UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização estrutural e funcional
da Ts15, uma nova neurotoxina da peçonha do
escorpião *Tityus serrulatus***

Camila Takeno Cologna

RIBEIRÃO PRETO

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização estrutural e funcional da Ts15,
uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião**

Tityus serrulatus

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Camila Takeno Cologna

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

Co-Orientador: Prof. Dr. Wamberto A. Varanda

Ribeirão Preto

2010

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

Cologna, Camila Takeno

Isolamento e caracterização estrutural e funcional da Ts15,
uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*,
Ribeirão Preto, 2010.

136 p.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Toxicologia

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. *Tityus serrulatus*. 2. Canais para potássio. 3. Neurotoxina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Takeno Cologna

Isolamento e caracterização estrutural e funcional da Ts15, uma nova neurotoxina do escorpião *Tityus serrulatus*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

Co-orientador: Prof. Dr. Wamberto A. Varanda

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Adauto e Maria Helena,
e irmãos, Alexandre e Patrícia.*

Acaso

*Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho,
pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho,
mas não vai só, nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.
Essa é a maior responsabilidade de nossas vidas,
e a prova que duas almas não se encontram por acaso.*

(Antoine Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Acredito que a concretização de uma tese de doutorado não seja uma conquista solitária, mas sim o resultado de 4 anos de trabalho em equipe. Acredito também que além da pesquisa em si, o bom resultado deste trabalho dependeu das nossas boas colaborações e contatos na Academia, e principalmente de nossa vivência extra-universitária. São estes que na hora do aperto te apóiam, na hora da queda te levantam e na hora da conquista, festejam.

Por diferentes motivos e razões, gostaria de agradecer:

À minha família, que me agüentaram esses últimos dias de intenso stress com paciência e que sempre me apoiaram ao longo de toda vida. Ao meu pai, que é “banca” deste trabalho há 4 anos, desde quando a tese era só um projeto. À minha mãe, a revisora atenta de todas vírgulas, espaços e formatações fora do lugar e aos meus irmãos Ale e Pat, que mesmo sem entender nada do trabalho, procuraram me ajudar no que fosse possível.

À Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes, minha orientadora, por incentivar o meu aprendizado, pelas discussões e correções, por compartilhar seu conhecimento, pelas exigências e puxões de orelha que me fizeram crescer científico e pessoalmente, e principalmente por confiar no meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Wamberto Varanda, por todas as críticas, discussões e exigências que me fizeram crescer como pesquisadora.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxinas Animais, Cris Bregge, Fer, Carol, Matheus Baldo, Empadinha, Cuco, Veri, Dani, Wellington, Marcos, Jamilly, pelo convívio ao longo desses 4 anos.

Aos amigos do LCP, Cris, Paty, Matos, Tortinha, Jô e Ricardo, pela intensidade, pelas longas discussões, pelas pizzas e experimentos até tarde da noite, pela resolução de todos os problemas alheios na casa da prof, pelos cafés, pelos almoços, enfim, por todo apoio e grande amizade.

Às técnicas do laboratório Flávia e Karlinha, por todo apoio e disponibilidade.

Aos professores Antônio Cardoso dos Santos e Wagner Ferreira dos Santos, pela colaboração e disponibilização de seus laboratórios.

Ao professor José Cesar Rosa, pelos experimentos e ensinamentos sobre espectrometria de massa.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Membrana, Melina, Ricardo, Artur, e principalmente à dupla Fernandinho e Roberta, que me ajudaram a entender e realizar os experimentos de eletrofisiologia nas horas de trabalho e, nas horas vagas, me ajudaram a “filar o café” do Departamento.

Ao professor Dr. Jan Tytgat e ao Laboratório de Toxicologia por me receber tão bem em seu país e por provar que a Bélgica não é tão fria como parece. Em especial aos amigos que fiz nessa jornada, Ste, Marijke, Elia, Bert, Anelees, Ruth, Coralie, Sarah, Dieter e Eva.

À minha família belga, formada por uma combinação de nacionalidades e que tornaram a minha estadia longe de casa mais fácil e muito mais divertida. Em especial, Adrian e Gabi.

À Jan Piessens, uma pessoa que após muitos encontros e desencontros, me fez questionar todas minhas escolhas e decisões, meus sentimentos e razões.

Aos amigos Re (Xuxu), Jô, Manú e Felipe, Namy e Gusta, Dri, Bá e Dani (Udia). Cada um a sua maneira com idéias, conselhos, ombros, lista de afazeres e programações, estiveram sempre ao meu lado, mesmo quando a distância nos separava.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para realização deste trabalho.

*"Compreender as coisas que nos rodeiam
é a melhor preparação para compreender o que há mais além "
(Hipátia)*

RESUMO

COLOGNA, C. T. **Isolamento e caracterização estrutural e funcional da Ts15, uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. 2010. 136f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os escorpiões são um dos grupos de animais mais antigos da Terra. Eles são artrópodes e pertencem a classe Arachnida e Ordem Scorpionida. A família Buthidae compreende as espécies responsáveis pelos acidentes graves em humanos, incluindo a espécie *Tityus serrulatus*, o maior responsável por esses acidentes no Brasil. A peçonha do *T. serrulatus* contém diversas neurotoxinas que agem especificamente em canais para sódio, potássio e cálcio da membrana plasmática de células excitáveis, causando massiva liberação de neurotransmissores. As toxinas escorpiônicas podem ser usadas como ferramentas nos estudos de estrutura e função desses canais iônicos sensíveis a voltagem e também no estudo de liberação e captação de neurotransmissores. As toxinas escorpionicas específicas para canais para sódio sensíveis a voltagem são as principais responsáveis pelos efeitos do envenenamento por estes artrópodes e podem ser classificadas em duas classes: toxinas α e β . As α -toxinas retardam a inativação desses canais induzindo assim um prolongamento na fase de repolarização do potencial de ação. As β -toxinas alteram a dependência de voltagem de ativação dos canais para sódio para potenciais mais negativos provocando potenciais de ação espontâneos e repetitivos. As toxinas específicas para canais para potássio (KTx) são geralmente peptídeos pequenos e de caráter básico, formados por 23-43 aminoácidos estabilizados por 3-4 pontes dissulfeto. As KTx são classificadas em 4 subfamílias: α , β , γ , K. Neste trabalho, uma nova neurotoxina do escorpião *T. serrulatus* foi isolada e caracterizada bioquímica e funcionalmente. A toxina foi testada em ampla variedade de canais incluindo 5 subtipos de canais para sódio (Na_v1.4; Na_v1.5; Na_v1.6; Na_v1.8 e DmNa_v1) e 12 diferentes tipos de canais para potássio (K_v1.1 a K_v1.6; K_v2.1; K_v3.1; K_v4.2; K_v4.3; *Shaker* IR e hERG). A peçonha bruta solúvel foi fracionada em cromatografia de troca iônica em coluna CM-Celulose-52 (2,5 cm x 63 cm), previamente equilibrada e eluída com tampão NH₄HCO₃ (pH 7,8). Essa primeira etapa cromatográfica permitiu

a separação de 13 frações nomeadas de I – XIII. A fração X foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em que a toxina pura Ts15 pode ser obtida. Seu sequenciamento amino-terminal demonstrou que esse peptídeo possui 36 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 pontes dissulfeto. A massa molecular obtida por espectrometria de massa foi de 3956 e o pI predito pelo programa ProtParam foi de 8,86, no entanto, o pI determinado por focalização isoeletrica foi maior que 9,3. Os experimentos de eletrofisiologia utilizando as técnicas *patch clamp* e *two microelectrode voltage clamp* mostraram que a toxina Ts15 bloqueia preferencialmente os subtipos de canais para potássio K_v1.2 e K_v1.3 com IC₅₀ de 196 ± 25 nM e 508 ± 67 nM respectivamente. Os ensaios de captação de neurotransmissores em sinaptosomas de cérebro de rato foram realizados adicionando ³H-GABA e ³H-Glu na presença e ausência de diferentes concentrações da toxina Ts15. Não foram observados efeitos nos canais para sódio em todas as concentrações testadas assim como na captação do GABA. Porém, foi observado aumento significativo na captação do glutamato em todas as concentrações testadas, provavelmente como resultado de efeito secundário da ação da Ts15 em canais para potássio sensível a voltagem. Em conclusão, a Ts15 pode ser considerada um autêntico novo tipo de toxina escorpionica, com afinidade para canais para potássio K_v1.2 e K_v1.3 e capaz de aumentar a captação de glutamato. Essa toxina é o único membro da nova subfamília α-Ktx21 e portanto nomeada α-Ktx21.1

Palavras chave: Peçonha, *Tityus serrulatus*, neurotoxinas escorpionicas, canais iônicos, subfamília α-Ktx, captação de neurotransmissores.

ABSTRACT

COLOGNA, C. T. **Isolation and structural and functional characterization of Ts15, a new neurotoxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus***. 2010. 136f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Scorpions are one of the most ancient groups of animals on earth. They are arthropods and belong to the class Arachnida and Order Scorpionida. The Buthidae family comprises the species that are really dangerous for human, including *Tityus serrulatus* that is responsible for most severe accidents in Brazil. *T. serrulatus* venom contains several neurotoxins that specifically act on sodium, potassium or calcium channels in excitable membranes, causing a massive release of neurotransmitters and leading to the stimulation of the autonomic nervous system. Since ion channels play important roles in many physiological processes, scorpion toxins have been used as tools for studies of the neurophysiological mechanisms involving voltage-gated ion channels and neurotransmitter release/uptake. Voltage-gated Na⁺ channel (Na_v channel) toxins are mainly responsible of the harmful effects of scorpion venom and can be classified into two classes: α and β -neurotoxins. The α -toxins retard Na_v channel inactivation and induce a prolongation of the repolarization phase of the action potential. The β -toxins shift the voltage dependence of Na_v channel activation to more negative potentials that result in an increased tendency of the cell to fire spontaneously and repetitively. Voltage-gated potassium channel toxins (KTxs) are basic short chain peptides comprising 23-43 amino acid residues that can be cross-linked by 3 or 4 disulfide bridges. KTxs are classified into four large families: α , β , γ and κ . These peptides display varying selectivity and affinity for different K_v channel subtypes. In this work, a novel toxin from the *T. serrulatus* venom was isolated, biochemistry and pharmacologically characterized using a wide electrophysiological screening on 5 different subtypes of Nav channels (Na_v1.4; Na_v1.5; Na_v1.6; Na_v1.8 and DmNa_v1) and 12 different subtypes of K_v channels (K_v1.1 - K_v1.6; K_v2.1; K_v3.1; K_v4.2; K_v4.3; *Shaker* IR and hERG). The crude soluble *T. serrulatus* venom was fractionated by ion exchange chromatography on a CM-cellulose-52 column (2.5 cm x 63.0 cm), which was equilibrated and eluted with NH₄HCO₃ buffer (pH 7.8). This

chromatography allowed the separation of 13 fractions which were named I to XIII. Fraction X was submitted to a reverse-phase C18 (0.46 cm x 25 cm) high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the pure toxin, Ts15, could be obtained. The amino acid sequence of this novel peptide showed that it contains 36 amino acids and is cross-linked by 3 disulfide bridges. The molecular mass of Ts15 (3956) was obtained by electrospray (ESI) triple-quadrupole mass spectrometry and its pI value (8,86) was predicted by ProtParam program. However, the pI determined by isoelectric focusing was greater than 9,3. Electrophysiological experiments using patch clamp and the two electrode voltage clamp technique, showed that Ts15 preferentially blocks $K_v1.2$ and $K_v1.3$ channels with IC₅₀ value of 196 ± 25 and 508 ± 67 nM, respectively. Uptake assays were performed by adding ^3H -GABA and ^3H -Glu, in the absence (controls) or presence of different concentrations of Ts15, on isolated rat brain synaptosomes. No effect on Nav channels was observed, in all tested concentrations, as well as for GABA uptake. However, Ts15 induced a significant increase of the glutamate uptake, probably as a secondary effect of its action on K_v channels. In conclusion, Ts15 can be considered a bonafide novel type of scorpion toxin that presents high affinity by $K_v1.2$ and $K_v1.3$ channels and was able to increase the glutamate uptake. It is the unique member of the new α -Ktx21 subfamily and therefore was named α -Ktx21.1.

