. Mol. Biol.**, Sydney, v. 41, n.6, p. 1255-63, 1997.

SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPPO NETO, F.; GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T₁IV (TsTX-III) and T₂IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, Oxford, v.29, p.663-72, 1991.

SAMPAIO, S.V.; COUTINHO-NETO, J.; ARANTES, E.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. **Biochem. Biol. Int.**, London, v. 39, p. 729-740, 1996.

SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic protein from the venoms of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* . **Toxicon**, Oxford, v. 21, p. 265-277, 1983.

SANDOVAL, M.R.; DORCE, V.A. Behavioural and electroencephalographic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**, Oxford, v. 2, p. 205-212, 1993.

SCOPES, R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Anal. Biochem.**, New York, v. 59, p. 277, 1974.

SHEETS, M.F.; KYLE, J.W.; KALLEN, R.G.; HANCK; D.A. The channel voltage sensor associated with inactivation is localized the external charged residues of domain IV, S4. **Biophys. J.**, Bethesda, v. 77, p. 747-757, 1999.

SHINJOH, M.; NAKAKI, T.; OTSUKA, Y.; SASAKAWA, N.; KATO, R. Vascular smooth muscle contraction induced by Na⁺ channel activators, veratridine and batrachotoxin. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v. 205, p.199-202, 1991.

SIEGEL, G.J. **Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, 220 p.

SIMARD, J.M.; WATT, D.D. Venoms and Toxins. In: **The Biology of Scorpions**. POLIS, G.A.(Ed). Standford: Standford Univ. Press, p. 414-444, 1990.

SMEDES F, KRAAK JC, POPPE H Simple and fast solvent-extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine **J.Chromatogr.**, Amsterdam, v.231, p. 25-39, 1982.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARDNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J., KLEN, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 150, p. 76-85, 1985.

SOFER, S ; GUERON, M. Vasodilators and hypertensive encephalopathy following scorpion envenomation in children. **Chest.**, Chicago, v. 9, p. 118-120, 1990.

SONDERS, M. S.; AMARA, S. G. Channel transportes. **Curr. Op. Neurobiol.**, London, v. 6, p. 294-302, 1996.

SOROCEANU, L.; GILLESPIE, Y.; KHAZAEI, M.B. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 58, p. 4871-4879, 1998.

STAMPE, P.; KOLMAKOVA-PARTENSKY, L.; MILLER, C. Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. **Biochemistry**, Washington, v. 33, p. 443-450, 1994.

STIER, C.; SKORKA, G.; SOHR, R.; OTT, T. Time course and role of extracellular Ca²⁺ in veratridine-induced glutamate release. **Neuroreport.**, London, v.7, p. 401-404, 1996.

SUN, Y.M.; BOSMAN, F.; ZHU, R. H.; GOUDET, C.; XIONG, Y.M.; TYTGAT, J.; WANG, D.C. Importance of conserved aromatic residues in the scorpion α -like toxin BmK M1: The hydrophobic surface region revisited. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, p. 24125-24131, 2003.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. New York, junho, p. 12-18, 1998.

TAKENAKA T, KANNO Y, KITAMURA Y, HAYASHI K, SUZUKI H, SARUTA T Role of chloride channels in afferent arteriolar constriction. **Kidney Int** v.50, p.864-872, 1996.

TAMMARO, P.; CONTI, F.; MORAN, O. Modulation of sodium current in mammalian cells by an epilepsy-correlated beta 1-subunit mutation. **Biochem Biophys Res Commun.**, San Diego, v. 291, p. 1095-1101, 2002.

TEIXEIRA JR., A.L.; FONTOURA, B.F.; FREIRE-MAIA, L.; MACHADO, C.R.S.; CAMARGOS, E.R.S.; TEIXEIRA, M.M. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 703-709, 2001.

TEIXEIRA, C.E.; BENTO, A.C.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; TEIXEIRA, S.A.; VON EICKESTEDT, V.; MUSCARÁ, M.N.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrenergic nerve fibres., **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v. 123, p. 435-442, 1998.

TERLAU, H.; STÜHMER, W. Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels, **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 85, p. 437-444, 1998.

TERLAU, H; HEINEMANN, S.H.; STUHMER, W.; PUSCH, M.; CONTI, F.; IMOTO, K.; NUMA, S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 293, p. 93-96, 1991.

TOLEDO, D. V.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Londres, v. 55B, p. 249-253, 1976.

TRENDELENBURG, U, The TIPSA lecture: Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. **Trends Pharmacol. Sci**, London, v.12, p.334-337, 1991.

TSUNODA, M.; TAKEZAWA, K.; YANAGISAWA, T.; KATO, M.; IMAI, K. Determination of catecholamines and their 3-O-methyl metabolites in mouse plasma. **Biomed Chromatogr.**, London, v. 15, p. 41-44, 2001.

TSUNODA, M.; TAKEZAWA, K.; SANTA, T.; IMAI, K. Simultaneous automatic determination of catecholamines and their 3-O-methyl metabolites in rat plasma by high performance liquid chromatography using peroxyolate chemiluminescence reaction. **Anal. Biochem.** New York, v. 269, p. 386-392, 1999.

