
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

Síntese e caracterização de pequenos peptídeos lineares do veneno
de *Tityus serrulatus* (Buthidae)

FERNANDO KAMIMURA COCCHI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular).

Março - 2016

FERNANDO KAMIMURA COCCHI

**Síntese e caracterização de pequenos peptídeos lineares do veneno
de *Tityus serrulatus* (Buthidae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (área de
concentração Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

**Março
2016**

595.44 Cocchi, Fernando Kamimura
C659s Síntese e caracterização de pequenos peptídeos lineares
do veneno de *Tityus serrulatus* (Buthidae) / Fernando
Kamimura Cocchi. - Rio Claro, 2016
93 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Aracnídeo. 2. Veneno de escorpião. 3. Toxinas. 4.
Peptídeos negligenciados. 5. Bioensaio. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Sergio Palma pela orientação, críticas construtivas e apoio.

À CAPES Toxinologia pela bolsa concedida.

À UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos colegas de trabalho, principalmente Nathalia e Bibiana que me auxiliaram em muitos experimentos, discussões dos mesmos e ensinamentos.

Aos meus pais Luiz e Mieko pelo amor, atenção, compreensão e tudo que um filho poderia desejar.

Ao meu irmão Rafael que sempre me ajudou e apoiou.

À minha família que sempre me apoiou.

Aos meus amigos da Unesp Eduardo, Diego, Paulo, Sérgio (Miagui), Milene, Dayane, Rodrigo, Thiago (Cis), Paixão, Amarilis, Fabrício (Peão), Cacá, Marcela e Pedro pelas conversas, risadas, churrascos e cafés.

À todos os funcionários e pesquisadores do CEIS que me ajudaram direta ou indiretamente.

À Angélica e todos os integrantes do Influx Rio Claro pela atenção, cuidado, apoio, ensino e respeito, qualidades que transformaram funcionários em amigos.

Aos amigos de Rio Claro Tiago, Mariana, Vitor, Henrique, João, Márcia, Emerson (Alemão), Taty, Arthur, família Gama, Camila pelos bons tempos juntos.

Ao Rafael Meira por ser um exemplo de pessoa íntegra que respeito e admiro.

Ao Leandro pelas conversas, conselhos e filmes ruins.

Ao João e Thais pela amizade de longa data, pelas risadas e conversas.

Ao Juninho e sua mulher Thais pela amizade mais longa que tenho e sempre terei independente do que aconteça.

RESUMO

Os escorpiões são artrópodes da classe Arachnida, ordem Scorpiones. São animais peçonhentos, ou seja, possuem órgão secretório ou glândulas conectadas a um dispositivo de injeção, o qual pode inocular o veneno produzido pela glândula ou células especializadas. O veneno pode ser descrito como sendo uma mistura complexa, contendo muco, sais inorgânicos, moléculas orgânicas de baixa massa molecular, muitos peptídeos neurotóxicos e proteínas. O envenenamento humano por picada de escorpião é um importante problema de saúde pública em vários países tropicais e subtropicais. No Brasil, *Tityus serrulatus* é uma das espécies mais perigosas, que causam grave envenenamento, podendo levar ao óbito. Em geral, o envenenamento pode causar sintomas de dor, febre, agitação psicomotora, salivação, lacrimejamento, aumento da mobilidade do trato gastrointestinal, insuficiência respiratória e arritmia cardíaca, hipertensão arterial seguida de hipotensão, insuficiência cardíaca, edema pulmonar e choque anafilático. O veneno dos escorpiões tem sido estudado ao longo dos anos, a fim de elucidar seus compostos juntamente com suas sequências e suas funções biológicas. Algumas espécies de escorpiões possuem em seu veneno compostos antimicrobianos, mediadores que ativam os processos inflamatórios, causam a desgranulação de mastócitos, como também, podem ser capazes de induzir quimiotaxia de neutrófilos. Até o presente momento a toxinologia de escorpiões tem concentrado o foco nas neurotoxinas, que são peptídeos contendo entre 30 e 70 resíduos de aminoácidos em suas sequências, com quatro ou cinco pontes dissulfeto em suas estruturas. A despeito de existir muitos pequenos peptídeos (apresentando entre 5 e 20 resíduos de aminoácidos em suas sequências), que apresentam conformações lineares, por não apresentarem pontes dissulfeto em suas estruturas, este grupo de toxinas tem sido negligenciado pela literatura, devido à dificuldade em isolar e determinar suas estruturas moleculares. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar alguns destes peptídeos (Typep-14, -15, -16, -17, and -18), previamente isolados e sequenciados a partir do veneno do escorpião *T. serrulatus*, por nosso grupo de pesquisas, e caracterizá-los de acordo com suas possíveis funções biológicas através de ensaios de desgranulação de mastócitos e liberação de lactato desidrogenase, hemólise, antibiose, efeitos hiperalgésicos e edematogênicos, e teste de campo aberto. Nenhum peptídeo apresentou atividade hemolítica, antibiótica; ou apresentou atividade desgranuladora de mastócito e liberação de LDH em ratos. Apenas o TyPep 18 apresentou alterações na locomoção de camundongos. Em geral, todos apresentaram ações de hiperalgesia ou formação de edemas localizados. Conclui-se portanto, que os peptídeos ensaiados no presente trabalho estão relacionados à produção de dor e inflamação.

Palavras-chave: Veneno de escorpião; Toxinas; Peptídeos negligenciados; Bioensaio.

ABSTRACT

Scorpions are arthropods of the class Arachnida, order Scorpiones. They are venomous animals, i. e, they have secretory organ or gland connected to an injection apparatus, which can inoculate the venom produced by specialized cells. The venom can be described as a complex mixture containing mucus, inorganic salts, organic molecules of low molecular mass, many neurotoxic peptides and proteins. The human envenoming by scorpion sting is an important problem of public health in many tropical and subtropical countries. In Brazil, *Tityus serrulatus* is one of the most dangerous species, which cause severe envenoming, that can lead to death. In general, the envenoming can cause symptoms of pain, fever, agitation, salivation, lacrimation, increasing motility of the gastrointestinal tract, respiratory failure and cardiac arrhythmia, hypertension followed by hypotension, heart failure, pulmonary edema and anaphylaxis. The venom of scorpions has been studied over the years in order to elucidate their biochemical composition, along with their sequences and biological functions. Some species of scorpions have antimicrobial compounds in their venom, mediators that trigger inflammatory processes, causing mast cell degranulation, and also may be capable of inducing neutrophil chemotaxis. To date, the toxinology of scorpions has concentrated the focus on neurotoxins, which are peptides containing between 30 and 70 amino acid residues in their sequences, with four or five disulfide bonds in their structures. Despite the existence of many small peptides (having between 5 and 20 amino acid residues in their sequences), that have linear conformations for not having disulfide bonds in their structures, this group of toxins has been neglected in the literature, due to the difficulty in isolating and determine molecular structures of these toxins. This study aimed to synthesize some of these peptides (Typep-14, -15, -16, -17, and -18) previously isolated and sequenced from *T. serrulatus* scorpion venom, by our research group, and characterize them according to their possible biological functions through mast cell degranulation and lactate dehydrogenase release test, hemolysis, antibiosis, hyperalgesic and edematogênicos effects and open field test. None of the peptides presented hemolytic, antibiotic activity, mast cell degranulation or LDH release in rats. Only TyPep 18 influenced the pattern of locomotion in mice. In general, all peptides had presented hyperalgesic and edematogenic effects. It may be concluded that the peptides tested in this study are related to the production of pain and inflammation.

Keywords: Scorpion venom; Toxins; Neglected peptides, Bioassays.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Escorpião e seu veneno.....	9
1.2 Os peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs).....	13
1.2.1 <i>Peptídeos neurotóxicos e canais de sódio.....</i>	<i>15</i>
1.2.2 <i>Peptídeos neurotóxicos e canais de cálcio.....</i>	<i>19</i>
1.2.3 <i>Peptídeos neurotóxicos e canais de potássio.....</i>	<i>20</i>
1.2.4 <i>Peptídeos neurotóxicos e canais de cloro.....</i>	<i>22</i>
1.3 Análise dos peptídeos neurotóxicos.....	23
1.3.1 <i>Análise por eletrofisiologia e “patch-clamp”</i>	<i>27</i>
1.4 Peptídeos lineares (sem pontes dissulfeto - NDBPs).....	30
1.5 Estudos dos peptídeos lineares.....	31
1.6 Inovação nas pesquisas dos peptídeos lineares.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Síntese de peptídeos.....	35
3.2 Espectrometria de Massas.....	35
3.3 Atividade hemolítica.....	36
3.4 Atividade antibiótica.....	37
3.5 Atividade desgranuladora de mastócitos.....	39
3.6 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH).....	41
3.7 Efeito hiperalgésico.....	41
3.8 Efeito edematogênico.....	43

3.9 Avaliação da atividade geral dos animais analisada no modelo do Campo Aberto.....	44
3.10 Análise estatística.....	46
3.11 Comitê de Ética de Uso de Animais.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Atividade hemolítica.....	49
4.2 Atividade antibiótica.....	51
4.3 Atividade desgranuladora de mastócitos e liberação de LDH.....	51
4.4 Influência dos peptídeos nas atividades de locomoção e levantamento.....	53
4.5 Atividade hiperalgésica e edematogênica.....	54
5 DISCUSSÃO.....	60
5.1 Atividade hemolítica.....	63
5.2 Atividade antibiótica.....	65
5.3 Atividade desgranuladora de mastócitos e liberação de LDH.....	66
5.4 Influência dos peptídeos nas atividades de locomoção e levantamento.....	67
5.5 Atividade hiperalgésica e edematogênica.....	68
6 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