Keywords: *Tityus serrulatus* venom; scorpion neurotoxins; ion channels; α -Ktx subfamily; neurotransmitter uptake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Foto ilustrativa do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	04
Figura 02 - Arranjo transmembrana da subunidade α dos canais para sódio...	11
Figura 03 - Arranjo transmembrana da subunidade α dos canais para sódio evidenciando os principais sítios de interação com toxinas.....	13
Figura 04 - Desenho esquemático de uma subunidade α - do canal para potássio.	17
Figura 05 - Desenho esquemático da configuração <i>Whole cell Patch clamp</i> ...	34
Figura 06 - Protocolo de voltagem utilizado para registros das correntes de sódio de células GRD	35
Figura 07 - Isolamento e preparação dos oócitos de <i>Xenopus laevis</i>	37
Figura 08 - Protocolo de voltagem utilizado para registros das correntes de potássio e sódio de oócitos de <i>X. laevis</i>	39
Figura 09 - Perfil cromatográfico do PTs em CM-celulose-52 em pH 7.8	44
Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas das frações obtidas na cromatografia da Pts.....	45
Figura 11 - Perfil cromatográfico da fração X em cromatografia de alta eficiência	46
Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes da fração X.....	46
Figura 13 - Resultado do sequenciamento N- terminal da toxina por sequenciador automático de proteínas	47
Figura 14 - Perfil cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos peptídeos trípticos reduzidos e alquilados	49
Figura 15 - Resultado do sequenciamento do peptídeo tríptico correspondente ao pico 13	49
Figura 16 - Perfil do sequenciamento do peptídeo tríptico correspondente ao pico 17	49
Figura 17 - Resultado do sequenciamento N- terminal da toxina por sequenciador automático de proteínas.....	50

Figura 18 - Alinhamento sequencial entre a toxina Ts15 e as toxinas do escorpião	52
Figura 19 - Cladograma das toxinas do escorpião <i>T. serrulatus</i>	53
Figura 20 - Espectro do dicroísmo circular da Ts15.....	53
Figura 21 - Focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida 5%.....	54
Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular.....	56
Figura 23 - Gráfico do Log da massa molecular dos padrões pela respectiva distância de migração	56
Figura 24 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular.....	57
Figura 25 - Gráfico do Log da massa molecular dos padrões pela respectiva distância de migração	57
Figura 26 - Espectro de massa da amostra Ts15	59
Figura 27 - Espectro de massa da amostra Ts15 após redução com DTT e alquilação com iodoacetamida.....	59
Figura 28 - Ação da toxina Ts15 na concentração de 1 μ M na amplitude da corrente de sódio de células de mamífero	61
Figura 29 - Ação da toxina Ts15 na concentração de 5 μ M na amplitude da corrente de sódio de células de mamíferos	61
Figura 30 - Ação da toxina Ts15 na concentração de 10 μ M na amplitude da corrente de sódio de células de mamíferos	61
Figura 31 - Efeito da toxina Ts15 (1 μ M) na constante de tempo de inativação de correntes de sódio de células de mamíferos	62
Figura 32 - Efeito da toxina Ts15 (5 μ M) na constante de tempo de inativação de correntes de sódio de células de mamíferos	62
Figura 33 - Efeito da toxina Ts15 (10 μ M) na constante de tempo de inativação de correntes de sódio de células de mamíferos	62
Figura 34 - Efeito da toxina Ts15 (500nM) nas isoformas de canais para sódio	64
Figura 35 - Efeito da Ts15 (500nM) nas várias isoformas de canais para potássio testadas.....	67

Figura 36 - Efeito da toxina Ts15 (500 nM) nas diferentes isoformas do canal para potássio sensível a voltagem (subfamília <i>Shaker</i>)	68
Figura 37 - Efeito da toxina Ts15 (500 nM) nas diferentes isoformas do canal para potássio sensível a voltagem	69
Figura 38 - Curva dose-resposta para o bloqueio dos canais $K_v1.3$ e $K_v1.2$ pela Ts15	70
Figura 39 - Relação corrente contra voltagem dos canais $K_v1.2$ e $K_v1.3$	70
Figura 40 - Gráfico de dependência de voltagem para canais $K_v1.2$ e $K_v1.3$	71
Figura 41 - Gráfico da reversibilidade de bloqueio dos canais $K_v1.2$ e $K_v1.3$...	71
Figura 42 - Efeito da toxina Ts15, em diferentes concentrações, na captação do glutamato	72
Figura 43 - Efeito da toxina Ts15, em diferentes concentrações, na captação do glutamato	73
Figura 44 - Efeito da toxina Ts15, em diferentes concentrações, na captação do GABA	73
Figura 45 - Alinhamento da toxina Ts15 com um membro de cada classe de toxinas da família alfa-Ktx.....	90
Figura 46 - Árvore filogenética das toxinas escorpiônicas específicas para canais para potássio sensíveis à voltagem (K_v)	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequenciamento completo da toxina	50
---	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Carboximetil
DEMEM	dulbeco's modified eagle medium
DRG	Gânglios da raiz dorsal
FDA	Food and drugs administration
GABA	ácido- γ -aminobutírico
KTx	Potássio Toxina
K_v	Canal para potássio sensível a voltagem
Na_v	Canal para sódio sensível a voltagem
PTS	Peçonha <i>Tityus serrulatus</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ts	<i>Tityus serrulatus</i>
TsTx	<i>Tityus serrulatus</i> toxina

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
°C	Grau (s) Celsius
cm	Centímetro(s)
cpm	Cintilações por minuto
g	Gramas/Gravidade
GΩ	Gigaohms
h	Horas
kDa	QuiloDalton(s)
kHz	Quilohertz
kvolts	Quilovolt(s)
L	Litro(s)
μL	Microlitro(s)
μg	Micrograma(s)
μM	Micromolar
M	Molar
mA	Miliamperer(s)
MΩ	Megaohm(s)
mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
min	Minuto (s)
ms	Milisegundo(s)
mM	Milimolar
mV	Milivolt(s)

nM	Nanomolar
nm	Nanômetro(s)
pA	Picoampere(s)
pF	Picofaraday
pH	Potencial hidrogeniônico
pl	Ponto isolétrico
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundo(s)
V	Volt(s)
V_{max}	Velocidade máxima
UV	Ultravioleta
W	Watt(s)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

Animais como serpentes, aranhas e escorpiões apresentam toxinas em sua peçonha, que têm sido amplamente estudadas e que podem apresentar uma grande aplicabilidade terapêutica. Esses animais têm despertado interesses de biólogos, bioquímicos e farmacologistas, levando-os a estudar a composição de suas peçonhas e o mecanismo de ação das mesmas, com o intuito de utilizá-las como ferramenta para a compreensão de diversos fenômenos biológicos e para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para os envenenamentos. Outros estudos têm desenvolvido sintéticos de toxinas isoladas da peçonha de vários animais, tornando-se medicamentos utilizados na terapia de muitas enfermidades como diabetes, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares, o que confirma a importância dos estudos dos componentes destas peçonhas para o homem (LEWIS e GARCIA, 2003). Como exemplo desses sintéticos de toxinas, tem-se o peptídeo SNX-111, análogo do peptídeo ω -conotoxina MVIIA, isolado da peçonha do caracol marinho *Conus magnus*, que é utilizado como potente analgésico (cerca de mil vezes mais potente que a morfina) em pacientes com câncer e AIDS e em espasmos severos decorrentes de lesões medulares (MILIJANICH, 1997; PENN & PAICE, 2000; RIDGEWAY *et al.*, 2000). Este novo princípio ativo foi aprovado em julho de 2000 pelo FDA (EUA) com o nome comercial de Ziconotide®. O fármaco captopril (Capoten®) da indústria Bristol-Myers Squibb, sintetizado a partir de um peptídeo isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* nos anos sessenta, é um dos medicamentos mais utilizados em todo o mundo para o tratamento de hipertensão arterial e pós-infarto do miocárdio. Outro fármaco utilizado, no tratamento de casos de trombose, é o eptifibatide (Integrilin®), sintetizado a partir da barbourina, isolada da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbouri* (SCARBOROUGH *et al.*, 1991).

1.2. Os escorpiões

Os escorpiões são artrópodes pertencentes à classe Arachnida e ordem Scorpionida e representam um dos grupos mais antigos da terra, contando com mais de 400 milhões de anos de evolução. Atualmente, são representados por 650 espécies divididas em apenas 7 famílias (MELLO-LEITÃO, 1945; BUCHERL, 1979; SISSOM, 1990). Do ponto de vista epidemiológico, a família Buthidae tem despertado maior interesse já que a ela pertence a maioria das espécies que podem causar mortes em humanos.

No Brasil, aproximadamente 10.000 casos de picadas por escorpião em humanos são tratados por ano nos hospitais. A maioria destes acidentes é causada por escorpiões do gênero *Tityus*, pertencente à família Buthidae, sendo que a espécie *Tityus serrulatus* figura em primeiro lugar na lista destes acidentes sendo responsável pela maioria dos casos fatais, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (CAMPOS *et al.*, 1980).

Tityus serrulatus (Fig. 1) (LUTZ e MELLO, 1922), conhecido popularmente por escorpião amarelo, chega a medir de 6 a 7 centímetros de comprimento quando adulto. Possui o tronco marrom-escuro, com patas, pedipalpos e cauda amarela. Na face dorsal dos segmentos distais da cauda, apresenta uma serrilha, formada por pequenos dentes, conferindo o nome *serrulatus* à espécie. Escorpiões desta espécie se reproduzem por partenogênese, com gestação de aproximadamente 3 meses, nascendo em média, 10 filhotes por ninhada (LOURENÇO, 1994).

Figura 1 - Escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*
Fonte: Laboratório de Toxinas animais

O ferrão do escorpião *T. serrulatus* localiza-se na extremidade do metassoma, ou cauda, como é conhecido popularmente. O último anel abdominal, chamado telson, constitui a base do ferrão e contém a vesícula, onde estão os pares de glândulas responsáveis por produzir e armazenar a peçonha do escorpião (Fig. 1). A vesícula tem forma globular e vai se afunilando até terminar em um espinho curvo, denominado acúleo, semelhante a uma agulha hipodérmica, oco e muito fino. Cada glândula é ligada por dois canais, a duas aberturas na região final do telson, por onde sai a peçonha.

Embora primitivamente habitante do cerrado e de campos abertos, este escorpião tornou-se bem adaptado à vida urbana, possivelmente em decorrência da rápida e desorganizada colonização do homem das regiões originalmente ocupadas por este animal. As grandes possibilidades de abrigos, como lixos e entulhos, a grande oferta de alimentos, como baratas e outros insetos e a ausência de predadores e competidores, também facilitaram a adaptação e proliferação deste aracnídeo nos ambientes urbanos e nas moradias humanas (BURCHERL, 1979; LIKES *et al.*, 1984).

1.2.1. Peçonha e toxinas escorpiônicas

A composição da peçonha de escorpiões pode variar dependendo da área habitada e dos hábitos alimentares (WATT e SIMARD, 1984). Em geral, é constituída de muco, mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, moléculas de baixo peso molecular como serotonina e histamina, inibidores de proteases, liberadores de histamina, aminoácidos entre outros compostos orgânicos e neurotoxinas (GWEE *et al.*, 1995).

As neurotoxinas presentes nas peçonhas de escorpiões têm como objetivo biológico o ataque e a imobilização de presas, mas também desempenha papel importante na defesa contra predadores (BOSMANS e TYTGAT, 2007). Essas neurotoxinas são os componentes mais importantes da peçonha de escorpiões e afetam os mecanismos de permeabilidade iônica de membranas excitáveis através da interação específica com canais para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- (ISMAIL, 1995; POSSANI *et al.*, 1999).

As primeiras tentativas de isolar e caracterizar estes componentes ativos da peçonha de escorpião se iniciaram em 1944, por MOHAMED. Neste trabalho o autor descreve os primeiros métodos para purificação e caracterização de toxinas de escorpiões egípcios (MOHAMED, 1944). Desde então, várias metodologias foram sendo introduzidas.

MIRANDA e colaboradores, em 1970, propuseram um método geral para purificação de toxinas. Neste, foram isoladas 11 toxinas dos escorpiões *Androctonus australis*, *Buthus occitanus tunetanus* e *Leiurus quinquestriatus*, sendo elas consideradas ativas para mamíferos, insetos e crustáceos. A purificação destes componentes ativos consistiu de uma extração da peçonha com água destilada, eliminando nesta etapa mucoproteínas, que poderiam prejudicar os próximos passos

da purificação. A seguir, o extrato foi submetido a uma filtração em coluna Sephadex G-50, seguida de mais duas cromatografias de troca iônica (catiônica e aniônica) (MIRANDA *et al.*, 1970).

O escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, tem sido extensivamente estudado e muitas de suas toxinas já foram isoladas e caracterizadas. Os trabalhos pioneiros com esta espécie foram realizados na década de 50 e 60 (DINIZ e GONÇALVES, 1956, 1960, GOMEZ e DINIZ, 1966). COUTINHO NETTO (1975) purificou e caracterizou a Tityustoxina, fração parcialmente caracterizada por GOMEZ (1966), combinando extração por amônia, filtração em Sephadex G-50 e cromatografia de troca iônica em resina CM-celulose-52. ARANTES e colaboradores (1989) desenvolveram uma metodologia para a 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 treze frações protéicas (I- XIII), das quais a XIII foi considerada pura. A caracterização química desta fração mostrou que a mesma é igual à toxina γ , isolada por POSSANI e colaboradores em 1977, e agora denominada Ts1 (COLOGNA *et al.*, 2009), sendo a toxina mais abundante da peçonha de *T. serrulatus* e a de maior toxicidade (ARANTES *et al.*, 1989).

Até a presente data, foram isoladas e bem caracterizadas 14 diferentes toxinas da peçonha de *T. serrulatus* (COLOGNA *et al.*, 2009). A toxina Ts1, citada acima é amplamente estudada por diversos grupos de pesquisa. Apresenta 61 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária e age especificamente em canais para sódio de mamíferos e insetos sendo considerada uma β -toxina (BARHANING *et al.*, 1982, 1983, 1984). Sua estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia de Raio X e revelou um domínio bem conservado formado por uma alfa-hélice e folhas beta estabilizados por pontes dissulfeto (POLIKARPOV *et*

al.,1999). A Ts2 possui 62 aminoácidos e compartilha 72% de identidade com a Ts1. Apesar da proximidade entre as estruturas primárias das duas toxinas, a Ts2 é classificada como α -toxina escorpiônica (SAMPAIO *et al.*, 1991), assim como a Ts3, caracterizada primariamente por KIRSCH e colaboradores (1989). Esta toxina foi descrita ainda com efeitos na liberação de neurotransmissores em preparações *in vitro* e *in vivo* MASSENSINI *et al.*, 1998).

A toxina Ts5 corresponde 2% da peçonha solúvel. Estudos eletrofisiológicos mostraram que essa toxina prolonga o potencial de ação de fibras do nervo vago de coelho sendo considerada também uma α -toxina (ARANTES *et al.*, 1994). Entre outros efeitos, foi relatada ainda a inibição da captação de GABA e dopamina na presença dessa toxina (CECHINI *et al.*, 2006).

As toxinas Ts6, Ts7, Ts8 e Ts9 são específicas para canais para potássio e cada uma exercendo diferente afinidade para os diversos subtipos de canais existentes. A resolução da estrutura tridimensional desses peptídeos demonstraram que os mesmos compartilham o mesmo motivo estrutural, constituído de uma alfa-hélice e folhas beta estabilizados por até 4 pontes dissulfeto. (BLAUSTEIN *et al.*, 1991; ROGOWSKI *et al.*,1994; LEGROS *et al.*, 1996; NOVELLO *et al.*,1999)

Na peçonha de *T. serrulatus* foi encontrada ainda um peptídeo não tóxico, já que este não foi capaz de induzir os sintomas típicos causados por outras toxinas escorpiônicas. Tal peptídeo foi denominado Ts4 e embora considerado não tóxico, induziu reações alérgicas, lacrimação, espasmos em experimentos conduzidos com ratos, além de liberação de neurotransmissores em preparações sinaptosomais (MARANGONI *et al.*,1990; SAMPAIO *et al.*, 1996).

Os peptídeos Ts10 e Ts14, isolado por FERREIRA e colaboradores (1993) e VERANO-BRAGA e colaboradores (2008), respectivamente, foram caracterizados

com atividade potenciadora da bradicinina. A sequência primária da Ts10 apresenta apenas 13 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 1603,7 e pI de 6.12.

As toxinas Ts11, Ts12 e Ts13, foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente por PIMENTA e colaboradores (2003). Apesar das sequências de aminoácidos relacioná-las com toxinas que agem em canais para potássio, a função dessas toxinas ainda não foi bem elucidada.

Além dessas toxinas já citadas, foi evidenciada a presença de hialuronidases e proteases na peçonha de *T. serrulatus*. As hialuronidases são enzimas consideradas não tóxicas, mas funcionam como fator de espalhamento por permitir a difusão de outras toxinas nos diversos tecidos contribuindo assim pelo envenenamento local e sistêmico (POSSANI *et al.*, 1977; PESSINI *et al.*, 2001). ALMEIDA e colaboradores (2002) descreveram a presença de enzimas proteolíticas com atividade gelatinolítica na peçonha de *T. serrulatus*. BERTAZZI (2007) demonstrou ainda a presença de proteases capazes de ativar o sistema complemento, podendo exercer papel importante nos processos inflamatórios.

Apesar da quantidade de toxinas isoladas e caracterizadas ter aumentado significativamente nos últimos anos, este número ainda é pequeno. Estima-se que o total de toxinas diferentes produzidas pelas diversas espécies de escorpiões existentes pelo mundo seja na ordem de 100.000, destes, apenas 1% são conhecidas (GAZARIAN *et al.* 2005). Visto a escassez de conhecimento comparado com a quantidade de toxinas existentes, a importância do estudo de toxinas escorpiônicas se torna evidente.

1.2.2. Aspectos clínicos do envenenamento escorpiônico e tratamento

Os sintomas do envenenamento escorpiônico se iniciam logo após a picada, tendo sido relatados desde dores locais a alterações sistêmicas graves. As manifestações clínicas podem ser classificadas como: leves, quando são observadas somente manifestações locais, com dor em todos os casos; moderadas, quando são observadas além de manifestações locais, algumas manifestações sistêmicas como agitação, sonolência, sudorese, náuseas, vômitos, hipertensão arterial, taquicardia e taquipnéia; e graves, quando ocorrem manifestações sistêmicas como alterações do eletrocardiograma, tremores, espasmos, edema agudo de pulmão e choque, sendo que, em casos extremos, a vítima pode chegar ao coma e à morte (FREIRE e MAIA CAMPOS, 1989).

O tratamento consiste na observação das manifestações clínicas para todos os casos e administração do soro antiescorpiônico para os casos moderados e graves. A eficácia do tratamento está diretamente relacionada com a rapidez em que o soro é administrado, uma vez que este neutraliza apenas as toxinas circulantes. (REZENDE *et al.*, 1998). Foi verificado melhora das condições do paciente após a administração do soro, porém, alterações cardiorrespiratórias causadas por toxinas já absorvidas podem persistir por longo tempo (CUPO *et al.*, 1994).

1.3. Canais iônicos e toxinas escorpiônicas

Canais iônicos sensíveis à voltagem são componentes cruciais para a atividade das células. Trata-se de proteínas integrais de membrana que permitem a passagem seletiva de íons Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e são responsáveis pela geração e propagação de sinais elétricos em neurônios e outras células excitáveis.

Os canais iônicos sensíveis à voltagem mudam sua conformação para aberto, fechado ou inativado, em função da voltagem da membrana, permitindo assim, um movimento rápido de íons específicos a favor de seu gradiente eletroquímico. Desta forma, correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, resultando na despolarização ou hiperpolarização de sua membrana (CATTERALL, 1984).

A despolarização da membrana pode desencadear um ou uma série de potenciais de ação que são conduzidos pelo axônio até o terminal nervoso causando liberação de neurotransmissor na fenda sináptica e excitação do neurônio seguinte ou de células efetoras tais como o músculo esquelético (CATTERALL, 1984).

Toxinas que interagem seletivamente com canais para Na^+ , K^+ , Cl^- , ou Ca^{2+} têm sido utilizadas como ferramenta para o estudo das propriedades biofísicas e estruturais destes canais iônicos, além de permitir a identificação dos vários tipos de canais existentes e o papel fisiológico dos mesmos em diferentes células (HILLE, 1992). Essas toxinas podem ser utilizadas também para o isolamento de canais e para o estudo de sua distribuição (LOMBET e LAZDUNSKI, 1984; LAZDUNSKI, 1986). As mais conhecidas são aquelas específicas para canais para sódio, como a Ts1, do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* (POSSANI *et al.*, 1999) e canais para potássio (TYTGAT *et al.*, 1999), como as dendrotoxinas, isoladas das serpentes do gênero *Dendroaspis*. No entanto, peptídeos que reconhecem canais para cálcio e cloreto também têm sido descritos, como a Imperitoxina A, isolada do escorpião *Pandinus imperator* (VALDIVIA *et al.*, 1992; DeBIN *et al.*, 1993, ZAMUDIO *et al.*, 1997).

1.3.1. Canais para sódio sensíveis a voltagem e toxinas escorpiônicas

Os canais para sódio são proteínas transmembrana responsáveis pelo aumento dependente de voltagem na permeabilidade deste íon, iniciando assim

potenciais de ação de células excitáveis. Estes canais consistem em um poro formado por uma subunidade α , de aproximadamente 250 kDa, que pode estar associada com subunidades β auxiliares ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), em mamíferos (CATTERALL, 2000), e subunidade TipE em canais para sódio de insetos (LEE *et al.*, 2000). A subunidade α é formada por 4 domínios homólogos (I-IV), cada um contendo 6 segmentos transmembrana (S1-S6) conforme ilustrado na Figura 2. O segmento S4 contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina e histidina) e atua como sensor de voltagem para ativação do canal (Fig. 2). Já a inativação é mediada por uma alça intracelular que conecta os domínios III e IV (CESTÈLLE e CATTERALL, 2000), em particular uma sequência curta de aminoácidos hidrofóbicos denominada sequência IFM, formada pelos resíduos de aminoácidos de isoleucina, fenilalanina e metionina (YU e CATTERALL, 2003).

Figura 2 – Arranjo transmembrana da subunidade α dos canais para sódio. Os segmentos formadores do poro estão representado em vermelho; os sensores de voltagem em amarelo e o portão de inativação em azul. Fonte Cestèle e Catterall, 2000.

Foram identificadas 9 isoformas de canais para sódio sensíveis à voltagem em células de mamíferos denominados, $\text{Na}_v1.1$ – $\text{Na}_v1.9$. Estas isoformas apresentam mais de 50% de identidade em sua sequência de aminoácidos e se diferenciam pelos padrões de expressão durante o desenvolvimento e pela localização no sistema nervoso (GOLDIN, 2001; BOSMANS e TYTGAT, 2007)

A relativa similaridade eletrofisiológica das isoformas dos canais para sódio reflete no fato que estes canais desempenham importante papel na despolarização da membrana durante o potencial de ação. As diferenças sutis existentes, porém, resultam em condutâncias únicas e específicas para cada subtipo celular, e determina importantes efeitos fisiológicos para o organismo (GOLDIN, 2001).

Além dos canais para sódio sensíveis à voltagem de células de mamíferos já conhecidos, também foram identificados canais para sódio em células de insetos. A subunidade α dos canais para sódio de mamíferos e insetos é conservada em relação à sequência de aminoácidos, estrutura e organização topológica (LOUGHNEY *et al.*, 1989). Os canais para sódio de insetos têm despertado grande interesse, já que o entendimento do seu funcionamento e a descoberta de moléculas capazes de interagir com os mesmos podem levar ao desenvolvimento de novos inseticidas (ARNON *et al.*, 2005 e ZLOTKIN *et al.*, 2000).

Os canais para sódio são alvos moleculares para vários grupos de toxinas que atuam alterando significativamente a função do canal. Essa ação acontece através da ligação específica a sítios receptores do canal. Foram identificados 6 diferentes tipos de sítios receptores (Fig.3) nos canais para sódio sensíveis à voltagem (CESTÈLE e CATTERAL, 2000)

Figura 3 – Arranjo transmembrana da subunidade α dos canais para sódio evidenciando os principais sítios de interação com toxinas. Sítio 3 (azul) ligam-se α -toxinas escorpionicas e sítio 4 (vermelho) ligam-se as β -toxinas escorpionicas. As setas indicam os sítios 3 (azul) e 4 (rosa), sítios alvos para toxinas escorpionicas. Fonte Cestèle e Catterall, 2000.

As toxinas que afetam os canais para sódio são os principais agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos da peçonha escorpionica. Essas toxinas são consideradas neurotoxinas de cadeia longa e apresentam estrutura secundária altamente conservada, estabilizadas por 4 pontes dissulfeto (POSSANI *et al.*, 1999). Podem ser divididas em dois grupos: α -toxinas e β -toxinas (GORDON *et al.*, 1998; JOVER *et al.*, 1980).