TYTGAT, J.; CHANDY, K.G.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; VAN DER WALT, J.J.; POSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. **Trends in Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 20, p.444-447,1999.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FDA, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH; **Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies**, USA, 1998.

UHL, G.R. Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. **Ann Neurol.**, New York, v. 43, p. 555-560, 1998.

VALDÍVIA, H.; POSSANI, L.D. Peptide toxins as proes of Ryanodine receptor. **Trends Cardiovascular Med.**, New York, v. 8, p. 111-118, 1998.

VAN RENTERGHEM, C.; LAZDUNSKI, M. A new non-voltage-dependent, epithelial-like Na⁺ channel in vascular smooth muscle cells. **Pflugers Arch.**, Berlin, v. 419, p. 401-408, 1991.

VAN VLIET, B.N.; CHAFE, L.L.; ANTIC, V.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; MONTANI, JP. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, v. 44, p. 361-373, 2000.

VANDENBERG, R.J. Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Victoria, v. 25, p. 393-400, 1998.

VASCONCELOS, F.; SAMPAIO, S.V.; GARÓFALO, M.A.R.; GUIMARÃES, L.F.L.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 385-392, 2004.

WANG, C.G.; GILLES, N.; HAMON, A.; LE GALL, F.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; XIONG, Y.M.; WANG, D.C.; CHI, C.W. Exploration of the functional site of a scorpion α -like toxin by site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, Washington, v. 42, p. 4699-4708, 2003.

WANG, R.; MOREAU, P.; DESCHAMPS, A.; DECHAMPLAIN, J.; SAUVE, R.; FOUCART, S.; BAI, L.; LU, X.R. Cardiovascular effects of *Buthus martensii* (kirsch) scorpion venom. **Toxicon**, Oxford, v. 32, p. 191-200, 1994.

WANG, S.Y.; WANG, G.K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. **Cell Signal.**, Oxford, v.15, p.151-159, 2003.

WATT, D.D. Biochemical studies of the venoms from the scorpion *Centuroides sculpturatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 2, p. 171-180, 1964.

WATT, D.D.; SIMARD, J.M. Neurotoxic proteins in scorpion venom. **J. Toxicol.Toxin Rev.**, New York, v. 3, pp.181-221, 1984.

WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. **Biometrics**, Washington, v. 9, p. 249-263, 1952.

WHITTAKER, V.P. Thirty years of synaptosome research. **J.Neurocytol.**, Boston, v. 22, p. 735-742 1993.

WILSON, W.H. The phisiological action of scorpion venom. **J. Physiol.**, Londres, v.31, p. 48-59, 1904.

WOOD, A.T.; HALL, M.R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection. **J.Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 744, p.221-225, 2000.

WORRALL, D.M.; WILLIAMS, D.C. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. **Biochem J.**, London, v. 297, p. 425-436, 1994.

YU, F.H.; WESTENBROEK, R.E.; SILOS-SANTIAGO, I.; MCCORMICK, K.A.; LAWSON, D.; GE, P.; FERRIERA, H.; LILLY, J.; DISTEFANO, P.S.; CATTERALL W.A.; SCHEUER, T.; CURTIS, R. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. **J Neurosci.**, Washington, v. 23, p. 7577–7585, 2003.

ZAMUDIO, F.Z.; CONDE, R.; ARÉVALO, C.; BECERRIL, B.; MATIN, B.M.; VALDIVIA, H.H.; POSSANI, L.D. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272, p. 11886-11894, 1997b.

ZAMUDIO, F.Z.; GURROLA, G.B.; ARÉVALO, C.; SREEKUMAR, R.; WALKER, J.W.; VALDIVIA, H.H.; POSSANI, L.D. Primary structure and synthesis of imperatoxin A (IpTxa), a peptide activator of Ca^{2+} release channels/ryanodine receptors. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.405, p. 385-389, 1997a.

ZEGHAL, K.; SOUHIR, S.; GUINOT, M.; RICHER, C.; GIUDICELLI, J.F. Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 14, p. 351-361, 2000.

ZHANG, Z., HUANG, J. M. C., TURNER, M. R., RHINEHART, K. L., PALLONE, T. L. Role of chloride in constriction of descending vasa recta by angiotensin II. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, Washington, v.280, p.R1878-R1886, 2001.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M.; WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, Oxford, dec 29, 2005 (in press).

ZHU, S.; HUYS, I.; DYASON, K.; VERDONCK, F.; TYTGAT, J. Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. **Proteins**, New York, v. 54, p. 361-70, 2004.

ZILBERBERG, N.; GORDON, D.; PELHATE, M.; ADAMS, M.E.; NORRIS, T.; ZLOTKIN, E.; GUREVITZ, M. Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p. 10215-10222, 1996.

ZLOTKIN, E. Chemistry of animal venoms, **Experientia**, Basel, v.29, p.1453-1588, 1983.

ZLOTKIN, E.; EITAN, M.; BINDOKAS, V.P.; ADAMS, M.E.; MOYER, M.; BURKHART, W.; FOWLER, E. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. **Biochemistry**, Washington, v. 30, p. 4814-4821, 1991.

ZUCKER, R.S. Exocytosis: a molecular and physiological perspective. **Neuron**, Cambridge, v. 17, p.1049-1055, 1996.