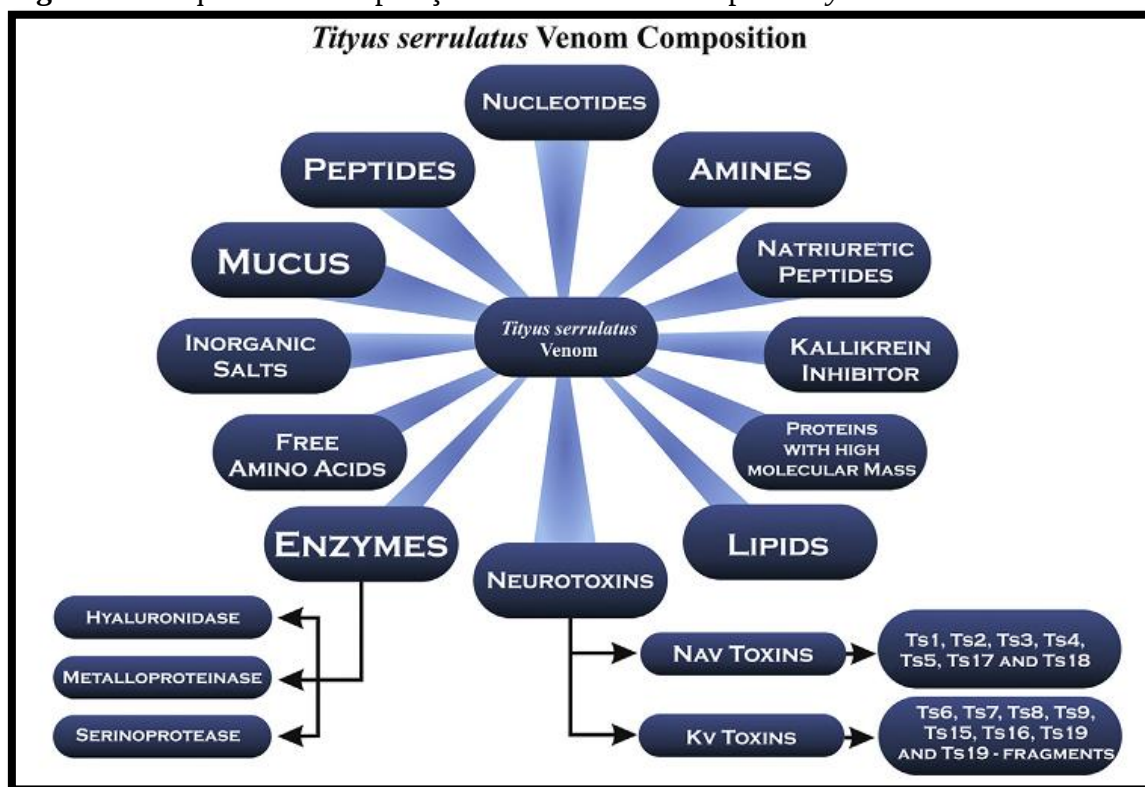
1 INTRODUÇÃO

1.1 O escorpião e seu veneno

Os escorpiões são animais que pertencem ao grupo dos artrópodes terrestres quelicerados da classe Arachnida, único representante terrestre do subfilo Chelicerata. A ordem Scorpiones possui 15 famílias, 197 gêneros e aproximadamente 2069 espécies no mundo (DI et al., 2014), representa apenas 1,5% dos aracnídeos conhecidos (CODDINGTON; COLWELL, 2001; BRAZIL; PORTO, 2010; SANTOS, 2013). São animais peçonhentos, os quais habitam uma grande variedade de micro-habitats e estão presentes em quase todos os continentes, exceto na Antártida (SISSOM, 1990; LOURENÇO; EICKSTEDT, 2003; GODDARD, 2007). O sucesso na sobrevivência na natureza se dá basicamente pela anatomia e fisiologia que quase não mudou em centenas de milhares de anos, desde o seu surgimento. Por causa do fato das presas de escorpiões serem outros artrópodes, eles desenvolveram a habilidade de produzir e injetar pequenas quantidades do veneno, o qual é muito potente, em suas presas (DEBIN et al., 1993), principalmente neurotoxinas capazes de paralisar ou matá-las.

Os venenos de escorpiões podem ser descritos como sendo uma mistura complexa contendo muco, sais inorgânicos, moléculas orgânicas de alta massa molecular, algumas prote e muitos peptídeos neurotóxicos (figura 1). Essa mistura de substâncias tóxicas constitui o veneno, que age por via parenteral (endovenosa, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica) e é inativada por via entérica, por ser normalmente de natureza protéica. São ativamente utilizados para a captura de presas, incluindo pré-digestão, ou para defesa contra predadores (DU PLESSIS; ELGAR; DU PLESSIS, 2008; MARCUSSI; ARANTES; SOARES, 2011). Em geral, as toxinas presentes são espécies-específicas, produzidas contra mamíferos, insetos ou crustáceos. Apesar de serem encontradas muitas divergências quanto à especificidade e atividade biológica dessas toxinas, elas podem ser consideradas como uma grande família de oligopeptídeos (ALI et al., 1998).

Figura 1 – Esquema da composição do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*.



Fonte: Retirado de Pucca et al., 2015a.

Os genes que codificam as toxinas são evolutivamente muito variáveis, ocorrendo ativamente mutações pontuais, duplicações de genes, recombinações, modificações pós-traducionais, levando a uma vasta gama de variantes de toxina (FROY et al., 1999a). A quantidade de toxinas diferentes produzidas por um escorpião é estimada em aproximadamente 100 mil moléculas, das quais são conhecidas por volta de 1% (POSSANI et al., 1999). Ainda não se compreende muito bem como uma gama enorme de moléculas consegue reconhecer as mesmas classes de receptores ou similares (FROY et al., 1999a; GAZARIAN et al., 2005).

A grande quantidade de toxinas e suas variantes existem possivelmente para que o escorpião possa incapacitar a presa, paralisando ou matando, independente do habitat em que está localizado, sendo assim, possui um veneno que afeta uma grande variedade de animais (insetos, crustáceos ou outros aracnídeos). O escorpião *Hadrurus arizonensis* usa seu veneno somente para imobilizar uma presa grande ou quando uma presa, mesmo de menor tamanho, tenta se defender (EDMUNDS; SIBLIS, 2010). Muitos escorpiões otimizam o uso do veneno para a incapacitação da presa, pois a produção para reposição do veneno gasto tem alto custo metabólico (NISANI et al., 2012). Para a defesa contra predadores, eles também necessitam que seu veneno consiga atrasá-los, causando dor, inflamações, e outros sintomas vistos

também no envenenamento em humanos, aumentando assim, as possibilidades de fuga deste animal.

O envenenamento humano por picadas de escorpiões é um grande problema de saúde pública em vários países tropicais e subtropicais (FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994). No Brasil foram registradas 86 espécies pertencentes a quatro famílias: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Liochelidae (LOURENÇO; EICKSTEDT, 2003). As espécies do gênero *Tityus*, como *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. obscurus* e *T. stigmurus* são as espécies consideradas de importância médica, sendo *T. serrulatus* a espécie mais perigosa, que causa grave envenenamento, podendo levar a óbito (FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994; PUCCA et al., 2015b). De acordo com o Ministério da Saúde brasileiro, ocorreram 69.036 casos de acidente por picada de escorpião em todo o Brasil, no ano de 2013 (SINAN/SVS/MS, 2014) e 51 óbitos foram atribuídos ao escorpionismo ocorridos entre 2006 e 2010 (MS/FIOCRUZ/SINITOX, 2010). No Nordeste do Brasil, a espécie *T. stigmurus* (Buthidae) é o escorpião de maior importância médica, especialmente em áreas urbanas da Bahia (LIRA-DA-SILVA et al., 2000) e Pernambuco e os escorpiões da espécie *T. serrulatus* (LUTZ; MELLO, 1922) encontram-se espalhados por toda região Sudeste brasileira (KALAPOTHAKIS; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, 1997).

Figura 2: Espécime de *Tityus serrulatus*.



Fonte: Bortoluzzi, Querol e Querol, 2007.

O escorpião da espécie *T. serrulatus* (Ts) (figura 2) também conhecido como escorpião amarelo possui de seis a sete centímetros de comprimento, com coloração amarelada escura no corpo, pedipalpos e patas amarelas (LUTZ; MELLO, 1922). Este animal

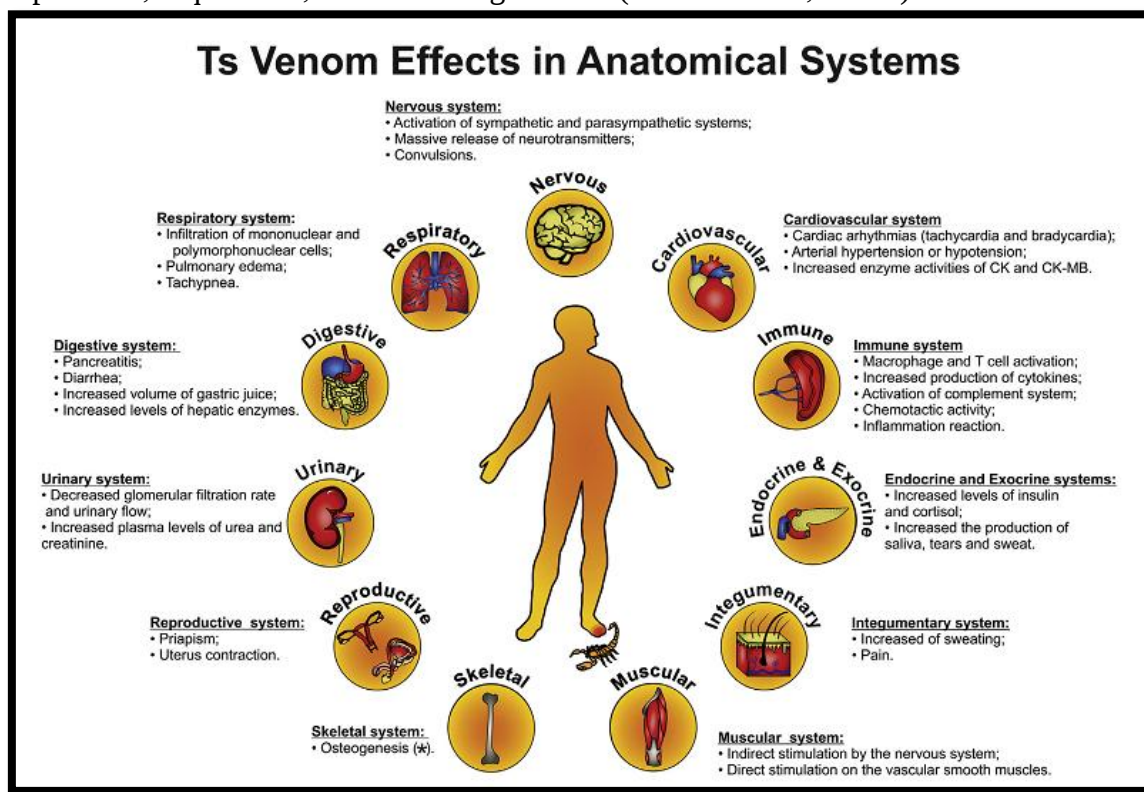
prefere locais com climas tropicais, apesar de poder ser encontrado no cerrado e áreas urbanas (LOURENÇO, 2008). Sua habilidade de viver em cidades é explicada pela alta concentração de lixo e detritos, os quais ajudam na proliferação de insetos usados em sua alimentação (PUCCA et al., 2015b), a qual é baseada em baratas, gafanhotos, cupins e grilos e outros aracnídeos (aranhas e escorpiões), podendo haver canibalismo entre espécies diferentes ou dentro da mesma espécie, até mesmo entre mães e proles (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011). Sua reprodução é através da partenogênese (LOURENÇO, 2008), podendo gerar até 20 filhotes no outono (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011).

A reprodução por partenogênese e sua grande adaptabilidade às áreas urbanas contribuíram para o aumento da população pelo país e explica o porquê esta espécie é responsável pelo maior número de acidentes em diferentes regiões do Brasil (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008).

A sintomatologia do envenenamento por Ts é o efeito primário da ação das neurotoxinas nos canais iônicos, o que causa a liberação massiva de neurotransmissores (catecolaminas, acetilcolinas, entre outros), levando à estimulação do sistema nervoso autônomo (VASCONSELOS et al., 2005). A catecolamina possui um papel majoritário na neurotransmissão periférica e, uma vez liberada, liga a uma das duas classes de receptores na membrana pós-sinápticas incluindo receptores muscarínicos (mAChR), os receptores de proteínas G ou receptores de nicotina (nAChR) e canais iônicos. Em junções neuromusculares, a acetilcolina (ACh) é empregada pelos neurônios motores somáticos para despolarizar os músculos estriados. No sistema nervoso autônomo, ACh é o neurotransmissor liberado e usado por todos os neurônios pré-ganglionares e pelos neurônios pós-ganglionares parassimpáticos (GALANTER et al., 2012).

A injeção de veneno de escorpião em animais experimentais produz efeitos sistêmicos com sinais e sintomas semelhantes aos observados em envenenamento humano, tais como febre, agitação psicomotora, salivação, lacrimejamento, aumento da mobilidade do trato gastrointestinal, insuficiência respiratória e cardíaca, arritmia cardíaca, hipertensão arterial seguido de hipotensão, edema pulmonar e choque anafilático, entre outros (fig. 3) (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989).