As α -toxinas escorpionicas são uma família de polipeptídios relacionados tanto estruturalmente quanto funcionalmente. São formadas por 60 a 70 aminoácidos estabilizados por 4 pontes dissulfeto. Essas toxinas têm sido classificadas quanto a sua toxicidade específica às células de mamíferos e às células de insetos. Assim, aquelas com maior afinidade aos canais para sódio de células de mamíferos são ditas toxinas α -clássicas, aquelas com maior afinidade aos canais para sódio de insetos são denominadas toxinas α -anti-inseto e aquelas que são capazes de se ligar em ambos os tipos de canais são chamadas toxinas α -like.

As α -toxinas ligam-se ao sítio 3 dos canais para sódio sensíveis à voltagem, diminuindo ou bloqueando o mecanismo de inativação desses canais, prolongando assim a fase de repolarização do potencial de ação, com pouco ou nenhum efeito no processo de ativação (FONTECILLA-CAMPS *et al.*, 1988). As toxinas que agem no sítio 3 previnem o movimento do segmento S4 do domínio IV, uma alteração conformacional necessária para inativação rápida dos canais (CESTÈLLE e CATTERALL, 2000).

A consequência *in vivo* das α -toxinas é o prolongamento do potencial de ação de células excitáveis, desta maneira, essas toxinas podem matar organismos induzindo paralisia e arritmia (BOSMANS e TYTGAT, 2007).

As β -toxinas são formadas de 60 a 65 aminoácidos e ligam-se ao sítio 4 do canal para sódio, alterando a dependência de voltagem de ativação para potenciais mais negativos, provocando assim potenciais de ação espontâneos e contínuos (CESTÈLLE e CATTERALL, 2000).

As diferenças das estruturas e das ações entre α e β -toxinas são extensivamente estudadas, porém as diferenças relacionadas com os efeitos farmacológicos ainda são pouco conhecidas. VASCONCELOS e colaboradores (2005) compararam os efeitos entre α -toxina TsTX-V e a β -toxina TsTX-I da peçonha de *T. serrulatus*. O resultado demonstrou que as diferenças observadas nos efeitos induzidos por essas toxinas podem estar relacionadas com as alterações entre os canais para Na^+ presentes nas diversas inervações.

POLIKARPOV e colaboradores (1999) verificaram que as sequências de aminoácidos de neurotoxinas de cadeia longa são muito similares. Na maioria dos casos as diferenças entre α e β -toxinas não são tão maiores que as diferença entre toxinas que pertencem ao mesmo grupo. A β -toxina Ts1 de *T. serrulatus*, também

conhecida como TsTX-I (ARANTES *et al.*, 1989) possui 44% de identidade com as α -toxinas CsE5 (do escorpião *Centruroides sculpturatus*) e AaH2 (do escorpião *Androctonus australis*). Porém, possui de 38-40% de identidade com β -toxinas CsE1 e CsE3 (ambos do escorpião *Centruroides sculpturatus*).

1.3.2. Canais para potássio sensíveis a voltagem e toxinas escorpiônicas

Os canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_v) 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, dentre outros. São caracterizados pela sua grande diversidade sendo uma família formada por mais de 40 tipos diferentes de canais, classificados em 12 subfamílias de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos (K_v1 – K_v12) (GUTMAN *et al.*, 2005).

Uma de suas subfamílias mais bem estudada é a subfamília K_v1 , também conhecida como *Shaker*. Esta subfamília é codificada por 8 diferentes genes, cada um codificando uma isoforma do canal para potássio ($K_v1.1$ – $K_v1.8$). Estas isoformas são amplamente distribuídas pelo organismo sendo frequentemente encontradas no cérebro ($K_v1.1$ a $K_v1.4$; $K_v1.6$ e $K_v1.8$), sistema nervoso periférico ($K_v1.1$ e $K_v1.2$), coração ($K_v1.1$, $K_v1.2$; $K_v1.4$ a $K_v1.8$), músculo liso ($K_v1.2$ e $K_v1.5$), pâncreas ($K_v1.1$ a $K_v1.3$), pulmão ($K_v1.3$ a $K_v1.7$), rim ($K_v1.5$ a 1.8), retina ($K_v1.1$ e $K_v1.2$) e também células hematopoiéticas, linfócitos e osteoclastos ($K_v1.3$) (MOUHAT *et al.*, 2008). As isoformas $K_v1.1$ a $K_v1.3$ têm chamado a atenção de toxínologistas por serem os principais alvos de toxinas. As isoformas $K_v1.4$ e $K_v1.5$, por outro lado, são consideradas atualmente, alvos orfãos de peptídeos, já que não possuem toxinas ligantes específicas (MOUHAT *et al.*, 2008).

A subfamília K_v2 também conhecida como *Shab* compreende apenas duas isoformas ($K_v2.1$ e $K_v2.2$) e são encontrados principalmente nos neurônios, cérebro, coração, rim, músculo esquelético, pulmão, retina e pâncreas. Não foram encontrados ligantes naturais para essas isoformas entre as toxinas escorpiônicas, destacando-se como ligantes específicos apenas toxinas de aranhas (MOUHAT *et al.*, 2008).

A subfamília *Shaw* ou K_v3 , codificada por 4 genes ($K_v3.1$ - $K_v3.4$) é encontrada principalmente no cérebro e somente para isoformas $K_v3.2$ e $K_v3.4$ foram descritos toxinas seletivas, isoladas de anêmonas do mar. A subfamília *Shal*, ou K_v4 , é representada por apenas 3 isoformas ($K_v4.1$ a $K_v4.3$) localizados essencialmente no cérebro, coração e musculatura lisa. Toxinas de aranhas e de escorpiões foram relatadas como bloqueadores específicos para as 3 isoformas. Para a família KQT (K_v7), codificada por 5 genes, não foi encontrado nenhum ligante natural. (MOUHAT *et al.*, 2008)

As últimas 3 subfamílias funcionais (K_v10 ou *ether-a-go-go*; K_v11 ou *eag-related-gene* e K_v12 , ou *eag-like*) são conhecidas simplesmente como subfamília *Eag*, com isoformas encontradas principalmente no sistema nervoso central. Tais isoformas são poucos elucidadas, com exceção da isoforma $K_v10.1$ ou EAG1, tendo sido relacionadas com processos oncogenéticos. Ligantes naturais derivados de toxinas escorpiônicas tem sido estudadas como bloqueadoras desta última isoforma e também da isoforma $K_v11.1$ ou ERG1 (MOUHAT *et al.*, 2008).

As subfamílias K_v5 , K_v6 , K_v8 e K_v9 não formam canais para potássio funcionais por si só, mas podem formar canais heteromultiméricos com subunidades alfa da subfamília K_v2 .

As subfamílias dos canais K_v são estruturalmente similares, organizando-se em tetrâmeros de 4 subunidades alfas que se unem formando complexos homo ou

heteromultiméricos. Cada subunidade α do canal K_v é análoga a um domínio simples da subunidade α dos canais para sódio e assim como este, também possui 6 segmentos transmembranas (S1-S6) e um *loop* (P) (Fig. 4) altamente conservado localizado entre os segmentos S5 e S6 (CATTERALL *et al*, 2007).

Funcionalmente, os canais para potássio podem ser divididos em duas regiões: uma região sensível a voltagem, que compreende os segmentos transmembranas S1 a S4, que contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente; e uma região formadora do poro condutor, formada pelos segmentos S5 e S6 e pelo *loop* P (CATTERALL *et al.*, 1998). Após a resolução da primeira estrutura cristalográfica do canal para potássio foi possível formular o mecanismo de abertura e fechamento (*gating*) dos mesmos. No modelo proposto, a região C-terminal do segmento S3 e o segmento S4 formam uma estrutura parecida a um remo (*paddle-like structure*), responsável pela abertura e fechamento do canal (DOYLE *et al.*, 1998).

Figura 4 – Desenho esquemático de uma subunidade α do canal para potássio. Estão evidenciados os 6 segmentos transmembrana de uma única subunidade do canal. Fonte: <http://nerve.bsd.uchicago.edu/>

O papel fisiológico e a estrutura de alguns canais para potássio são melhor conhecidos devido a descoberta de toxinas capazes de interagir com alta afinidade e especificidade com as diferentes isoformas dos mesmos. A descoberta da Caribdotoxina, por MILLER e colaboradores em 1985, promoveu um grande aumento de estudos nessa área, já que tal peptídeo se mostrou um excelente modelo para o estudo de função e estrutura do canal para potássio. Para melhor classificação desses novos peptídeos, TYTGAT e colaboradores (1999) agruparam as toxinas específicas para potássio em 4 famílias (α , β , γ e k-toxinas escorpiônicas, abreviadas Ktx). O princípio do agrupamento baseia-se no alinhamento dos resíduos de cisteínas e em outros resíduos altamente conservados. A família α -Ktx, a mais representativa delas, apresenta, atualmente, mais de 120 toxinas, subdivididas em 20 subfamílias.

Toxinas que interagem com os canais para potássio K_v , em geral, são peptídeos compactos, contendo em torno de 38 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 a 4 pontes dissulfeto. Esses peptídeos adotam usualmente um domínio estrutural conservado, conhecido como “motivo $\alpha\beta$ ”. Trata-se de um motivo composto por uma α -hélice ligada à uma fita β -antiparalela através de duas ou três pontes dissulfeto (BONTEMS *et al.*, 1991).

Toxinas que interagem com canais para potássio exercem sua ação de duas formas gerais: ligando-se a porção extracelular do poro condutor, ocluindo assim a passagem dos íons, ou pela modulação da parte sensível à voltagem (GARCIA *et al.*, 1991).

DAUPLAIS e colaboradores (1997) propuseram a existência de um par de aminoácidos chave na estrutura da toxina, importante para interação com canais para potássio da subfamília K_v1 . Tal rearranjo estrutural foi chamado de díade

funcional (“*functional dyad*”) e tipicamente consiste de um resíduo de lisina (Lys) e um resíduo hidrofóbico, usualmente tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) ou leucina (Leu), separados por uma distância de 6-7 Å. De acordo com esses autores, a porção estrutural da toxina que contém o resíduo de lisina, se posiciona dentro do poro do canal, no centro do anel composto por 4 resíduos de aminoácidos, cada um pertencente a uma das 4 subunidades alfa que formam o canal para potássio.

Outros estudos, realizados com a noxiustoxina (do escorpião *Centruroides noxius*) sugeriram, porém, que não só a presença da díade funcional seria necessária para a interação dessa toxina com o canal, mas também outros segmentos da estrutura do peptídeo estariam envolvidos no bloqueio de diferentes subtipos de canais para potássio. No trabalho, um segmento sintético, correspondente à porção α -hélice da noxiustoxina foi capaz de bloquear correntes de potássio de células granulares (FRAU *et al.*, 2001). Este bloqueio também foi verificado com diversas outras toxinas, o que claramente mostrou que a presença da díade funcional nesses peptídeos não foi essencial para o bloqueio do canal.

Todas essas contribuições suportam a idéia de que ao invés do enovelamento tridimensional da proteína, a estrutura primária seria determinante para o grau de reconhecimento e ligação toxina-canal. Neste sentido, apesar das estruturas tridimensionais de diferentes peptídeos apresentarem o mesmo enovelamento, o reconhecimento e a seletividade para os diversos subtipos de canal seriam dependentes de alguns resíduos de aminoácidos, posicionados em pontos específicos da molécula (De LA VEGA e POSSANI, 2004).

Tal seletividade e potência dos derivados de peçonha, além de contribuírem para o melhor entendimento dos mecanismos de funcionamento e estrutura do canal, também são relevantes na avaliação do potencial terapêutico das toxinas para

o tratamento de diversas doenças e alterações clínicas. Algumas toxinas tais como Margatoxina, Kaliotoxina, Dendrotoxina, têm demonstrado efeitos neurológicos benéficos em vários modelos experimentais (JUDGE e BEVER, 2006).

Dentre a grande variedade das neurotoxinas canais-específicas, presentes na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, destaca-se a Tityustoxina-K (Alfa), ou Ts4 (COLOGNA *et al.*, 2009), também conhecida por α -Ktx4.1, pela nomenclatura proposta por TYTGAT e colaboradores (1999). Tal toxina foi relatada como bloqueadora de canais para potássio sensíveis a voltagem. No estudo RODRIGUES e colaboradores (2003) verificaram que 20 nM da Ts4 foi capaz de bloquear 50% das correntes de canais $K_v1.3$. No mesmo estudo os autores verificaram que o bloqueio acontece pela interação da toxina na porção mais externa da região do poro do canal. Essa interação é independente de voltagem e não produz alterações nas propriedades cinéticas do canal (RODRIGUES *et al.*, 2003).

1.4. Neurotransmissão e toxinas escorpiônicas

A neurotransmissão química no sistema nervoso central é um processo constituído de vários eventos que envolvem a síntese e liberação de neurotransmissores, a difusão dos mesmos na fenda sináptica e a ligação a receptores, resultando em alterações das propriedades elétricas das células pós-sinápticas (BAUERFEIND *et al.*, 1995).

Os canais para sódio sensíveis à voltagem são componentes importantes no mecanismo de neurotransmissão. Estes canais desempenham um importante papel na geração de potenciais de ação de neurônios (MASSENSINI *et al.*, 2003). A chegada do potencial de ação no terminal sináptico desencadeia a abertura de canais iônicos sensíveis à voltagem. A consequente despolarização da célula,

resultante do aumento na permeabilidade ao sódio, causa alteração conformacional nos canais para cálcio dependentes de voltagem, tornando-os ativos e, portanto, permeáveis a este íon. O resultado dessa ativação é o influxo maciço de íons cálcio para o interior da célula (BAUERFEIND *et al.*, 1995).

A liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica é um dos eventos celulares desencadeados pelo íon cálcio. Após abertura dos canais para cálcio e influxo do mesmo para o interior da célula, há a mobilização das vesículas sinápticas (LANGLEY e GRANT, 1997). Essas vesículas liberam seu conteúdo (neurotransmissores) na fenda sináptica por exocitose. Uma vez liberados, os neurotransmissores se difundem pela fenda podendo interagir com autorreceptores da membrana pré-sináptica, inibindo sua liberação, ou com receptores pós-sinápticos gerando potenciais pós-sinápticos inibitórios ou excitatórios.

A ação de um neurotransmissor pode ser finalizada por degradação enzimática, por recaptação ou ambos. A recaptação é o processo ativo que retira o neurotransmissor da fenda sináptica, sendo realizada por proteínas transportadoras altamente específicas, presentes em neurônios pré e pós-sinápticos, células gliais, corpos celulares neuronais, 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 (ROSSI *et al.*, 2000).

Existem mais de 100 compostos conhecidos por exercer a função de neurotransmissores. Essa grande variedade de transmissores permite a existência de vários tipos de sinalização entre os neurônios. Usualmente esses neurotransmissores são divididos em dois grandes grupos: os neurotransmissores peptídicos, considerados moléculas relativamente grandes, compostas por 3 a 36

amino ácidos e as pequenas moléculas. Este último grupo é representado principalmente pelas aminas biogênicas como dopamina, serotonina, histamina, e pelos amino-ácidos individuais, como aspartato, glicina, glutamato e GABA (PURVES, 2003).

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais importante e também o mais abundante do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (FONNUM, 1984). É liberado de vesículas sinápticas contidas nos terminais nervosos por exocitose clássica dependente de íons cálcio. A neurotransmissão glutamatérgica está envolvida em diversas funções fisiológicas, como os processos de aprendizagem e a formação da memória (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993). O mecanismo de recaptação do glutamato é fundamental para prevenir sua excitotoxicidade, causada por uma elevação dos seus níveis normais (GEGELASHVILI e SCHOUSBOE, 1997; DANBOLT, 2001), cuja ação descontrolada pode levar à morte neuronal (LENT, 2004).

O GABA (ácido γ -aminobutírico) é o mais predominante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (ENNA e SNYDER, 1975; DELOREY, *et al.*, 1993), encontrado em altas concentrações no encéfalo e na medula espinhal (KROGAARD-LARSEN *et al.*, 1998). O GABA é um neurotransmissor que atua na abertura de canais iônicos de cloreto e essa ação pode ocorrer em nível pré ou pós-sináptico, produzindo efeitos inibitórios. Ele distribui-se por muitas regiões do sistema nervoso central e periférico, participando da regulação de várias funções no SNC.

Neurotoxinas escorpiônicas, por aumentarem a permeabilidade da membrana ao sódio e outros íons, são capazes de induzir ou inibir a liberação e a captação de neurotransmissores de diferentes preparações (NICOLATO *et al.*, 2002). Alguns

trabalhos demonstraram que a toxina TsTX-V, atualmente denominada Ts5 (COLOGNA *et al.*, 2009), classificada como α -toxina, evoca a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de cérebros de ratos (FLETCHER *et al.*, 1996). CECCHINI e colaboradores (2006), verificaram que a toxina TsTX-V é capaz de inibir a captação de dopamina e GABA em preparações de sinaptossomas corticais de ratos. A redução da captação da dopamina e do GABA pode ser devida à despolarização induzida pela entrada de sódio, como consequência de uma ação da toxina TsTX-V nos canais para Na^+ sensíveis à voltagem.

Tendo em vista todas essas ações que as diversas toxinas escorpionicas podem realizar no organismo, sendo por interações com canais para potássio, ou canais para sódio, ou mesmo interações com outros tipos de receptores e alvos, a purificação e a caracterização de novos componentes da peçonha mostra-se de fundamental interesse, tanto para as ciências básicas quanto para o conhecimento aplicado. Interessados no estudo desses peptídeos promissores, nosso laboratório tem, ao longo dos anos, contribuído significativamente para a purificação e caracterização desses ligantes naturais. Neste sentido, o presente estudo apresenta, a purificação, a caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina do escorpião *T. serrulatus*. No mesmo, a toxina foi purificada e submetida a um amplo estudo de caracterização funcional, destacando-se a avaliação de seus efeitos em diversos canais iônicos, tanto de mamíferos quanto de insetos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Purificação e caracterização estrutural e funcional de uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*.

2.2. Objetivos específicos

- Purificar a neurotoxina utilizando, inicialmente, cromatografia de troca catiônica, seguida de cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) com resina C-18.
- Caracterizar a neurotoxina purificada através da determinação da massa molecular, ponto isoeletrico, sequenciamento de aminoácidos, estrutura secundária e estrutura terciária.
- Caracterizar funcionalmente a neurotoxina utilizando técnicas de eletrofisiologia em células que expressam canais para sódio.
- Caracterizar funcionalmente a neurotoxina utilizando técnicas de eletrofisiologia em células que expressam canais para potássio
- Caracterizar o efeito da neurotoxina na captação e liberação de neurotransmissores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peçonha

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* foi extraída por estímulo elétrico do telson do animal no Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), Campus Ribeirão Preto. Após a extração, a peçonha foi liofilizada e armazenada a - 2 °C.

3.2. Preparação da amostra

Amostra de 200 mg da peçonha do escorpião *T. serrulatus* foi suspensa em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,7 a 0 °C. A suspensão foi centrifugada a 10.000 x g, por 30 min a 4 °C, em uma centrífuga Sorvall Biofuge primo R. O sobrenadante foi retirado e ao precipitado foram adicionados mais 2 mL de tampão bicarbonato de amônio. O preparado foi novamente centrifugado. O procedimento foi repetido por mais uma vez. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos e a mistura deixada em repouso por 12 horas a 0 °C, sendo novamente centrifugada a 10.000 x g por 10 min. A seguir, o sobrenadante foi aplicado à coluna descrita a seguir.

3.3. Cromatografia da peçonha de *T. serrulatus* em CM-celulose-52

A cromatografia do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* foi realizada como descrito por ARANTES *et al.* (1989).

Foi utilizado uma coluna de 2,5 cm x 63,0 cm preparada com resina CM-celulose-52 microgranular da *Whatman*. Após o empacotamento da coluna, a mesma foi levada para a câmara fria (4°C) e lavada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH por uma noite, até equilíbrio completo, testado por medida de condutividade. O fluxo foi então regulado para 20,5 mL/h.

O extrato da peçonha bruta foi aplicada à coluna e eluído com bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. Após 270 mL de eluição, iniciou-se um gradiente convexo de concentração de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M a 1,0 M. Foram coletadas frações de 3,0 mL, suas absorvâncias determinadas em 280 nm e plotadas em função do número das mesmas. O valor de concentração do tampão foi obtido experimentalmente, através da medida da condutividade das frações nos tubos.

Após a cromatografia foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para proteínas básicas com as frações obtidas. Após a corrida o gel foi corado com solução corante (0,2 g *brilliant blue* G-250, 50 mL de metanol e 50 mL de água) e descorado com ácido acético 10%.

3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa C-18

A fração X, obtida da cromatografia em CM-celulose-52, foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu 2 x 25 cm) utilizando gradiente de concentração de acetonitrila em TFA 0,1%, em sistema Äkta UPC10, com leitor de UV a 214 nm. A fração X foi dissolvida em TFA 0,1% e acetonitrila 5% e filtrada através de filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore GSWP04700). A amostra foi aplicada à coluna e equilibrada com acetonitrila 5% e ácido trifluoracético 0,1%. Foi realizado um gradiente segmentado de concentração de acetonitrila (0 - 60% acetonitrila e TFA 0,1%). Todas as soluções foram preparadas com água Milli Q e deaeradas.

Após a cromatografia em fase reversa, os picos obtidos foram liofilizados e armazenados. Com uma alíquota dos picos obtidos, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para proteínas básicas. Após a corrida o gel foi corado com

solução corante (0,2 g *brilliant blue* G-250, 50 mL de metanol e 50 mL de água) e descorado com ácido acético 10%.

3.5. Sequenciamento N-terminal

A análise da sequência N-terminal direta dos primeiros 20 resíduos da toxina isolada foi realizada em sequenciador automático de proteínas Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). A sequência foi obtida pelo sequenciamento protéico através do método de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967), que consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. O aminoácido derivado da reação com o fenilisotiocianato (PITC) é convertido em um derivado de feniltioidantoína (PTH-aminoácido) que é então cromatograficamente separado em coluna de fase reversa usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A quantificação e identificação das amostras são realizadas através da comparação com padrão de 25 pmol analisado no início de cada sequenciamento.

3.6. Obtenção dos peptídeos trípticos para sequenciamento total da toxina

Para a realização do sequenciamento total da toxina, a mesma passou por um processo de redução e alquilação a fim de clivar as pontes dissulfeto presentes na toxina e impedir o seu rearranjo. O ditioneitol (DTT) foi utilizado como agente redutor e a iodocetamida como alquilante. A tripsina foi utilizada para obtenção dos peptídeos trípticos. Tais peptídeos foram purificados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Pharmacia (LCC 2252) utilizando uma coluna de fase reversa C-18 (Vydac, diâmetro interno de 0,22 cm e comprimento 25 cm), equilibrada com 0,1% de ácido trifluoacético (TFA). Foi realizado um gradiente de 5

a 70% de acetonitrila e 0,9 % de TFA, por um tempo de 60 minutos. A absorbância foi monitorada em 220 e 280 nm e os peptídeos foram coletados manualmente e armazenados para aplicação no sequenciador automático de proteínas. O seqüenciamento total da proteína foi obtido após sequenciamento dos peptídeos tripticos e análise da sequência amino terminal.

A obtenção dos peptídeos tripticos foi realizada em colaboração com Prof. Dr. José César Rosa, Coordenador do Centro de Química de Proteínas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.7. Análise *in silico*

A sequência obtida foi usada para comparação com sequências depositadas nos principais bancos de dados utilizando os programas FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos foram realizados no programa MultAlin (CORPET, 1988) e CLUSTAL W. A figura referente ao alinhamento foi criada no programa ESPrit (GOUET *et al.*, 1999). A árvore filogenéticas foi construída utilizando o programa MEGA4.0. Parâmetros físico-químicos teóricos foram preditos e analisados pelo programa Protparam (disponível em www.expasy.org).

3.8. Estimativa da massa molecular

A estimativa da massa molecular foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com SCHAGGER e JAGOW (1987), utilizando-se um padrão de massa molecular da Sigma (M3546), para proteínas de baixa massa

molecular. Os componentes do padrão utilizado são: triose fosfato isomerase (26.600 Da), mioglobina de coração de cavalo (17.000 Da), α -lactoalbumina bovina (14.200 Da), aprotinina bovina (6.500 Da), cadeia-B da insulina bovina (3.496 Da) e bradicinina (1060 Da).

3.9. Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O pI da toxina foi determinado por focalização isoelétrica em placa de gel de poliácridamida, segundo modificações do método de VESTERBERG e colaboradores (1972), como descrito por ARANTES colaboradores (1994).