Figura 3: Esquema dos efeitos do envenenamento por *T. serrulatus*. O veneno age no sistema nervoso, cardiovascular, imune, endócrino e exócrino, respiratório, digestório, urinário, reprodutor, esquelético, muscular e tegumentar (PUCCA et al., 2015a).



Fonte: Retirado de Pucca et al., 2015a.

Na revisão realizada por Petricevich (2010), foi demonstrado que os mediadores que ativam os processos inflamatórios podem ser liberados após envenenamento por escorpiões incluindo cininas, ecosanóides, fator ativador de plaquetas, fator de aumento da permeabilidade, óxido nítrico e citocinas. A liberação de citocinas e outros mediadores podem ser responsáveis por várias das manifestações inflamatórias observadas tais como a respiratória aguda, síndrome da angústia respiratória aguda, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e falência de múltiplos órgãos.

1.2 Os peptídeos com pontes dissulfeto (DBPs)

A grande quantidade de peptídeos encontrados no veneno de escorpião exibe ampla atividade farmacológica e bioquímica, e pode ser dividida em duas grandes classes, dependendo em quais canais de íons eles interagem. O veneno também contém peptídeos com ação neurotóxica, que são responsáveis pelos sintomas apresentados durante o envenenamento através da sua interação com canais de íons, e tem o potencial de causar grandes danos ao sistema nervoso dos vertebrados e invertebrados (MEBS, 2002). O termo neurotoxina aplica-

se a uma variedade de substâncias que afetam o sistema nervoso produzindo uma ampla variedade de efeitos prejudiciais à saúde humana, entretanto, em alguns casos, estas substâncias podem possuir um uso terapêutico (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2005).

A primeira classe compreende os NBPs, os quais interagem com células excitáveis, e podem ser subdivididos de acordo com o tipo de canal iônico específico com os quais interagem, estimulam ou inibem. Estes peptídeos são responsáveis pela maior parte dos sintomas do envenenamento causado por picadas de escorpiões (DU PLESSIS; ELGAR; DU PLESSIS, 2008; CHIPPAUX; GOYFFON, 2008; REMIJSEN; VERDONCK; WILLEMS, 2010).

Os DBPs são divididos em quatro famílias: i) Família 1 - contém peptídeos com 60 a 70 resíduos de aminoácidos e sua cadeia está conectada por quatro pontes dissulfeto, e modulam a atividade dos canais de íons Na^+ ; ii) Família 2 - compreende os peptídeos de cadeia curta (30 a 40 resíduos de aminoácidos) e cadeia longa (60 a 64 resíduos) os quais podem possuir três ou quatro pontes dissulfeto e podem bloquear os canais de íons K^+ ; iii) Família 3 - é composta por peptídeos insetotóxicos que de cadeias curtas de aproximadamente 36 resíduos de aminoácidos com quatro pontes dissulfeto, os quais supostamente inibem os canais de íons Cl^- ; iv) Família 4 - inclui os peptídeos que modulam canais de íons Ca^{2+} sensíveis a rianodina (TYTGAT et al., 1999).

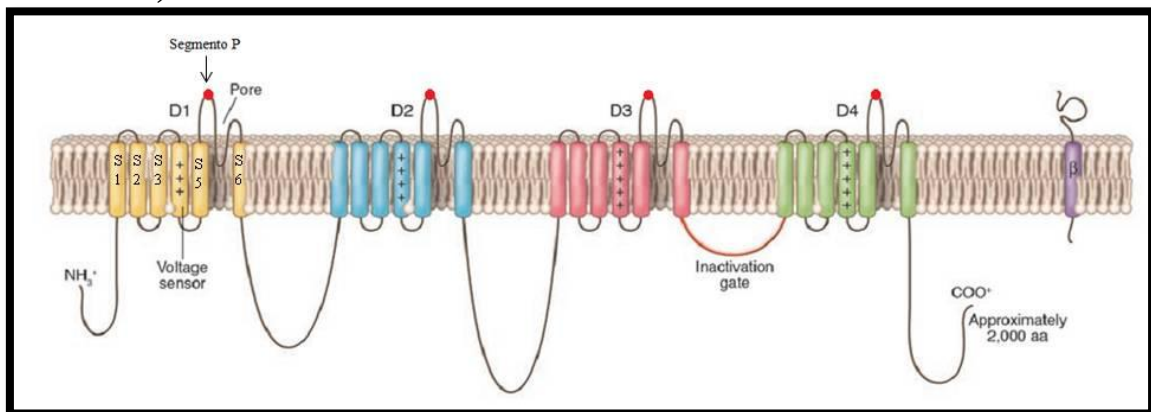
Em resumo, estes peptídeos podem reconhecer e interagir com canais de íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{+2} , em tecidos excitáveis, como músculos e nervos (DEBIN et al., 1993; TYTGAT et al., 1999; ZENG et al., 2001a; VEGA; POSSANI, 2004; TIAN et al., 2008). Ao fazer isso, eles exercem uma grande variedade de ações na fisiologia da vítima, incluindo a desestabilização da membrana, obstrução dos sistemas nervoso central e periférico e a alteração da atividade do músculo liso ou esquelético (MÉNEZ et al., 1992).

Canais iônicos são poros de ação controlada, encontrados em todos os animais, plantas e bactérias, nas membranas celulares e funções celulares em diversos tipos de processos, tais como: excitação do nervo e/ou músculo, secreção hormonal, aprendizagem e memória, proliferação celular, transdução sensorial, controle do equilíbrio de sal e água e regulação da pressão arterial. Podem ser regulados por via intrínseca, ou por ligantes, ou por mudanças no gradiente de voltagem da membrana (ASHCROFT, 2000).

1.2.1 Peptídeos neurotóxicos e canais de sódio

Os canais de íons Na^+ ativados por voltagem são grandes proteínas integrais de membrana, os quais abrem e fecham em resposta às mudanças locais no campo elétrico da membrana plasmática. Eles são poros formados por uma proteína grande, a subunidade- α (260 kDa), associados a uma ou duas pequenas proteínas, as subunidades- β , uma subunidade auxiliar de canais de sódio em mamíferos (AMIR et al., 2006; GORDON et al., 2007). A subunidade- α contém todos os componentes necessários para um canal iônico funcional, incluindo o sensor de voltagem, portão de ativação, poro iônico e portão de inativação. Esta subunidade consiste em quatro domínios homólogos (D1-D4) conectados por três loops de tamanhos diferentes (SATO et al., 2001). Cada um com seis hélices transmembranas (S1-S6) e uma região não helicoidal entre a S5 e S6, o segmento P, que se acredita ser, pela junção das regiões dos segmentos P dos quatro domínios, pelo qual o íon de sódio percorre (fig. 4) (AMIR et al., 2006).

Figura 4: Subunidade- α que compõe o canal de sódio disposto linearmente; hélices transmembranas S1 a S6 dos quatro domínios (D1 a D4). O ponto vermelho representa o segmento P (sítio de ligação) e onde a neurotoxina se liga ao canal de sódio (meio extracelular).

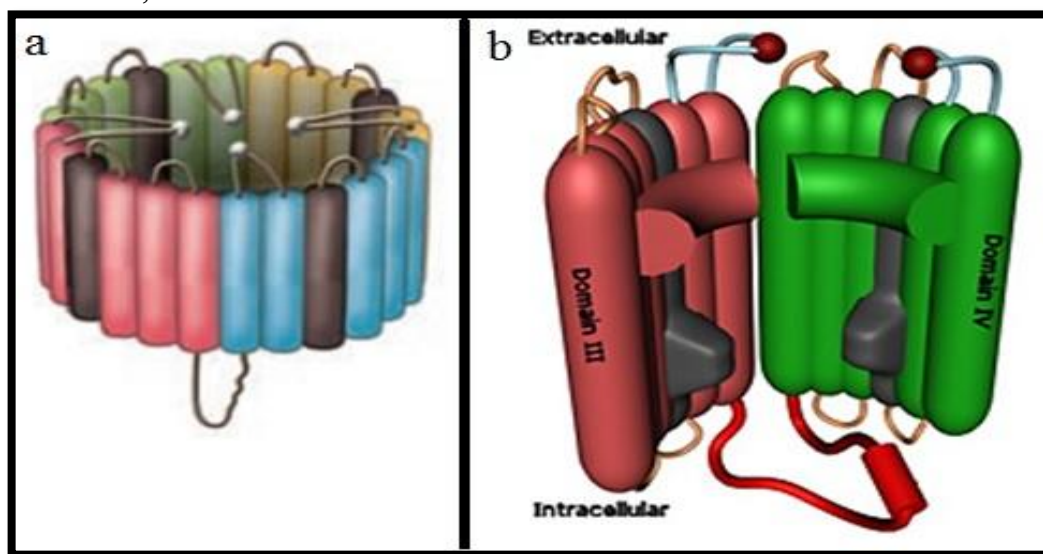


Fonte: Figura modificada de Meisler e Kearney, 2015.

O poro condutor de íons permite que íons com carga e o diâmetro apropriado (sendo sódio o íon mais permeável) passem através da dupla camada lipídica, esta, que ao contrário do poro, é relativamente impermeável aos íons. A parte mais estreita do poro, localizado na luz do canal (detalhe na figura 4 item b parece ser mais próxima à superfície exterior do canal, e este é o locus onde a seletividade entre íons ocorre, o "filtro de seletividade" (fig. 5). A abertura interna do poro que está virado para o citoplasma parece ter um vestíbulo consideravelmente mais amplo, que acomodam grandes cátions orgânicos que não conseguem

passar através do filtro de seletividade mais estreito, mas podem atingir o citoplasma por permeação através da bicamada lipídica das membranas plasmáticas. A abertura citoplasmática também contém regiões onde as drogas se ligam a partes do canal envolvidas na inativação, o processo de fechamento do poro é acionado por despolarização (AMIR et al, 2006).

Figura 5: Canal de sódio. a) Modelo 3D do canal de sódio; b) Secção de um modelo da subunidade- α do canal de sódio evidenciando o interior do canal entre os domínios D3 e D4, com a abertura voltada para a região extracelular e um anel no interior da luz, logo abaixo da entrada do canal, tornando-a mais estreita.



Fonte: Figura modificada de Meisler e Kearney, 2015.

Abertura dos canais de sódio de seu estado de repouso, o qual é fechado, envolve várias etapas de alteração conformacional, a maioria em resposta às forças colocadas nos canais pelo campo elétrico que acompanham a despolarização da membrana. Segmentos carregados do canal, identificados por possuírem múltiplos resíduos de aminoácidos positivos em pelo menos três dos quatro segmentos de S4, "sentem" estas alterações de campo elétrico e movem-se através da membrana.

Em mamíferos, as subunidades- α dos canais de sódio possuem nove isoformas ($\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$) (tabela 1) as quais são diferentes em suas propriedades eletrofisiológicas. Elas diferem em seus limiares de abertura, e o período de tempo pelo qual o canal permanece aberto. Diferem também pela variação de tempo que o canal permanece em seu estado inativo e no efeito do potencial de membrana sobre seus parâmetros cinéticos (AMIR et al., 2006). As isoformas das subunidades- α : $\text{Na}_v1.1$, 1.2, 1.3, e 1.6 são expressas principalmente no sistema nervoso central (SNC), $\text{Na}_v1.7$, 1.8 e 1.9 são altamente expressas no sistema nervoso

periférico (SNP) e Na_v1.4 e 1.5 estão presentes no músculo esquelético e cardíaco de adultos, respectivamente (GOLDIN, 2001).

Tabela 1: Isoformas das subunidades- α dos canais de sódio e suas propriedades.