3.10. Determinação da massa molecular

A massa molecular relativa foi determinada por espectrometria de massa em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa, Coordenador do Centro de Química de Proteínas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para a determinação da massa molecular da toxina foi utilizado o espectrômetro de massas eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK), sendo a amostra infundida por uma bomba tipo seringa (Harvard), com fluxo de 0,3 mL/h, em uma fonte de ionização tipo nanofluxo, com capilar de sílica de 50 μ m e submetida a 3,5 kvolts, 40 volts no cone e temperatura de 100 °C. Os espectros de massa em MS1 foram coletados durante 2 minutos com 2,75 seg/scan (acumulado de 43 scans). O espectro resultante de íons multicarregados foi desenvolvido para massa molecular pelo programa MaxEnt1 (MassLynx v.3.3).

3.11. Dicroísmo Circular (CD)

A predição da estrutura secundária da toxina foi realizada em espectrômetro JASCO J-810. O experimento foi realizado com 0,45 mg/mL da toxina em água, utilizando-se cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 0,1cm. As medidas foram realizadas na região do ultravioleta distante (190-250 nm), com sensibilidade igual a 100 mGraus, velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹, largura da banda de 1nm e tempo de resposta de 0,5 segundo. O espectro final é resultado de 16 varreduras. O experimento foi realizado no Laboratório de Biofísica Molecular Sergio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos- USP, com colaboração com o professor Antonio José Costa Filho.

3.12. Medidas eletrofisiológicas em células de mamíferos – Técnica *Patch clamp*

3.12.1. Preparação das células

Ratos machos Wistar de 100 g (aproximadamente 30 dias) foram sacrificados por decapitação para retirada de neurônios do Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) da medula espinal. Após exsanguinação, o canal medular foi aberto longitudinalmente com auxílio de uma tesoura de ponta fina, e os gânglios de toda extensão da medula foram retirados imediatamente e colocados em placas de Petri (35 mm de diâmetro) contendo meio de cultura incompleto (DMEM; penicilina-estreptomicina 1%; HEPES 20 mM; bicarbonato de sódio 2 g/L). As placas de Petri foram mantidas em gelo triturado.

Os gânglios foram lavados três vezes com meio incompleto e o sobrenadante descartado. Após esse procedimento os gânglios foram ressuspensos em uma

solução de collagenase 0,28 U/mL em meio incompleto (5 mg de collagenase para 5 mL de meio) em tubo de centrífuga de 15 mL. Os gânglios foram então incubados por 60 minutos a 37 °C, homogeneizando a cada 15 minutos. Após o período de incubação a solução de collagenase foi retirada e foi acrescentado meio incompleto com 0,25% de tripsina. O material foi colocado em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após esse segundo período de incubação, o material foi centrifugado por 1 minuto a 1000 rpm. O sobrenadante foi retirado e descartado e as células lavadas e ressuspensas em 2 mL de meio completo (DMEM; penicilina-estreptomicina 1%; HEPES 20 mM; bicarbonato de sódio 2 g/L; soro fetal bovino inativado 10%). Procedeu-se a dissociação mecânica das células com pipeta de Pasteur de vidro. O material foi considerado completamente dissociado quando a solução ficou turva. A suspensão de células foi então semeada em lamínulas previamente tratadas com poli-L lisina 0,01% em placas de *Petri* contendo meio de cultura completo transferidas para estufa com atmosfera e temperatura controladas (5% CO₂ a 37 °C). Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar. Os animais foram tratados seguindo os princípios Éticos da Experimentação Animal adotado pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, *Campus* Ribeirão Preto (protocolo nº 07.1.1031.53.6).

3.12.2. Eletrofisiologia

As correntes foram medidas com um amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments), amostradas com um conversor A/D (Digidata 1200-Axon Instruments) controlado por um microcomputador rodando o software Pclamp10 (Axon Instruments). Os dados foram armazenados em disco rígido para posterior análise.

Após a amplificação as correntes iônicas foram filtradas em 5 KHz e adquiridas a uma taxa de 10 KHz.

As correntes de sódio das células GRD foram registradas no modo *whole cell patch clamp*, que consiste na formação de um selo de alta resistência (maior que $1\text{G}\Omega$) entre a micropipeta, conectada a um eletrodo de Ag/AgCl, e a membrana citoplasmática (Fig. 5). A membrana da célula é rompida através da aplicação de uma sucção à pipeta formando uma continuidade física e elétrica entre a solução contida na micropipeta (solução interna) e o citoplasma.

Figura 5 - Desenho esquemático da configuração *Whole cell*.

As micropipetas foram confeccionadas a partir de capilares de vidro borosilicato (B150-86-15 Sutter Instrument, USA), utilizando-se um estirador (modelo P-97 Sutter Instrument, USA), visando uma resistência entre $3\text{--}4\text{ M}\Omega$ quando medida no banho. A resistência em série variou entre $6,0$ e $10,0\text{ M}\Omega$ e foi compensada eletronicamente em até 40%. O potencial de junção entre a solução interna (pipeta) e a externa (banho) foi ajustado no começo do experimento e nenhuma correção adicional foi empregada. As voltagens foram sempre referenciadas ao lado intracelular. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($23 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Um sistema de perfusão, baseado num capilar de vidro com diâmetro ao redor de $150\text{ }\mu\text{m}$ colocado o mais próximo possível da célula, foi utilizado para aplicação das diferentes concentrações de toxina. Os ensaios eletrofisiológicos utilizando a técnica *patch clamp* foram realizados no Laboratório de

Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP -USP, sob a orientação do professor Dr. Wamberto Varanda.

A toxina foi testada em 3 diferentes concentrações 1 μM , 5 μM e 10 μM .

3.12.3. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q e filtradas em filtros com poros de 0,22 μm de diâmetro (Millipore GSWP04700). A solução de banho consistiu de (mM): NaCl 50; NMDG 95; CsCl 5,4; CaCl_2 1,8; Hepes 10; Glicose 5 e CdSO_4 100 μM . O pH (7,4) foi corrigido com NaOH e a osmolalidade foi de 290 – 300 mosm/Kg de H_2O . A solução de pipeta consistiu em (mM): CsF 100; NaCl 10; Hepes 10; EGTA 5; TEACl 40. O pH (7,2) foi corrigido com CsOH e a osmolalidade foi 292 – 295 mosm/ Kg de H_2O .

3.12.4. Protocolo

As células do gânglio da raiz dorsal (GRD) foram mantidas em um potencial de -70 mV (*holding*), brevemente hiperpolarizadas para -100 mV e, em seguida, despolarizadas a potenciais positivos de acordo com a Figura 6 a seguir:

Figura 6 - Protocolo de voltagem utilizado para registros das correntes de sódio de células GRD. As células foram mantidas em um potencial de -70 mV (*holding*). Antes dos pulsos testes foi aplicado um pré –pulso hiperpolarizante de -100 mV por 150 ms. Após este pré-pulso as células foram despolarizadas durante 50 ms para potenciais que variaram de -80 mV a +70 mV. O tempo entre um potencial e outro foi de 5 ms.

3.13. Medidas eletrofisiológicas em oócitos de *Xenopus laevis* – Técnica *Voltage clamp* com dois microeletrodos

Os ensaios eletrofisiológicos utilizando a Técnica *Voltage clamp* com dois microeletrodos foram realizados no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica, coordenado pelo professor Dr. Jan Tytgat.

3.13.1. Isolamento e preparação dos oócitos

Oócitos de *Xenopus laevis* foram isolados através de ovariectomia parcial (Figs. 7A e 7B). Os animais foram anestesiados com tricáína 1 g/L e gelo. Os animais anestesiados foram mantidos em gelo durante toda a cirurgia. Após a retirada dos oócitos, os mesmos foram defoliculados por tratamento com solução de collagenase 2,5 mg/mL em solução ND96- livre de cálcio em pH 7,5 por 1 hora e meia, 15-16 °C. Após o período de tratamento, os oócitos dos estágios V e VI da maturação foram selecionados para posterior injeção do cRNA (Figs. 7C e 7D). Os cRNA transcritos foram sintetizados a partir dos plasmídeos linearizados utilizando kit de transcrição (T7 ou SP6 mMACHINE, Ambion, USA). Os oócitos traduzem o cRNA injetado nas suas respectivas proteínas, que são expressas na membrana celular dos mesmos, podendo então serem utilizados para os ensaios eletrofisiológicos. Foram utilizados os cRNAs dos seguintes subtipos de canais: K_v1.1; K_v1.2; K_v1.3; K_v1.4; K_v1.5, K_v1.6 e *shaker IR*; K_v2.1; K_v3.1; K_v4.2, K_v4.3, hERG, Na_v1.4, Na_v1.5, Na_v1.6, Na_v1.8 e DmNa_v1.

Figura 7 - Isolamento e preparação dos oócitos de *Xenopus laevis*. (A) Exemplar do *Xenopus laevis*. (B) Ovariectomia parcial para retirada dos oócitos. (C) Seleção dos oócitos. (D) Injeção do cRNA dos canais de interesse nos oócitos. Fotos gentilmente cedidas por Eva Cuypers, do Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven.

3.13.2. Eletrofisiologia

As medidas eletrofisiológicas foram conduzidas utilizando a técnica *two-microelectrode voltage clamp*. Os registros foram realizados à temperatura ambiente (18-22°C) utilizando um amplificador Gene Clamp 500 (Axon Instruments, USA) controlados por um sistema de aquisição de dados Clampex9 (Axon Instruments, USA). As micropipetas foram confeccionadas a partir de capilares de vidro (borosilicato WPI 1B120-6) estiradas utilizando um estirador manual WPI. A resistência foi de 0,6 a 1,0 M Ω para os dois eletrodos. As correntes dos oócitos

foram registradas 1-2 dias após a injeção do cRNA, para os canais para potássio, e 3-5 dias após a injeção do cRNA, para os canais para sódio.

A toxina purificada foi testada em uma ampla variedade de subtipos de canais tanto para potássio (subfamília *Shaker*: K_v1.1; K_v1.2; K_v1.3; K_v1.4; K_v1.5, K_v1.6 e *shaker*; Subfamília *Shab*: K_v2.1; Subfamília *Shaw*:K_v3.1; *Shal*: K_v4.2 e K_v4.3 e subfamília EAG: hERG) quanto para sódio (Na_v1.4, Na_v1.5, Na_v1.6, Na_v1.8 e DmNa_v1), na concentração inicial de 500 nM.

3.13.3. Soluções

A solução de banho e perfusão (ND-96) consistiu em mM: NaCl 96; KCl 2; MgCl₂ 2; HEPES 5, CaCl₂ 1.8, pH 7,4 corrigido com NaOH. As micropipetas foram preenchidas com KCl 3M. Os oócitos foram mantidos após injeção do cRNA em solução ND-96 enriquecida com 50mg/L de sulfato de gentamicina.

3.13.4. Protocolo

Os oócitos foram mantidos em um potencial de -90 mv (*holding*) e despolarizados a potenciais mais positivos, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8: Protocolo de pulsos voltagem utilizado para registros das correntes de potássio e de sódio de oócitos de *X. laevis* (A): Protocolo utilizado para isoformas $K_v1.1$; $K_v1.2$; $K_v1.3$; $K_v1.4$; $K_v1.5$; $K_v1.6$. O potencial de membrana do oócitos foram mantidos em um potencial de -90 mV e rapidamente despolarizados para 0 mV, seguindo de uma repolarização para -50 mV. O tempo total do protocolo foi de 1 segundo. (B): Protocolo utilizado para isoforma $K_v3.1$. Oócitos foram mantidos a um potencial de -90 mV, despolarizados a 30 mV, por 500 milissegundos. (C): Protocolo utilizado para isoforma hERG. Os Oócitos foram mantidos a um potencial de -90 mV, despolarizados a 40 mV, por 2,5 segundos, seguido de um potencial de -120 mV, por mais 2,5 segundos. O tempo total do protocolo foi de 5 segundos. (D) : Protocolo utilizado para isoformas $Na_v1.2$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$, $Na_v1.8$ e $DmNa_v1$. Os oócitos foram mantidos a um potencial de -90 mV e despolarizados à 0 mV por 100 ms.