CHANNEL α -SUBUNIT ISOFORM	INACTIVATION RATE (TTX SENSITIVE/RESISTANT)*	DISTRIBUTION IN NORMAL ADULT RAT DRG†	CHANGE POST-NERVE INJURY	CHANGE POST- INFLAMMATION
Na _v 1.1	Fast (S)	+ 75% of all cells; esp. high levels in large cells	↓ SNL injured DRG ¹³⁰ No Δ DN ⁵¹	No Δ ²⁴
Na _v 1.2	Fast (S)	+ Low levels; 40% of all cells	↓ SNL injured DRG ¹³⁰	No Δ ²⁴
Na _v 1.3	Fast (S)	– Very low or absent in adult, but high levels in embryo	↑ Axot esp small cells; but no Δ Rhizot ^{22,217} ↑ SNL injured DRG; esp. medium and large cells ¹³⁰ ↑ CCI small cells ⁶³ ↑ DN small and large cells ⁵¹	↑ small cells ²⁴
Na _v 1.4	Fast (S)	–	n/a	n/a
Na _v 1.5	Slow (R)	– (embryo only)	n/a	n/a
Na _v 1.6	Fast (S)	+ 87% of all cells, esp. high levels in medium and large cells	↑ DN small and large cells ⁵¹	No Δ ²⁴
Na _v 1.7	Fast (S)	+ All cells	DN ¹¹⁵	↑ esp. small cells ^{24,95}
Na _v 1.8	Slow (R)	+ 50% all cells	↓ Axot small cells; but no Δ Rhizot ¹⁹¹ ↓ CCI small cells ⁶³ ; but no Δ CCI found by Novakovic et al ¹⁶⁰ ; decrease only in axot cells ⁵⁷ no Δ SNL uninjured DRG ⁹⁰ Translocated to axons in CCI, Axot., SNL uninjured DRG ^{90,136,160} ↓ DN small and large cells ^{51,115}	↑ esp. small cells ^{24,95,203}
Na _v 1.9	Very slow (persistent) (R)	+ 80% of small cells, rare in large cells; ca. 50% of all A δ and C nociceptors; 90% of “silent” C-nociceptors	↓ Axot small cells; but no Δ Rhizot ¹⁹¹ ↓ CCI small cells ⁶³ ; decrease only in axot cells ⁵⁷ ↑ DN small and large cells ⁵¹	No Δ ²⁴

Abbreviations: ↑, ↓, no Δ , increase, decrease, or no change in expression of mRNA and/or protein. Axot, axotomy (nerve transection); DN, diabetic painful peripheral neuropathy; SNL, spinal nerve ligation model of Kim and Chung¹³¹; CCI, chronic constriction injury model of Bennett and Xie¹⁷; Rhizot, dorsal rhizotomy.

*Data from International Union of Pharmacology: <http://www.iuphar-db.org/iuphar-ic/sodium.html>.

†Data from Black et al²³; Dib-Hajj et al⁶²; Fang et al⁷³; Kim et al¹³⁰; Renganathan et al¹⁷⁹; and Waxman et al.²¹⁷

Fonte: Tabela retirada de Amir et al., 2006.

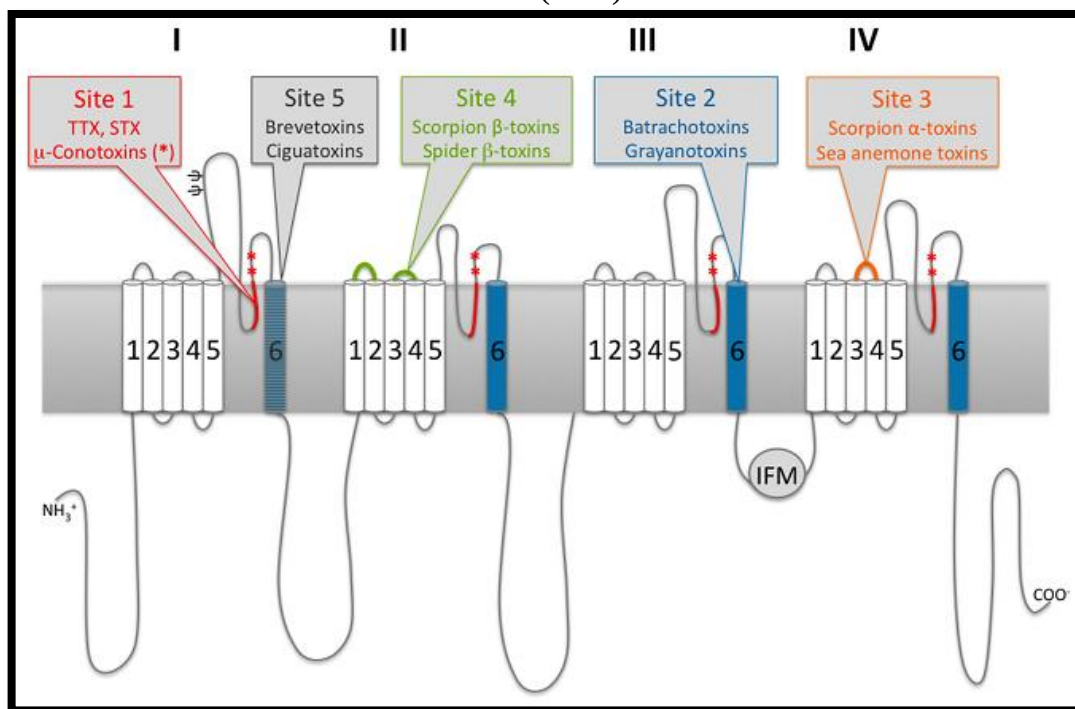
O canal de sódio é o mais estudado dentre os canais de voltagem-dependentes. A presença dessa proteína determina a especialização funcional de muitos tipos de células, como neurônios sensoriais e células cardíacas, principalmente em processos fisiológicos, como dor, inflamação e contratilidade. A via mais eficaz para correlacionar a expressão de canais de sódio voltagem-dependentes com as características biofísicas de células excitáveis é determinar propriedades como velocidade de condução do potencial de ação e influxo de íons de sódio, o que tem auxiliado cada vez mais no entendimento de seu mecanismo de ação, bem

como de agentes que atuam sobre o canal como anestésicos locais ou como toxinas (LAI et al., 2004).

Como elemento chave para transmissão de sinais, canais de íons Na^+ são alvos perfeitos para diferentes neurotoxinas de diversas estruturas químicas (CESTÈLE et al., 1999; CATTERALL et al., 2005b). Todas as toxinas que atuam em canais de íons Na^+ (NaTx) de escorpiões são polipeptídeos que possuem massa molecular de 6500 a 8500 Da, o que corresponde a 58 a 76 resíduos de aminoácidos (VEGA; POSSANI, 2005).

As α -NaScTxs de escorpião se ligam a um sítio do receptor no loop extracelular entre S3 e S4 no domínio IV da subunidade α do canal de Na^+ (IV S3-S4), já as β -NaScTxs de escorpião se ligam a um sítio do receptor no loop extracelular entre S3 e S4 no domínio II da subunidade α do canal de Na^+ (II S3-S4) (fig. 6). Durante a ativação do canal de íons Na^+ , os sensores de tensão II S4 são translocados para o exterior e uma β toxina irá interagir com a extremidade do segmento extracelular II S4 e prendê-lo nessa posição para fora (ativada). Isto aumenta a ativação do canal e subsequente despolarização e, conseqüentemente, provoca uma mudança na dependência da voltagem de ativação para potenciais de membrana mais negativos (ZLOTKIN, 1997; FROY et al., 1999b; CESTÈLE et al., 2001).

Figura 6: Esquema bidimensional da subunidade- α e identificação da localização das áreas de ligação das neurotoxinas. Domínios homólogos D1 a D4 (I, II, III, IV, respectivamente) e as seis hélices transmembranas de cada domínio (1 a 6).



Fonte: Figura retirada de Stevens et al., 2011.

As α -NaScTxs são subdivididas em três grupos:

- i) α -toxinas clássicas, são altamente ativas somente em canais de sódio dependentes de voltagem de mamíferos, com alta afinidade em sinaptossomos de cérebro de ratos. Dentre estas toxinas estão: Aah2, Aah1 e Aah3 de *Androctonus australis* Hector, Lqq5 de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* e Bot3 de *Buthus occitanus tunetatus*, peptídeos purificados de escorpiões do norte da África (MARTIN-EAUCLAIRE; COURAUD, 1995; FROY; GUREVITZ, 2003);
- ii) Insetotoxinas exibem alta atividade em canais de sódio somente de insetos. As toxinas Lqh α IT (EITAN et al., 1990), Lqq3 (KOPEYAN et al., 1993), e BotIT1 (BORCHANI et al., 1997) ligam com alta afinidade em preparações de neurônios de insetos;
- iii) Toxinas similares as α -toxinas (α -like toxins) são ativas tanto em canais de sódio de mamíferos quanto de insetos Lqh3 e Lqh6 (*L. quinquestriatus hebraeus*), Bom3 e Bom4 (*B. occitanus mardochei*), e BmK M1 (*Buthus martensii* Karsch).

Insetotoxinas podem ser classificadas em dois grupos específicos para insetos, toxinas excitatórias e toxinas depressivas. As toxinas excitatórias específicas de insetos podem resultar na paralisia por contração convulsiva do inseto, através da sua ação nos canais de cálcio das células nervosas. As toxinas depressivas específicas de insetos podem levar à paralisia pelo relaxamento muscular, e poucas contrações convulsivas, também através da sua ação nos canais de íons cálcio das células nervosas (ZHIJIAN et al., 2006). As toxinas excitatórias e depressivas são ferramentas usadas para estudos farmacológicos dos canais de sódio em insetos e para desenvolver biopesticidas seletivos para insetos (STEWART et al., 1991; TOMALSKI; MILLER, 1991).

Segundo Zlotkin et al. em 1972, quando injetada a toxina insetotóxica (pode paralisar ou matar insetos) em camundongos, não houve efeito tóxico, e as toxinas que afetam os camundongos não afetaram os insetos.

1.2.2 Peptídeos neurotóxicos e canais de cálcio

Canais de íons Ca^{+2} ativados por voltagem são os transdutores chave da sinalização elétrica, convertendo a despolarização da membrana celular a um influxo de íons de cálcio que inicia a contração, secreção, neurotransmissão, e outros eventos intracelulares reguladores (CATTERALL, 2000).

Os íons Ca^{+2} desempenham papéis importantes na regulação de uma variedade de funções celulares. A concentração intracelular de íons Ca^{+2} (10^{-7} M) é menor que sua

concentração extracelular (1 a 2 mM), e pode se tornar como um segundo acoplador do receptor de mensagens para ativar muitos processos celulares tais como a excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, metabolismo intracelular e expressão gênica, quando ocorre um aumento transitório deste íon internamente à célula. O aumento da concentração de íons Ca^{+2} é mediado por canais dependentes de voltagem que regulam influxo desse íon através da membrana plasmática. Avanços em campos de pesquisa, como a biologia molecular, farmacologia e eletrofisiologia levaram à identificação de diversos subtipos de canais de Ca^{+2} dependentes da voltagem (CATTERALL, 2000; ASHCROFT, 2000; CATTERALL et al., 2005a).

Os canais de cálcio são divididos em três grupos: grande condutância de íons K^{+} ativada pelos íons Ca^{+2} (BK), intermediária condutância de íons K^{+} ativada por íons Ca^{+2} (IK) e baixa condutância de íons K^{+} ativada pelos íons Ca^{+2} (SK). BK quando ativado sinergicamente pela despolarização do potencial de membrana pela alta concentração de íons Ca^{+2} intracelular, os permite que os íons de potássio saiam da célula, influenciando na repolarização da membrana ao seu estado de repouso. Os grandes canais estão presentes no músculo liso, no cérebro na região que controla as funções motoras, possuem um papel importante na audição, na imunidade e proteção contra os efeitos da isquemia das mitocôndrias cardíaca. Defeitos nestes canais podem ocorrer por mutações contribuindo com condições patológicas como a hipertensão, epilepsia e retinopatia diabética (SUPPIRAMANIAM et al., 2010).

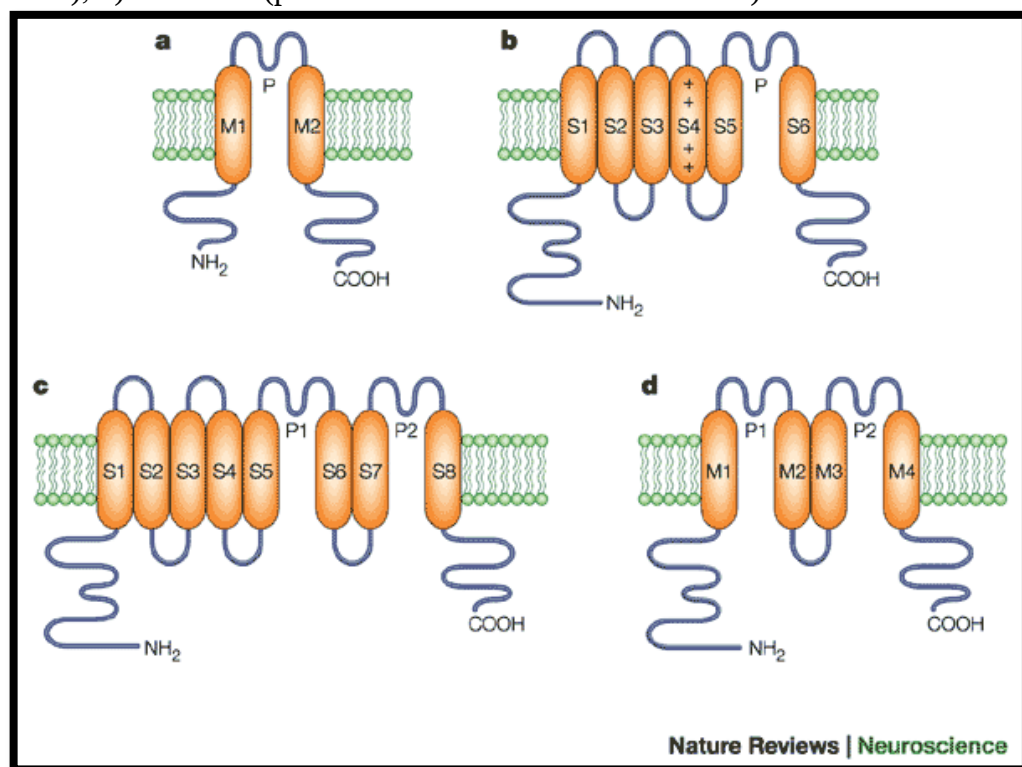
A toxina *Kurtoxin* (KT) do escorpião *Parabuthus transvaalicus* é um inibidor do canal de cálcio. Em culturas de cardiomiócitos, 90% dos canais de cálcio foram inibidos com $1 \mu\text{molL}^{-1}$ de KT (HORIBA et al., 2008). Outras duas toxinas parecidas com KT foram isoladas de outra espécie de escorpião *Parabuthus granulates* e demonstraram diminuir a atividade do canal em células espermato gênicas de camundongo. Inibem a reação acrossômica, o qual é importante para a fertilização dos óvulos pelos espermatozoides (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2003). IpTxA e IpTxI do escorpião *Pandinus imperator* (VALDIVIA; POSSANI, 1998) e Maurocalcine (Mca) de *Scorpio maurus palmatus* (FAJLOUN et al., 2000), o qual ativa o receptor de rianodina (RyR), um canal que libera íons de cálcio no meio intracelular.

1.2.3 Peptídeos neurotóxicos e canais de potássio

Os canais de íons K^{+} são notáveis por sua diversidade (fig. 7), os quais incluem 40 tipos de canais diferentes (GUTMAN; CHANDY, 1993). São classificados em 12 subfamílias

distintas com base na homologia das sequências de resíduos de aminoácidos (KV1 a KV12) (TYTGAT et al., 1999). O canal do poro é formado por quatro subunidades, sendo que cada subunidade possui seis domínios transmembranares (S1 a S6) e tanto o C-terminal quanto o N-terminal estão localizados intracelularmente. Cada região entre S5 e S6 das subunidades forma a unidade seletiva (região P) (GUTMAN et al., 2003; SUPPIRAMANIAM et al., 2010).

Figura 7: Subtipos de subunidades- α de canais de íons K^+ . a) 2 TM/P (duas subunidades transmembranas e uma região P); b) 6 TM/P; c) 8 TM/2 P (híbrido entre um canal 2 TM/P e um 6 TM/P); d) 4 TM/2 P (possível fusão de dois canais 2 TM/P).



Fonte: Figura retirada de Choe, 2002.

A nomenclatura KCN foi desenvolvida pela *Human Genome Organization* (HUGO), sendo que os canais de voltagem de K^+ que tivessem 65% de identidade da sequência ou mais foram designados como uma subfamília. (WHITE et al., 1997). Esta nomenclatura era falha, pois ignorava as relações entre estrutura e filogenia. A nomenclatura Kv foi baseada na dedução das relações filogenéticas, inicialmente, foi criada possuindo com seis grupos (Kv1 a Kv6) e por muito tempo não houve alterações, porém com a descoberta de novos genes, a nomenclatura Kv atualmente possui 12 grupos (Kv1 a Kv12) (GUTMAN et al., 2003).

Os canais de íons K^+ ativados por voltagem são ativados pela despolarização, e o movimento de saída de íons K^+ através deles repolariza o potencial de membrana para acabar

com os potenciais de ação, hiperpolariza o potencial de membrana imediatamente após os potenciais de ação, e desempenha um papel fundamental na definição do potencial de repouso da membrana. Desta forma, canais de íons K^+ controlam a sinalização elétrica em células excitáveis e regulam o fluxo de íons de cálcio transientes em células não excitadas (CATTERALL et al., 2007). Eles possuem um papel crítico na regulação da excitação dos neurônios, duração do potencial de ação, secreção de hormônios, relaxamento do músculo liso e repolarização do músculo cardíaco (SANDHIYA; DKHAR, 2009) proliferação celular e regulação do volume celular.

Os peptídeos das toxinas de escorpião que possuem cadeias curtas (28 a 46 resíduos de aminoácidos) bloqueiam principalmente canais de potássio através da oclusão física do vestíbulo externo do poro, sem afetar a dinâmica da estrutura do canal. A interação entre o peptídeo e o canal se dá pelas interações de cargas negativas do canal com cargas positivas do peptídeo (GWEE et al., 2002; CATTERALL et al., 2007). A toxina Iberiotoxina (IbTx) isolada do escorpião *Buthus tamulus* possui 37 resíduos de aminoácidos é extremamente seletiva, inibindo somente os grandes canais de íons K^+ (*maxi- K^+ channel*) (GARCIA et al., 2001; CHOE, 2002).

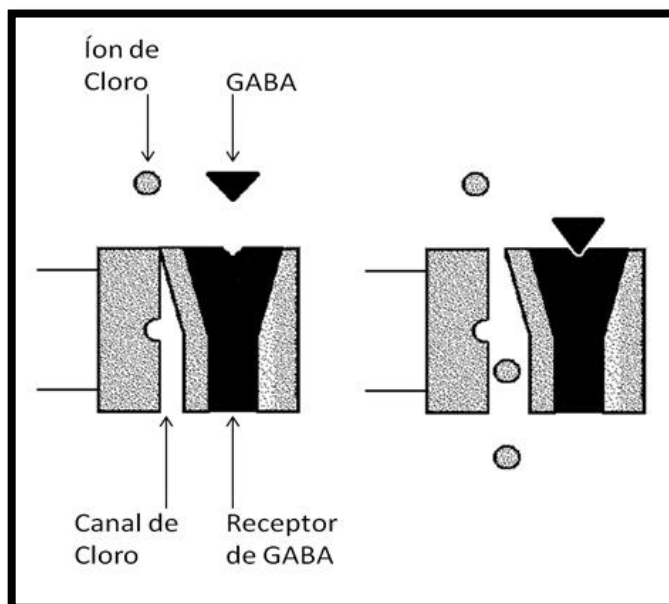
Escorpiões que não são venenosos aos humanos, espera-se que tenham toxinas que interagem com os canais de íons K^+ , que são específicas para artrópodes (insetos e/ou crustáceos) (GÓMEZ-LAGUNA et al., 1996).

1.2.4 Peptídeos neurotóxicos e canais de cloro

Os canais de íons Cl^- (CICs) estão presentes na membrana plasmática e organelas intracelulares. Existem duas classes de canais de íons Cl^- ativados por voltagem que foram molecularmente identificadas: genes da família CIC e reguladores transmembrana de condutância da fibrose cística (CFTR) (JENTSCH et al., 2002). Estes canais mediam o fluxo de íons Cl^- e prótons através das membranas de muitos tipos celulares incluindo neurônios, células epiteliais e células do músculo esquelético em mamíferos, os quais atuam como estabilizadores do potencial de membrana (SUPPIRAMANIAM et al., 2010).

Os canais de íons Cl^- estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, tais como o controle do volume das células, transporte através das membranas e controle da excitabilidade celular como componentes dos receptores GABA do sistema nervoso central tanto no vertebrado quanto no invertebrado, e acidificação de organelas intracelulares (fig. 8).

Figura 8: O receptor de GABA ao ser ativado abre o canal de cloro permitindo a passagem dos íons Cl^- .



Fonte: Figura modificada e desenvolvida pelo autor.

As toxinas de escorpiões que interagem com canais de íons Cl^- são polipeptídeos de reduzidas massas moleculares, que consistem de 35-38 resíduos de aminoácidos, cujas estruturas tridimensionais são mantidas por quatro ligações de dissulfeto. Eles têm propriedades diferentes das toxinas de cadeia curta que interagem com canais de íons K^+ , e também das toxinas de cadeia longa que interagem com canais de íons Na^+ , as quais também possuem quatro pontes de dissulfeto (SUPPIRAMANIAM et al., 2010).

Várias toxinas que interagem com os canais de cloro já foram descobertas, porém só uma possui sua identidade molecular conhecida e foi identificada como inibidora do canal, *Georgia anion toxin 1* (GaTx1), isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Lqh) que inibe os CFTR (MATTHEWS et al., 2007).

Uma das mais importantes toxinas é a clorotoxina, um peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos encontrado no veneno do escorpião *L. quinquestriatus*, a qual bloqueia pequenos condutores de íons Cl^- em epitélio de camundongos e também liga-se à células tumorais do glioma. Portanto, derivados desta toxina que inibem a proliferação das células tumorais podem vir a ter uso terapêutico em alguns cânceres (LYONS et al., 2002).

1.3 Análise dos peptídeos neurotóxicos

Os peptídeos neurotóxicos ou DBPs normalmente são analisados através da técnica de administração intracisternal (IC) em ratos. Esta técnica pode ser feita com a implantação

crônica ou não de uma cânula. No primeiro caso, há a implantação de um cateter o qual permite o livre movimento do rato na caixa e tem como vantagem a eliminação de anestesia no momento do teste, porém como desvantagem, é muito mais invasivo e traumático, o procedimento cirúrgico é complicado e a canulação deixa o animal altamente susceptível a infecções e pode ocorrer a oclusão do cateter (SOVAK et al., 1980; TAKASUGI, 2005). No segundo caso, sem a implantação da cânula, os animais são anestesiados e fixados em um estereotáxico (fig. 9) o qual mantém o rato com a cabeça flexionada ventralmente, então é introduzida uma agulha e administrada a substância de interesse, realizando as análises somente após o efeito da anestesia terminar. A IC de materiais fornece um meio de avaliar diretamente a toxicidade neural (WIBLE et al., 1995).