3.14. Ensaios de captação em sinaptossomas corticais de mamíferos

3.14.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250 g), adquiridos no Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, os quais foram acondicionados dois a dois em gaiolas (40x33x15 cm) e mantidos em biotério de manutenção da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes às 7:00 h), temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas. Foi oferecido água e alimentação *ad libitum*. Os animais foram tratados seguindo os princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (protocolo nº 07.1.1031.53.6)

3.14.2 Preparação dos Sinaptossomas de Cérebros de Ratos

A preparação dos sinaptossomas foi realizada como descrito por GRAY e WHITTAKER (1962) modificado por COUTINHO-NETTO (1980) Ratos Wistar machos (200-250 g) foram eutanasiados por decapitação com auxílio de uma guilhotina e sem administração de drogas, para que estas não influenciassem nos resultados dos experimentos. Após decapitação, procedeu-se a retirada do cérebro com auxílio de uma tesoura de ponta fina e assim foram obtidos os córtex cerebrais. Os mesmos foram colocados em solução de sacarose 0,32 M, pH 7,2 e homogeneizados em *Potter* por 3 vezes continuamente. A suspensão obtida foi então centrifugada a 1100 x g (centrífuga Hitachi Himac CF15D2) por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. A solução foi novamente centrifugada a 17.000 x g à 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o

precipitado foi ressuspendido em 3 mL de tampão Krebs-fosfato (NaCl 124mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, CaCl_2 0,75 mM, MgSO_4 1,2 mM, Na_2HPO_4 20 mM, glucose 10 mM, pH 7,4) e centrifugado novamente por 10 minutos a 4°C e 17.000 x g. Esta etapa foi repetida por 5 vezes. A seguir a dosagem de proteínas foi estimada pelo método do biureto. Os sinaptossomas foram diluídos para 1 mg por tubo ou 3,33 mg/mL com tampão Krebs-fosfato. Os sinaptossomas foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e sob agitação leve.

3.14.3 Ensaio de Captação em Sinaptossomas Corticais

O experimento de captação foi iniciado pela adição de L-[^3H]-glutamato e ^3H -GABA (36 nM, concentração final, adquiridos junto à Amersham Pharmacia Biotech, com atividades específicas de 49 e 89 Ci/mmol, respectivamente) à suspensão de sinaptossomas e incubados por 5 minutos a 25°C (experimento para GABA) e 37°C (experimento para Glutamato) na presença de diferentes concentrações da toxina isolada. A reação foi finalizada por centrifugação (17.000 x g, por 3 minutos a 4°C). Após a centrifugação o precipitado foi lavado 2 vezes com água destilada gelada e adicionado 500 μL de TCA (ácido tricloroacético). Foi realizada agitação manual para que o precipitado soltasse do fundo de cada tubo e prosseguiu-se uma nova centrifugação por 3 minutos 17.000 x g a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante (200 μL) foram então transferidas para tubos de cintilação, contendo 1 ml de líquido de cintilação biodegradável miscível em água (ScintiVerse, Fisher Scientific), e suas radioatividades foram quantificadas por um espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman, modelo LS-6800) .

3.15. Análise Estatística

Para os experimentos de eletrofisiologia a significância dos dados foi verificada pelo teste-t de Student. Para os experimentos de captação a significância estatística foi verificada pelo teste ANOVA de uma via, entre as médias $\pm$ erro padrão da média (epm) do controle e de cada ponto experimental, utilizando o programa GraphPad Prism (*GraphPad Software Incorporated*, EUA), versão 4.0, seguido pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, N.; BELGHAZI, M.; ABDEL-MOTTALEB, Y.; TYTGAT, J.; PIERRE, E.B.; MARTIN-EUCLAIRE, M.F. A new Kaliotoxin selective towards $K_v1.3$ and $K_v1.2$ but not $K_v1.1$ channels expressed in oocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V.376, p.525-530, 2008.

ALMEIDA, F.M., PIMENTA, A.M., DE FIGUEIREDO, S.G., SANTORO, M.M., MARTIN-EUCLAIRE, M.F., DINIZ, C.R., DE LIMA, M.E.. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, 40(7), 1041-1045, 2002.

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

ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V. e GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v.8, p.907-16, 1989.

ARANTES, E.C.; RICCIOPPO-NETO, F.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A.; 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.

ARNON, T.; POTIKHA, T.; SHER, D.; ELAZAR, M.; MAO, W.; TAL, T.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J.; BEN-ARIE, N.; ZLOTKIN, E. BjalphalT: a novel scorpion alpha toxin selective for insects – unique pharmacological tool. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v.35, p.187-195, 2005.

BARHANING, J., GIGLIO, J.R., LÉOPOLD, P., SCHMID, A., SAMPAIO, S.V., LAZDUNSKI, M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *Tityus* gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na^+ channel. **J. Biol. Chem.**, 257, 12553-12558, 1982

BARHANING, J., IDELFONSE, M., ROUGIER, O., SAMPAIO, S.V., GIGLIO, J.R., LAZDUNSKI, M. *Tityus* gamma toxin, a high affinity effector of the Na^+ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. **Plugers Archs.**, 400, 22-27, 1984

BARHANING, J., PAURON, D., LOMBET, A., NORMAN, R.I., VIJVERBERG, H.P.M., GIGLIO, J.R., LAZDUNSKI, M. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus* gamma toxin receptor associated with the gating component of the Na^+ channel from rat brain. **EMBO J.**, 2, 915-920, 1983.

BATISTA, C.V.F.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; RODRIGUEZ DE LA VEJA, R.C.; HADJU, P.; PANYI, G.; GÁSPAR, R.; POSSANI, L.D. Two novel toxins from the amazonian

scorpion *Tityus cambridgei* that block $K_v1.3$ and *Shaker B* K^+ channels with distinctly different affinities. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1601, p. 123- 131, 2002.

BAUERFEIND R, DAVID C, GALLI T, MCPHERSON PS, TAKEI K, DE CAMILLI, P. Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** v.60, p.397-404, 1995.

BEAR, .F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Exploring the brain. Ed. Willians and Wilkins, Canada, 1996.

BERTAZZI, D.T. Isolamento e caracterização bioquímica dos componentes da peçonha de *Tityus serrulatus* com ação no sistema complemento. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.2007

BLAUSTEIN, M.P., ROGOWSKI, R.S., SCHNEIDER, M.J., KRUEGER, B.K. Polypeptide toxins from the venoms of old world and new world scorpion preferentially block different potassium channels. **Mol. Pharmacol.**, 40, 932-942, 1991.

BLISS, T.V., COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**;v.361, p.31-39, 1993.

BONTEMS, F.; ROUMESTAND, C.; BOYOT, P.; GILQUIN, B.; DOLJANSKY, Y.; MENEZ, A.; TOMA, F. Three-dimensional structure of natural chacabdotoxin in aqueous solution by 1H -NMR. Charabdotoxin possesses a structural motif found in others scorpion toxins. **European Journal of Biochemistry/FEBS.**feb.26, 196 (1), p.19-28, 1991,

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. **Toxicon.** v. 49, p. 142-158, 2007.

BUCHERL, W. Acúleos que matam. São Paulo, **Revistas dos tribunais**, P.153, 1979.

CAMPOS , J.A.; SILVA, O.S.; LOPEZ, M.; FREIRE-MAIA, L. Signs symptoms and treatment of severe scorpion sting in children. In: **Natural Toxins.** EAKER, D.; WADSTROM, T.; (Eds)., Pergamom Press, Oxford, p. 61-68, 1980.

CAMPOS, F.V.; Mecanismo molecular da ação da Ts3 em canais de sódio dependentes de voltagem. Belo Horizonte, **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

CATTERALL W.A. Structure and Function of voltage-sensitive ion channels. **Science**. Oct 7, 242 (4875), p.50-61, 1998.

CATTERALL, W., A.; CESTELE, S. YAROV-YAROVYOY, V.; YU F.,H.; KONOKI, K.; SCHEUER, T. Voltage-gated ions channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 124-141, 2007.

CATTERALL, W.,A. The molecular basis of neuronal excitability. **Science**. Fev 17, 223 (4637):653- 61, 1984

CATTERALL. W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**. v.26, p. 3-25, 2000.

CECCHINI, A.L., VASCONCELOS, F., AMARA, S.G., GIGLIO, J.R., ARANTES, E.C. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTx-V on neurotransmitter uptake *in vitro*. **Toxicol. Appl. Pharmacol**,v. 217, 196-203, 2006

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

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. **Neuron**,v.1, p.623-634, 1998.

COLOGNA, C.T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, R.J.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein and Peptides Letters**. 16 (8), p. 920-932, 2009.

CORPET, F. multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.22, p. 10881-10890, 1988.

CORZO, G.; PAPP, F.; VARGA, Z.; BARRAZA, O.; ESPINO_SOLIS, P;G;. DE LA VEGA, R.C. R.; GASPAR, R.; PANYI, G.; POSSANI, L.D. A selective blocjer of K_v1.2 and K_v1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruoides suffusus*. **Biochemical Pharmacology**. v. 76, p. 1142-1154, 2008.

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-NETTO, J. Estudo bioquímico em epilepsia: liberação de neurotransmissão in vivo e in vitro com especial referência às ações do glutamato no desencadeamento de epilepsia focal. **Tese de livre docência**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1980.

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; OLIVEIRA, J.S.; HERING, S.E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. Jan-Fev., v.36(1), p. 67-76, 1994.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**. v.65, p. 1-105, 2001.

DAUPLAIS, M.; LECOQ, A.; SONG, J.; COTTON, J.; JAMIM, N.; GILQUIN, B. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel blocking toxins with unrelated structures. **J Biol Chem**. v. 272, p.4302-4309, 1997.

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

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

DELOREY, T.M., KISSIN, I., BROWN, P., BROWN, G.B. Barbiturate-benzodiazepine interactions at the gamma-aminobutyric acid A receptor in rat cerebral cortical synaptoneurosomes. **Anesth Analg**. v.77(3), p.598-605, 1993.

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

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

DOYLE, D.A.; CABRAL, J.M.; PFUETZNER, R.A.; KUO, A.; GULBIS, J.M.; COHEN, S.L.; CHAIT, B.T.; MCKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science**. 280, 69, 1998.

EDMAN P, BEGG G. A protein sequenator. **Eur J Biochem** Mar;1(1), p.80-91, 1967

ENNA, S.J., SNYDER, S.H. Properties of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in the rat brain synaptic membrane fractions. **Brain Res**; v.100, p.81-97, 1975.

FERREIRA, L.A., ALVES, E.W., HENRIQUES, O.B. Peptide T, a novel bradykinin potentiador isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, 31, 941-947, 1993.

FLETCHER PL, FLETCHER M, FAINTER LK, TERRIAN DM. Action of New World scorpion venom and its neurotoxins in secretion. **Toxicon**. Nov-Dec, v.34(11-12), p.1399-411, 1996

FONNUM, F. Glutamate a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**. v.42, p.1-11, 1984.

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.**, v. 85, p. 7443-7447, 1988.

FRAU, A.; PISCIOTTA, M.; GURROLA, G.B.; POSSANI, L.D.; PRESTIPINO, G. Synthetic undecapeptide (NTX 1020) of noxiustoxin blocks completely the I (A) potassium currents of cerebellum granular cells. **European Biophysics Journal**. 29 (8), p. 569-573, 2001.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning, In: **Natural toxins. Characterization, Pharmacology and Therapeutics**. Pergamon Press, Oxford, 1989.

GARCIA, M.L.; GALVEZ, A.; GARCIA-CALVO, M.; KING, V.F.; VAZQUEZ, J.; KACZOROWSKI, G.J. Use of toxins to study potassium channels. **Journal of Bionergetics and biomembranes**. Aug 23, (4), p. 615-646, 1991.

GAZARIAN K.G.; GAZARIAN, T.; HERNANDEZ, R.; POSSANI, L.D. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti venoms vaccines. **Vaccine**. 16,23 (26), p. 3357- 3368, 2005.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. **Mol Pharmacol**. v.52, p.6-15, 1997.

GOLDIN, A.L. Resurgence of sodium channel research. **Annu. Rev. Physiol**. v.63, p. 871-894, 2001.

GOMEZ, M.V., Purificação e caracterização da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*. **Tese de doutorado**. Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1966.

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

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

GORDON, D.; KARBAT, I.; ILAN, N.; COHEN, L.; KAHN, R.; GILLES, N.; DONG, K.; STUHMER, W.; TYTGAT, J.; GUREVITZ, M. The differential preference of scorpion α -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. **Toxicon**, v.49, p. 452-453, 2007.

GOUET, P.; COURCELLE, E. ESPript: multiple sequence alignments in postscript. **Bioinformatics**, v.15, p. 305-308, 1999.