Figura 9: Estereotáxico padrão para ratos e camundongos.



Fonte: Figura retirada de Analítica.

Nos experimentos de Nencioni et al. (2009), foram utilizados três grupos de ratos *Wistars*, o primeiro grupo, o qual estava fixo em um estereotáxico e anestesiado, recebeu 2 μ g da toxina TxTS (polipeptídeo do veneno do escorpião Ts) administrado via IC através de uma cânula guia de microdiálise, o segundo grupo recebeu intraperitonealmente Riluzol (5 mg/kg de peso do animal) (neuroprotetor e bloqueador da neurotransmissão do glutamato) 15 minutos antes de receber a toxina (2 μ g de TxTS) por IC e um controle que foi administrado solução salina. Através da mesma cânula foram coletadas amostras e analisadas por um HPLC, foi feita a histologia do local onde foi implantada a cânula e os eletrodos, e o eletroencefalograma e observações de comportamento também foram analisados. O grupo que recebeu somente a toxina teve os níveis de glutamato extracelular aumentado por seis horas ou mais, apresentou alterações no eletroencefalograma e na histopatologia. O grupo que foi administrado Riluzol não apresentou diferenças entre o grupo controle, não possuía danos ou

perdas neuronais ou alterações no eletrográfico e manteve o padrão de comportamento normal.

Bertazzi et al. (2003), injetaram o peptídeo TsTX-I purificado, neurotoxina majoritária do veneno de Ts (ARANTES et al., 1989), também chamada de Ts1 ou toxina-g, e o veneno bruto no sistema complemento (SC- é composto por proteínas de membrana plasmática solúveis no sangue que participam das defesas inatas (natural) e adquiridas (memória), essas proteínas reagem entre elas para opsonizar os patógenos, induzindo uma série de respostas inflamatórias que auxiliam no combate à infecção) de ratos machos Wistar. Os resultados mostraram aumento significativo da atividade tanto para a via clássica, quanto para a alternativa, tendo seu pico de atividade após uma hora. Efeitos observados 24 horas após a injeção de ambas as amostras são provavelmente consequências de um aumento da síntese de componentes do SC, induzido por meio da reação inflamatória de envenenamento. Os efeitos observados com o veneno bruto e a TsTX-I são muito semelhantes, sugerindo desta forma que muitas das alterações induzidas pelo veneno são devidas à presença da TsTX-I, sua principal toxina. No entanto, é evidente que o veneno apresenta outros componentes capazes de afetar o SC, visto que as alterações induzidas pelo veneno são mais intensas do que as induzidas por TsTX-I com a mesma dose.

Em outro estudo, avaliou-se a capacidade do veneno de Ts (TsV) em ativar o SC, investigando sua atividade *in vitro* sobre a via clássica/lectina e atividade lítica no sistema alternativo e na clivagem dos fatores B e C3, assim como a sua capacidade de induzir quimiotaxia de neutrófilos. Foi descoberto que o TsV induz a redução da atividade hemolítica em função do aumento da dose e do tempo de exposição, tanto na via clássica quanto na via alternativa. Contudo, o veneno foi incapaz de lisar eritrócitos de coelho e cabra. Alterações na mobilidade eletroforética nos fatores B e C3, após a incubação do soro humano com TsV, foram idênticas às obtidas com zymosan (controle positivo) (BERTAZZI et al., 2005).

A fim de investigar se ocorreria desgranulação de mastócitos em ratos pela ação do veneno de escorpião, Liu et al. (2007) injetaram o veneno do escorpião asiático, *B. martensi* Karsch (BmK), tanto puro quanto uma fração (BmK I) na pata traseira de ratos adultos machos Sprague-Dawley; após 15 e 30 minutos da injeção foi observado desgranulação de mastócitos e 72 horas após, a maior parte dos mastócitos estavam inativos.

As técnicas analíticas modernas permitem isolar e determinar a estrutura de neurotoxinas a nível de picomol. Entretanto, o fracionamento biomonitorado da amostra em ensaios com injeções simples utilizando insetos, vertebrados ou crustáceos de grande tamanho consomem uma grande quantidade de amostra (veneno) para ser investigado. Para conseguir

estudar essas amostras muito pequenas, os pesquisadores Escoubas, Palma e Nakajima, em 1995, desenvolveram um método de microinjeção utilizando micropipetas de vidro e indivíduos adultos de *Drosophila melanogaster* como insetos teste.

Valk e Meijdem, em 2014, realizaram ensaios de LD50 (“*Lethal Dose*”, dose letal para 50% dos indivíduos) em dois sistemas diferentes: embriões de galinha com cinco dias e larvas de besouro da espécie *Tenebrio molitor*. Foi utilizado o veneno bruto e a fração solúvel em água de cinco escorpiões *Hadrurus arizonensis*, *Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus australis*, *Grospus grandidieri* e *Heterometrus laoticus*. Os resultados não mostraram diferenças significativas somente entre os ensaios com o veneno bruto e sua fração solúvel. Somente no caso da fração solúvel de *H. laoticus* foi mais mortal que o veneno bruto, esta diferença apareceu apenas no ensaio com embriões de galinha. Em tenébrios, este resultado não foi observado, sendo o veneno bruto foi tão tóxico ou mais do que sua fração solúvel. Nos dois casos, o veneno de *L. quinquestriatus* foi o mais tóxico (0,17 µg por embrião) e *H. laoticus* o menos tóxico (61.6 µg por embrião). Este experimento sugere que ensaios com embriões de galinha sejam uma alternativa ao uso de ensaios com roedores para os estudos de LD50 com venenos de escorpiões.

Algumas toxinas, específicas de insetos (insetotoxinas) possuem alta afinidade com neurônios de insetos, porém baixa com neurônio de ratos (FROY et al., 1999a), têm uma estrutura e modo de ação característicos, e possuem um local de ligação único ao receptor do canal de sódio de insetos (ZLOTKIN, 1987; GORDON et al., 1998). Ao contrário de todas as outras toxinas com longas cadeias, de 60 a 65 resíduos de aminoácido, e um padrão altamente conservado de quatro pontes dissulfeto, as toxinas excitatórias são compostas por 70 resíduos de aminoácidos, e uma das suas pontes dissulfeto é deslocada (DARBON et al., 1982; OREN et al., 1998).

Insetos praga ou transmissores de doenças são grandes ameaças aos seres humanos e à agricultura, trazendo mortes e queda na produção de alimentos. Para tanto, os testes de insetotoxicidade são importantes para o descobrimento de toxinas que podem servir de biopesticidas específicos (OREN et al., 1998; ORTIZ, POSSANI, 2015).

Segundo Liu et al. (2015), o uso de plantas geneticamente modificadas (transgênicas) para serem resistentes a pragas diminui a perda na produção e o uso de pesticidas. A fim de controlar as pragas de arroz, tabaco e *Arabidopsis*, este grupo de pesquisadores transfectaram o gene da neurotoxina do escorpião *Androctonus australis* (AaIT – *A. australis insecticidal toxin*) fusionada à proteína GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*). Comparando as plantas de tabaco e *Arbidopsis* que tinham os dois genes AaIT/GNA com aquelas que só tinham um dos

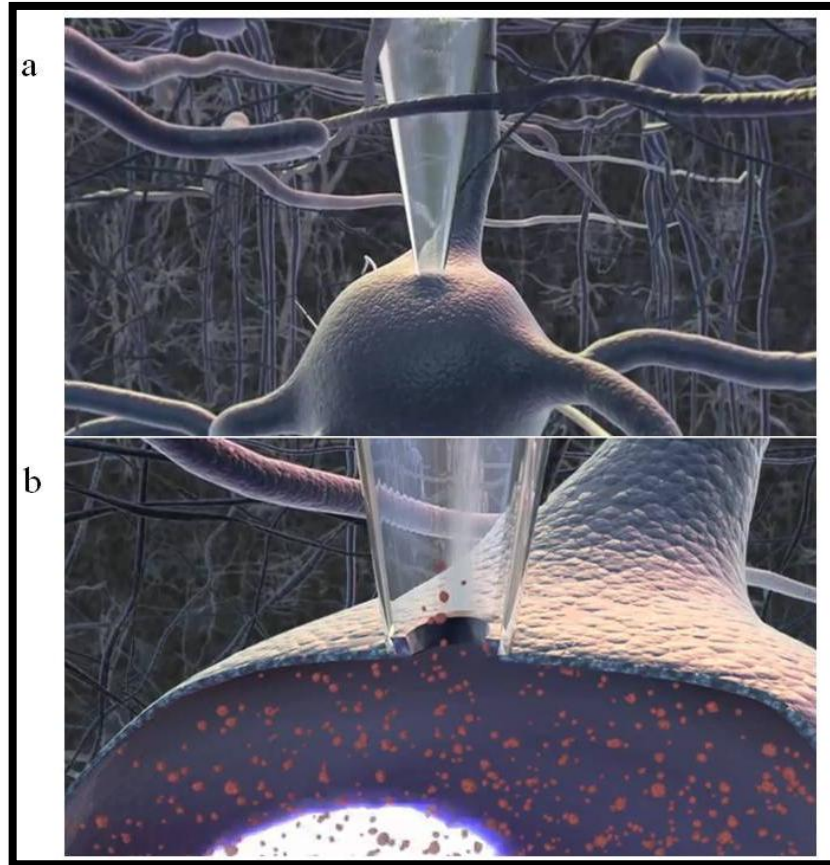
dois genes inseridos, elas exibiram resistência e toxicidade aumentada em uma praga, a lagarta de *Helicoverpa armigera*. As plantas transgênicas de tabaco e arroz que expressavam AaIT/GNA demonstraram aumento na resistência e toxicidade contra *Bemisia tabaci* e *Nilaparvata lugens*, respectivamente. Além disso, as plantas transgênicas de arroz com AaIT/GNA exibiram uma melhora significativa na produção de grãos quando infestado com *N. lugens*. Desta forma, demonstraram que as proteínas fusionadas podem ser uma solução para o controle de pragas que não são susceptíveis à toxina do gene de *Bacillus thuringiensis* mais comumente utilizado em transgenia destas plantas.

1.3.1 Análise por eletrofisiologia e “patch-clamp”

O registro da atividade elétrica de uma célula inteira ou de uma rede de células detecta muitos canais iônicos e receptores funcionando simultaneamente, o que dificulta a compreensão da importância de cada um desses eventos. O patch-clamp é uma técnica comumente usada em experimentos de eletrofisiologia para estudar a atividade elétrica de células, em particular de neurônios, as principais células do sistema nervoso. Ela permite uma visão direta das propriedades de um canal iônico através das suas atividades características. Esta técnica pode ser usada para estudos de interação entre drogas e canais iônicos específicos em diferentes estados conformacionais para entender seus mecanismos de modulação (YAJUAN et al., 2012).

O experimento de patch-clamp convencional utiliza microeletrodos de vidro (0,5 a 1 µm de diâmetro) que são posicionados rente à superfície de uma célula para formando uma interação forte, com um selo de resistência na casa de giga-ohm (GΩ) entre a membrana celular e a ponta do microeletrodo (fig. 10a). A corrente que flui através da membrana plasmática pode ser medida diretamente através do controle da tensão aplicada à membrana, e pode ser gravada pelo eletrodo que é conectado por um amplificador extremamente sensível. Esta técnica permite um alto grau de flexibilidade nas configurações de gravação, incluindo análise da célula (sem romper a membrana), análise de células inteiras (fig. 10b), análises do tipo “dentro para fora” e “de fora para dentro” (YAJUAN et al., 2012). Eletrodo é capaz de detectar as correntes elétricas e troca de íons que ocorrem na pequena área da membrana analisada. Dessa maneira, é possível estudar a atividade elétrica relacionada a um único tipo de canal iônico ou receptor de neurotransmissor, separado dos muitos outros presentes na mesma célula, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Figura 10: a) Desenho representativo da ponta do microeletrodo da técnica de patch-clamp tocando um neurônio e sugando uma pequena parte da membrana para o seu interior; b) Ponta do microeletrodo da patch-clamp realizando a análise da célula inteira; o microeletrodo faz uma pequena sucção, arrebentando a membrana e entrando em contato com o meio intracelular.



Fonte: Figura retirada do vídeo de Kodandaramaiah et al., 2012.

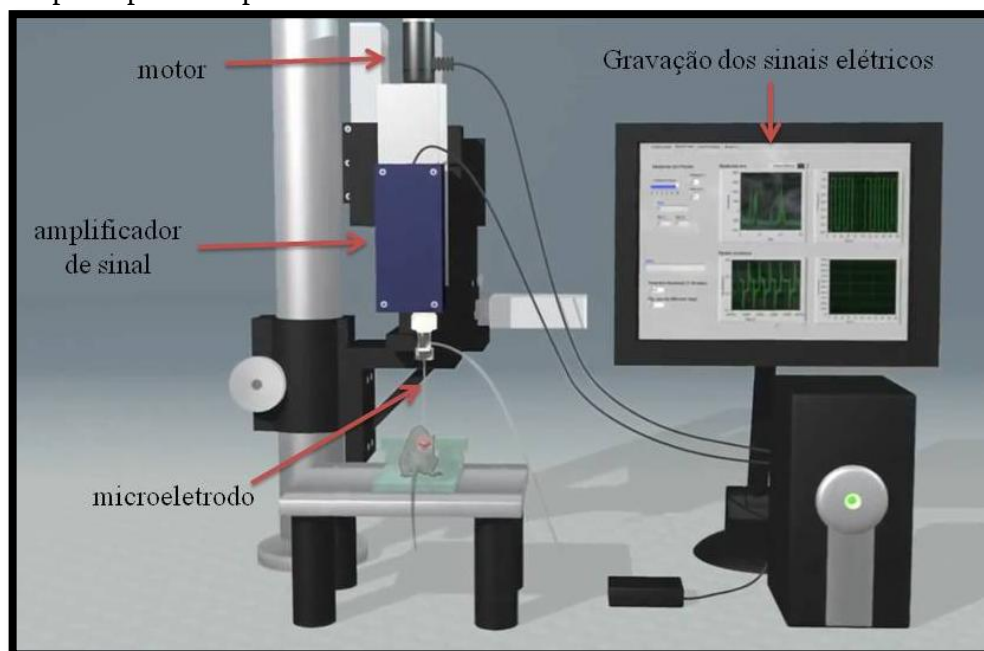
A maior dificuldade da técnica é estabelecer a concentração interna da solução para que não haja diferenças osmóticas entre ela e o neurônio. Esse tipo de estudo é importante para se entender o que acontece em muitas patologias do cérebro, nas quais certo tipo de canal ou receptor de neurotransmissor está alterado.

Para os estudos básicos de excitabilidade elétrica são utilizados, geralmente, neurônios de lulas ou de caracóis gigantes simplesmente pelo fato destes neurônios serem grandes, o que facilita a manipulação. Alguns pesquisadores preferem utilizar células de mamíferos, mas elas são muito pequenas e de difícil manipulação (SAKMANN; NEHER, 1984).

Esta técnica pode ser utilizada *in vivo* (fig. 11), em animais anestesiados e acordados. Nos animais anestesiados, os batimentos cardíacos e respiração estão relativamente estáveis e lentos, desta forma, minimiza-se a interferência nos microeletrodos, que é crucial para as gravações *in vivo*. Entretanto, muitas das funções cerebrais só podem ser mensuradas em animais acordados ou até mesmo com liberdade de locomoção. Já a anestesia somente deve

ser usada se for extremamente necessária dependendo da pergunta científica levantada e o desenho do experimento (TAO et al., 2015).

Figura 11: Patch-clamp automático sendo utilizado em uma demonstração de experimento *in vivo* e seus principais componentes.



Fonte: Figura retirada e modificada do vídeo de Kodandaramaiah et al., 2012.

Mlayah-Bellalouna et al., em 2014, testaram as toxinas AaTX1 (nativa), AmmTX3 (toxina recombinante de AaTX1) e sAaTX1 e sAmmTX3 (peptídeos sintéticos) em canais do tipo K_v4 (canal de potássio) usando gravações com patch-clamps em células inteiras de neurônios compactos dopaminérgicos de camundongos com 14 a 212 dias de vida. Nestes neurônios a atividade é exclusiva dos canais K_v4 (LISS et al., 2001). Constataram que a atividade nos canais K_v4 do AmmTX3 é idêntica ao AaTX1, que liga ao canal confirmando a alta atividade desta toxina mesmo com uma concentração a um nível submicromolar (253 nM), inibindo 90% dos canais. O AmmTX3 possui quase as mesmas características, com concentração de 350 nM da toxina. Estas concentrações não são estatisticamente diferentes tanto quando testadas com neurônios dopaminérgicos de camundongos ou ratos. Análogos sintéticos de AaTX1 serão ferramentas muito importantes para o estudo do canal K_v4 e como modelo de biomoléculas terapêuticas contra doenças que envolvem estes canais (potássio), tal como a epilepsia, Alzheimer e doenças cardíacas (BIRNBAUM et al., 2004; DUAN et al., 2012).

1.4 Peptídeos lineares (sem ponte dissulfeto – NDBPs)

Uma segunda classe de toxinas de venenos de escorpiões é composta por peptídeos que não possuem o resíduo de cisteína em suas sequências (NDBPs – “*non-disulfide-bridged peptides*”), e a maior parte são catiônicos, apresentando estrutura secundária em hélices- α . Centenas de peptídeos neurotóxicos com pontes dissulfeto já foram caracterizados do veneno de escorpião, entretanto somente alguns peptídeos lineares foram identificados e caracterizados (ZENG et al., 2005). O peptídeo Parabutoporina pertence a esta classe e foi originalmente isolado do veneno do escorpião *Parabuthus schlechteri* (VERDONCK et al., 2000; WILLEMS et al., 2002). Os outros membros da classe são Pandininas-1 e -2 do escorpião *Pandinus imperator* (CORZO et al., 2001), Hadrurina da espécie *Hadrurus aztecus* (TORRES-LARIOS et al., 2000), Bmkbpp3 do escorpião chinês, *Buthus martensii* (ZENG et al., 2000), Opistoporina 1 e 2 do veneno de *Opisthophthalmus carinatus* (WILLEMS et al., 2002) (REMIJSEN; VERDONCK; WILLEMS, 2010). Pelo menos 40 peptídeos lineares já foram descobertos em venenos de escorpião (BAO et al., 2015).

Estes peptídeos (NDBPs) são uma nova classe de moléculas por suas características únicas como atividades antimicrobianas, imunológicas ou de sinalização celular (ZENG et al., 2005), matam bactérias gram-negativas e gram-positivas, vírus e células tumorais (BAO et al., 2015). Diferentemente dos peptídeos neurotóxicos com pontes dissulfeto, que interagem com canais de voltagem ativando ou bloqueando-os, os quais estão relacionados à paralisia da presa, os peptídeos lineares são em sua maioria voltados para a defesa do escorpião contra predadores, causando dor, inflamação, além de todos os sintomas que seres humanos têm ao serem feridos por escorpiões, sintomas que podem facilitar sua fuga. Outra diferença é que estes peptídeos não possuem a relação estrutura e função conservadas como os DBPs, são estruturalmente diferentes e demonstram atividade biológica em inúmeros alvos (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014).

Pouco se sabe sobre peptídeos antibacterianos de escorpião, visto que até então poucos peptídeos foram encontrados contendo essa característica. Contudo, os peptídeos antimicrobianos vêm ganhando a atenção de pesquisadores na busca de novos compostos que possam combater doenças infecciosas por já terem apresentado eficiência na morte de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos (CAO et al., 2012; FAN et al., 2011; YUAN et al., 2010; ZENG et al., 2013; ZHAO et al., 2009).

Algumas espécies de escorpião, como o *T. discrepans*, espalham o veneno em seus corpos a fim de combater fungos e bactérias. A presença de compostos antimicrobianos os

protegem de contaminações quando ferroad ou contra as hostilidades do meio ambiente (BULET et al., 2004).

1.5 Estudos dos peptídeos lineares

Gao, Tian e Zhu (2007) estudaram o veneno do escorpião chinês, *B. martensii*, e obtiveram evidências de polipeptídeos com ação antibacteriana. Nas condições testadas, o veneno somente apresentou ação sobre bactérias gram-positivas, mas não sobre gram-negativas. Observaram também que o escorpião chinês esguicha o veneno sobre escoriações no corpo, para controlar infecções causadas por microrganismos.

Visando utilizar o veneno de escorpiões como fungicidas biodegradáveis, Joya et al. (2011), fracionaram o veneno de *T. discrepans* em 65 frações, porém somente sete exibiram atividade anti-fúngica, contra a espécie *Macrophomina phaseolina* (fungo que tem uma ampla gama de hospedeiros e é responsável por causar perdas em mais de 500 espécies de plantas cultivadas e selvagens (KHAN, 2007)). As toxinas isoladas atuaram de três formas: inibindo esterases do fungo, alterando a permeabilidade de íons Na^+ da membrana e inibindo a síntese de ergosterol, ou substituindo-o por outros esteróis de membrana. Uma característica marcante destas toxinas é que elas parecem atacar simultaneamente dois ou mais alvos fundamentais para a sobrevivência do fungo.

Na revisão realizada por Petricevich (2010), foi demonstrado que os mediadores que ativam os processos inflamatórios podem ser liberados após envenenamento por escorpiões incluindo cininas, ecosanóides, fator ativador de plaquetas, fator de aumento da permeabilidade, óxido nítrico e citocinas. A liberação de citocinas e outros mediadores podem ser responsáveis por várias das manifestações inflamatórias observadas tais como a respiratória aguda, síndrome da angústia respiratória aguda, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e falência de múltiplos órgãos.

A fim de investigar se ocorreria desgranulação de mastócitos em ratos pela ação do veneno de escorpião, Liu et al. (2007) injetaram o veneno do escorpião asiático, *B. martensi* Karsch (BmK), tanto puro quanto uma fração (BmK I) na pata traseira de ratos adultos machos Sprague-Dawley; após 15 e 30 minutos da injeção foi observado desgranulação de mastócitos e 72 horas após, a maior parte dos mastócitos estavam inativos.

1.6 Inovação nas pesquisas dos peptídeos lineares

As publicações sobre toxinas de escorpiões se concentram nas toxinas peptídicas de ação neurotóxica, i.e., peptídeos que apresentam de 30 a 70 resíduos de aminoácidos em suas sequências, os quais compõem cerca de 70% da composição destes venenos. Estas publicações de uma maneira geral seguem protocolos experimentais padrão de purificação, desenvolvido há mais de 70 anos; nestes protocolos o veneno é extraído em tampão aquoso (CREST et al., 1992; DEBIN; MAGGIO; STRICHARTZ, 1993; ALI et al., 1998; ALMEIDA et al., 2002; BATISTA et al., 2004, 2006; SCHAFFRATH; PREDEL, 2014), e a primeira fase da purificação se baseia em cromatografia de exclusão molecular, utilizando colunas de Sephadex (G100 ou G200, principalmente). As frações coletadas são então re-fracionadas utilizando-se cromatografia de fase reversa. Estes protocolos não extraem os peptídeos lineares pequenos (apresentando de 5 a 20 resíduos de aminoácidos em suas sequências), que se tornaram, portanto, negligenciados pela literatura.