GRAY, E.G.; WHITTAKER, V.P. The isolation of nerve ending from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. **J. anatomy**. V.96, p.79-87, 1962.

GUTMAN, G.,A. CHANDY, K.,G. GRISSMER, S. LAZDUNSKI, M. MCKINNON? D; PARDO, L.,A. ROBERTSON, G.,A. RUDY, B. SANGUINETTI, M.,C. STUHMER, W. WANG, X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacological reviews** v.57, p. 473-5008, 2005.

GWEE, M.C.E.; CHEAH, L.S.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Involvement of the L-arginine-nitric-oxide synthetase pathway in the relaxant responses of the rat isolated anococcygeus muscle to a scorpion (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) venom. **Toxicon**, v. 33, p. 1141-1150, 1995.

HILLE, B. Mechanism of block In: **Ionic Channels of excitable membranes**, Sunderland: Sinauer assoc Inc., p. 390-422, 1992.

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

JOVER, E.; MARTÍN MOUTOT, N.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. **Biochemistry**, v. 19, p. 463-467, 1980.

JUDGE, S. I.V.; BEVER, C.T.; Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal K_v channels and effects of symptomatic treatment. **Pharmacology e Therapeutics**. v. 111, p. 224-259, 2006.

KIRSCH, G.E., SKATTEBOL, A., POSSANI, L.D., BROWN, A.M. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus* **J. Gen. Physiol.**, 93, 67-83 1989.

KROGSCAARD-LARSEN, P.; FROLUND, B.F.; FALCH, E. Inhibitors of gamma-aminobutyric acid transport as experimental tools and therapeutic agents. **Methods Enzymol.** v. 296, p. 165-175, 1998

LANGLEY, K.; GRANT, N.J. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? **Neurochem Int.**, Oxford, v. 31, p. 739-57, 1997.

LAZDUNSKI, M. Voltage-dependent channels in the skeletal-muscle. **Muscle Nerve**, v. 9 (5), p. 3-3, 1986.

LEE, S.H.; SMITH, T.J.; INGLES, P.J.; SODERLUND, D.M. Cloning and functional characterization of a putative sodium channel auxiliary subunit gene from the house fly (*Musca domestica*) **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 6, p. 479-487, 2000.

LEGROS, C., OUGHUIDENI, R., DARBON, H., ROCHAT, H., BOUGIS, P.E. AND MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. **FEBS Letters.**, 390, 81-84, 1996.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios- conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: editora Atheneu, 2004.

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

LIKES, K.; BANNER, Jr. W.; CHAVEZ, M. *Centruroides exilicauda* envenomation in Arizona. **Western Journal of Medicine**, v.3, p.25-26, 1984.

LOMBET, A.; LAZDUNSKI, M. Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using Tityus toxin-gamma. **Eur. J. Biochem.**, v. 141 (3), p. 651-660, 1984.

LOUGHNEY K, KREBER R, GANETZKY B. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell.** Sep 22, v.58(6), p.1143-54, 1989

LOURENÇO, W.R. Diversity and endemism in Tropical versus Template scorpion communities. **Biogeographica**, v.70, p. 155-160, 1994.

LOUZADA-JÚNIOR, P., DIAS, J.J., SANTOS, W.F., LACHAT, J.J., BRADFORD, H.F., COUTINHO-NETTO, J. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. **J Neurochem.** v.59, p.358-363,1992.

LUTZ, A.; MELLO CAMPOS, O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **A Folha médica.** v.3, p. 25 - 26, 1922.

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.**, 9, 595-601, 1990.

MASSENSINI, A.R., MORAES-SANTOS, T., GÓMEZ, 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 $[Ca^{2+}]_i$. **Neuropharmacol.**, 37, 289-297, 1998.

MASSENSINI, A.R., ROMANO-SILVA M.A., GOMEZ M.V. Sodium channel toxins and neurotransmitter release. **Neurochem Res.** Oct, v. 28(10), p.1607-11, 2003.

MELDRUM, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology**, v.44, p.4-23, 1994.

MELLO –LEITÃO, C. Escorpiões sul-americanos. **Arq. Mus. Nac.**, Clj: Comitetul de Stat pentru Cultura si Arta, Muzeul de Istorie, v.40, p.1-468, 1945.

MILER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILIPS, M. Charybdotoxin, a potent inhibitor of single Ca^{2+} activated K channels from mammalian skeletal muscle. **Nature.** v. 313, p. 316-318, 1985.

MILIJANICH, G. P. Venom peptides as human pharmaceuticals. **Science & Medicine.** Sep/oct, p.6-15, 1997.

MIRANDA, F.; KUPEYAN, C.; ROCHAT, H.; ROCHAT, C.; LISSITZKY, S. Purification of animals toxins, isolation and characterizations of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* (Hector), *Buthus occitamus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. **Eur. J. Biochem.** v.16, p.514523, 1970.

MOHAMED, A.H. Notes on the toxin of Egyptian scorpions. **Biochem. J.** v.38, p.287-285, 1944.

MOUHAT, S.; ANDREOTTI, N.; JOUIROU, B.; SEBATIER, J.M. Animal toxins acting in voltage-gated potassium channels. **Current on Pharmaceutical Design.** 14(24), p.2503-2518, 2008.

MOUSSA, C.E.H., RAE, BUBB, W.A., GRIFFIN, J.L. Inhibitors of Glutamate Transport Modulate Distinct Patterns in Brain Metabolism. **Journal of Neuroscience Research.** v.85, p.342–350, 2007.

NICOLATO R, FERNANDES VM, MORAES-SANTOS T, GOMEZ RS, PRADO MA, ROMANO-SILVA MA, GOMEZ MV. Release of gamma-[(3)H]aminobutyric acid in rat brain cortical slices by alpha-scorpion toxin. **Neurosci Lett.** Jun 14, v.325(3), p.155-158, 2002

NOVELLO, J.C., ARANTES, E.C., VARANDA, W.A., OLIVEIRA, B., GIGLIO, J.R., MARANGONI, S. TsTx-IV, a short chain fourdisulfide-bridge neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom, which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels **Toxicon.** 37, 651-660, 1999.

OLNEY, J.W., WOZNIAK, D.F., FARBER, N.B. Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies. **Arch Neurol,** v.54, p.1234-1240, 1997.

PAPP, F.; BATISTA, C.V.F.; VARGA, Z.; HERCEG, M.; ROMÁN-GONZALEZ, S.A.; GASPAS, R.; POSSANI, L.D.; PANYI, G. Tst26, a novel peptide blocker of K_v1.2 and K_v1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. **Toxicon.** v . 54, p. 379-389, 2009.

PENN, R. D.; PAICE, J. A. Adverse effects associated with the intrathecal. **Pain,** v. 85, p. 291-296, 2000.

PESSINI, A.C., TAKAO, T.T., CAVALHEIRO, E.C., VICHNEWSKI, W., SAMPAIO, S.V., GIGLIO, J.R. ARANTES, E.C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids **Toxicon** , 39(10), 1495-1504, 2001.

PIMENTA, A.M.C. MANSUELLE, P. DINIZ, C.R. AND MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved α -KTx_{12.1}, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus* venom. **J.Pept. Sci.** 9, 132-140, 2003.

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

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

POSSANI, L.S.; ALAGON, A.C.; FLETCHER JR., P.L.; ERICKSON, B.M. Purification and properties of mammalian toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 180, pp.394-403, 1977.

PURVES,D. Neurotransmitter and their receptors. In: **Neuroscience**. 3ed, 2003.

RAITERI, L.; STIGLIANI, S.; ZAPPETTINI, S.; MERCURI, N.B.; RAITERI, M.; BONANNO, G. Excessive and precocious glutamate release in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropharmacology**. 46(6), p. 782-792. 2004.

RASBAND, M.N.; PARK, E.W.; VANDERAH, T.W.; LAI, J.; PORRECA, F.; TRIMMER, J.S. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons.**Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**. Nov.6, 98 (23), p. 13373-13378, 2001.

REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.; FREIRE-MAIA, L. Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. **Toxicon**. Nov., v. 36 (11), p. 1507-13, 1998.

RIDGEWAY, B.; WALLACE, M.; GERAYLI, A. Ziconotide for the treatment of severe spasticity after spinal cord injury. **Pain**, v. 85, p. 287-289, 2000.

RODRIGUES, A.R.A.; ARANTES, E.C.; MONJE, F.;STUHMER, W.; VARANDA, W.A. Tityustoxin-K (ALPHA) blockade of the voltage-gated potassium channel K_v1.3.**British Journal of Pharmacology**. v. 139, p.-1186, 2003.

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

ROSSI DJ, OSHIMA T, ATTWELL D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake.**Nature**. Jan 20;v.403(6767), p.316-321, 2000

SAMPAIO, S., V.; ARANTES, E., C.; PRADO, W.,A.; RICCIOPPO NETTO, F.; GIGLIO, J.,R. Further characterization of toxins T1IV (TsTxIII) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**. Vol. 29 (6), p. 663-672, 1991.

SAMPAIO, S.V., COUTINHO-NETTO, 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. Mol. Biol. Int.**, 39, 729-740, 1996

SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**. Vol.21, p.265-277, 1983.

SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; HSU, M. A.; PHILLIPS, D. R.; FRIED, V. A.; CAMPBELL, A. M.; NANNIZZI, L.; CHARO, I. F. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from venom of *Sistrurus m. barburii*. **J Biol Chem**, v. 266, p. 9359-9362, 1991.

SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem**. Nov 1;166(2):368-79, 1987.

SCHIAVON, E.; SACCO, T.; CASSULINI, R.R.; GURROLA, G.; TEMPIA, F.; POSSANI, L.D.; WANKE, E. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a β -scorpion toxin solely in $\text{Na}_v1.6$ channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n. 29, p.20326-20337, 2006.

SISSOM, W. D. Systematic, biogeography, paleontology. In: Polis, G.A. (ed) **The biology of the scorpions**, California, Stanford University Press, p. 587 , 1990.

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

TYTGAT, J.; CHANDY, K.G; MARTIN-EUCLAIRE, M. F.; VAN DE WALT, J.J.; OSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: αKTx Molecular subfamilies. **Trend in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.20, p.4-447, 1999.

VALDIVIA, H.H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W.J.; CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel of skeletal and cardiac muscle. **Proc. Natn. Acad. Sci.** Washington, v.89, p. 12185-9, 1992.

VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V.L.; BENDHACK, L.M. GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C. Effects of voltage-gated Na^+ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 141, p. 85-92, 2005.

VERANO-BRAGA, T., ROCHA-RESENDE, C., SILVA, D.M., IANZER, D., MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F., BOUGIS, P.E., DE LIMA, M.E., SANTOS, R.A.S., PIMENTA, A.M.C. *Tityus serrulatus* Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 371. 501-504, 2008.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 257, p. 11-19, 1972.

WATT, D.D.; SIMARD, J.M. Neurotoxic proteins in scorpion venom. **J. Toxicol. (Toxin Rev.)**, v.3, p. 181-221, 1984.

YU, A.C., CHAN, P.H., FISHMAN, R.A. Arachidonic acid inhibits uptake of glutamate and glutamine but not GABA in cultured cerebellar granule cells. **J Neurosci Res**;v.17, p.424-427, 1987.

YU, F.H.; CATTERALL, W.A.; Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biology**. v.4.p. 207-213,2003.

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 (IpTx(a)), a peptide activator of Ca^{2+} release channels/rhodine receptors.**FEBS Lett.** Apr. 1, v. 405(3), p.385-89, 1997.

ZHU, S.; GAO, B.; AUMELAS, A.; RODRIGUEZ, M.C.; LANZ-MEMDONZA, H.; PEIGNEUR, S.; DIEGO-GARCIA, E.; MARTIN-EUCLAIRE, M.F., TYTGAT,J.; POSSANI, L.D. MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. **Biochimic et Biophysica Acta**. 1804, p.872-883, 2010.

ZONTAN, T.; TOUPS, M.; KOLLEWE, A.; JOHNSON, E.; CUELLO, L.G.; DRIESSENS, G.; BIANCALANA, M.; KOIDE, A.; PONTE, C.G.; PEROZO, E.; GAJEWSKI, T.F. SUAREZ-KURTZ, G.; KOIDE, S.; GOLDSTEIN, S..N. A designer ligand specific for kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library.**PNAS**. p.1-6, 2009.

ZLOTKIN, E.; FISHMAN, Y.; ELAZAR, M. AaIT: from neurotoxin to insecticide. **Biochimie**. v.82, p. 869-881, 2000.