Em Crest et al. (1992) após estimular manualmente 200 escorpiões da espécie *Androctonus mauretanicus mauretanicus* o veneno extraído foi dializado em água destilada a fim de eliminar sais e pequenos peptídeos com massa molecular abaixo de 3500 Da.

Debin, Maggio e Strichartz, em 1993, extraíram o veneno de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* em água deionizada na proporção de 20 mg do veneno bruto desidratado por mililitro de água. Após centrifugar a amostra, recolheram o sobrenadante (praticamente sem o muco do veneno bruto) e passaram-no em um microfiltro para moléculas menores de 10 mil Da e feita uma nova centrifugação. Um HPLC equipado com uma coluna C18 foi utilizado para uma nova fase de purificação. A solução passou a ter 25% de acetonitrila em água e 10 mM de ácido trifluoracético (TFA), esta solução, por fim, foi liofilizada e ressuspendida em água com 10 mM de TFA.

Ali et al., em 1998, estudando o veneno de *B. Sindicus*, extraiu em água e centrifugou, o sobrenadante foi congelado seco para uso futuro. Realizou somente um passo de purificação em HPLC de fase reversa e coluna C18 e as frações foram analisadas em um espectrômetro do tipo MALDI.

Almeida et al. (2002) liofilizaram e solubilizaram em água e ácido acético 3 M o veneno dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahensis*. O sobrenadante foi recentrifugado e a fração solúvel foi purificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com gelatina (*SDS-PAGE-gelatin*). Para os testes de atividade proteolítica o gel foi corado com Coomassie Blue e

a proteólise da gelatina foi observada por comparação de géis (onde não houve coloração da banda, ocorreu proteólise).

Nos estudos de Batista et al., em 2004, o veneno do escorpião *T. cambridgei* foi solubilizado em água e centrifugado. 100 mL do sobrenadante foi analisado por cromatografia de fase reversa com uma coluna C18. As frações foram coletadas manualmente e liofilizadas.

Dois anos mais tarde (2006) Batista et al., estudando o veneno de *T. discrepans*, utilizaram os mesmos métodos, solubilizando o veneno em água destilada e centrifugando-o. O sobrenadante foi fracionado em HPLC em fase reversa. As frações também foram coletadas manualmente e liofilizadas.

Em 2014, Schaffrath e Predel extraíram o veneno de *Heterometrus cyaneus* em 35% de etanol contendo 0,1% de TFA para análises por espectrometria de massas utilizando um equipamento do tipo “MALDI” (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) com analisador do tipo “ToF” (*Time of Flight*).

D’Suze, Sandoval e Secvik em 2015 estudaram o veneno do escorpião *T. discrepans* extraíndo-o em água e centrifugando-o, o sobrenadante foi liofilizado e congelado para uso posterior. Esta amostra foi ressolubilizada em água e novamente centrifugada, por fim foi submetida ao fracionamento por HPLC em fase reversa equipada com coluna C18.

Em nosso grupo, Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica dirigido pelo Prof. Dr. Mario Sergio Palma, realizamos um processo diferente de purificação, no qual são utilizados protocolos para extração dos peptídeos pequenos, baseados no uso de uma solução de acetonitrila/H₂O 50% (v/v). Os peptídeos extraídos nestas condições são fracionados num sistema RP-HPLC, acoplado a um espectrômetro de massas, e realizadas análises de espectrometria de massas sequenciais para obtenção das sequências primárias dos peptídeos. Os peptídeos negligenciados são muito pouco abundantes e de difícil manipulação no veneno bruto, sendo assim, a utilização destes instrumentos mais sensíveis, nos permitiu a identificação e obtenção da sequência de aminoácidos de algumas dezenas de peptídeos.

Estes peptídeos por possuírem características diferentes dos demais já estudados, as análises sobre seus efeitos biológicos são baseados em testes característicos para peptídeos lineares, os quais já estão bem definidos, como: hemólise, desgranulação de mastócitos e liberação de lactato desidrogenase (LDH), antibiose, efeito hiperalgésico, efeito edematogênico e campo aberto. Para tanto, este projeto propõe a síntese de cinco peptídeos isolados do veneno de escorpião da espécie *T. serrulatus*, previamente identificados no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica e caracterizá-los de acordo com suas possíveis funções biológicas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram sintetizar cinco peptídeos isolados do veneno do escorpião *T. serrulatus* (tabela 2) e caracterizá-los de acordo com suas possíveis funções biológicas, através de ensaios de desgranulação de mastócitos e liberação de lactato desidrogenase, antibiose, hemólise, efeito hiperalgésico, efeito edematogênico e teste de campo aberto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese de peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados (tabela 2) no sintetizador automático Prelude (PROTEIN TECHNOLOGIES INC.). A síntese foi realizada pelo método de síntese em fase sólida, utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxycarbonil (estratégia Fmoc), onde em cada ciclo foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo HCTu (NOVABIOCHEM) como agente acoplante. Para as lavagens da resina e desproteção foi utilizado N-N-Dimetilformamida (SYNTH) e Metil-Piperidina (SIGMA), respectivamente. A clivagem e desproteção final foram feitas utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapurificada 5% (v/v). Após esta etapa, foi feita a precipitação do peptídeo utilizando Éter anidro (SIGMA). O peptídeo foi re-suspendido em água ultrapurificada (Advantage A10, MILLI-Q). O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS.

Tabela 2: Lista com os peptídeos, suas sequências de resíduos de aminoácidos e massa molecular (Da) que foram investigados no presente estudo.

	Sequência	Massa Molar (Da)
TyPep 14	KHFGKDSNFPF-NH ₂	1321,599
TyPep 15	ILTGKLKCL	1002,603
TyPep 16	GLREKHVQ	965,542
TyPep 17	GKGKEILGK	928,582
TyPep 18	ILPNDK	698,395

Fonte: Dados do autor.

3.2 Espectrometria de Massas

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização “*electrospray*” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas “IonTrap” e “Time-of-Flight” (IT-ToF) (SHIMADZU). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento.

Durante toda a análise a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200 °C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção

no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 250 a 4000, com uma resolução de aproximadamente 15000.

As análises de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica em condições de decomposição induzida por colisão (CID) (MS2) foram realizadas utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS1, exceto a varredura que foi feita num intervalo de m/z 50 a m/z 2500. Foi utilizado argônio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. O *software* LCMS solutions (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição de dados.

3.3 Atividade hemolítica

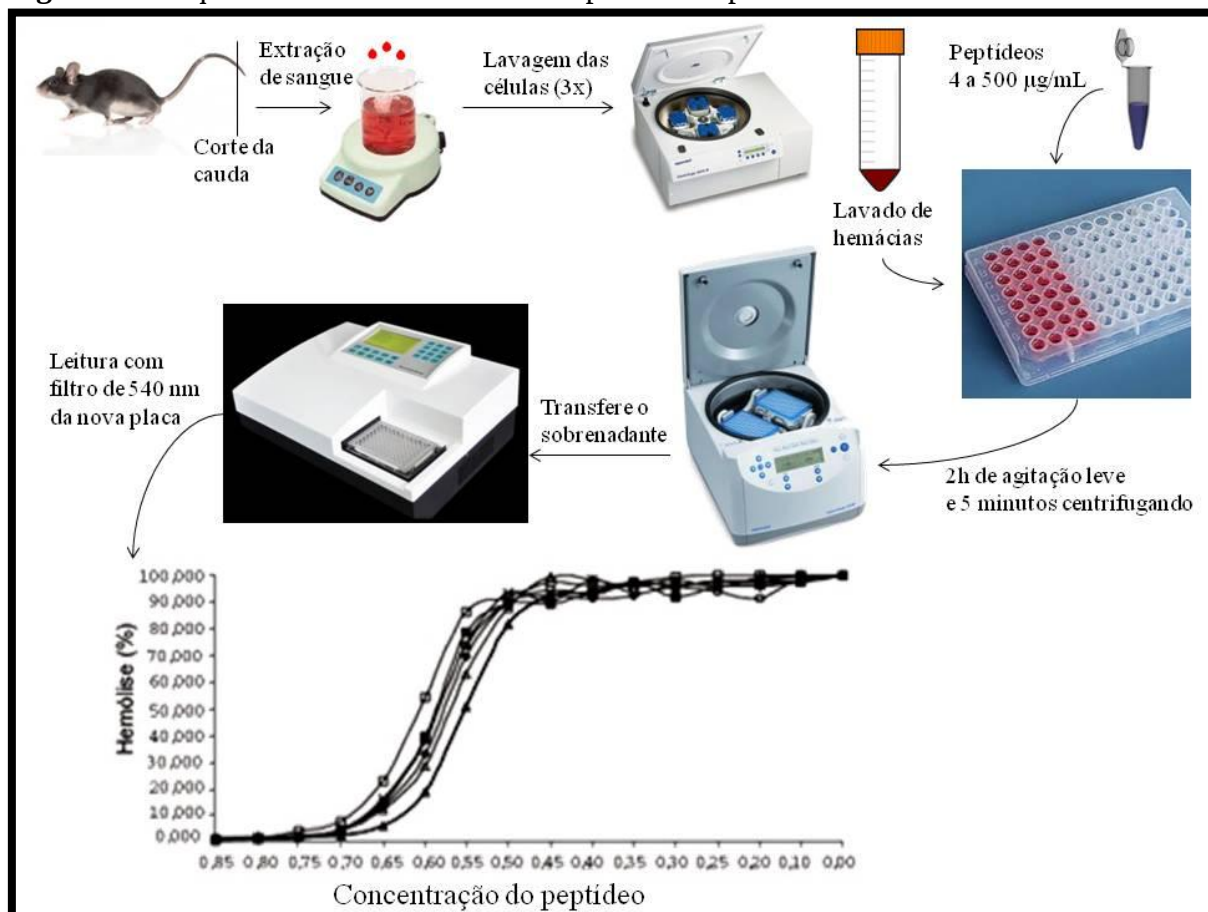
Componentes hemotóxicos podem participar na coagulação sanguínea, anticoagulação, hemorragia ou hemólise, levando ao colapso do sistema circulatório (DURAY et al., 1997).

O experimento de atividade hemolítica foi realizado utilizando-se cerca de 500 μ L de sangue extraído da cauda de ratos Wistars machos em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%, CaCl_2 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos, em agitador magnético (MA-089 MARCONI). A suspensão de eritrócitos foi centrifugada em presença de solução salina, em uma centrífuga clínica (Z-200A HERMLE) a 3000 rpm durante 15 minutos para lavagem das células. Esta operação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias obtido ao final das centrifugações foi considerado como sendo 100% de células. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 4% diluindo-se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão a 4% foi utilizada nos testes de atividade hemolítica.

Foram montadas baterias de ensaios em microplacas (COSTAR), onde cada orifício foi preenchido com o peptídeo solubilizado em solução salina (4 a 500 $\mu\text{g/mL}$) ou peptídeo controle (Melitina) nas mesmas concentrações. A cada orifício foram adicionados 90 μ L da suspensão de eritrócitos perfazendo um volume final de 100 μ L. Para o controle de 0% de hemólise foram adicionados 10 μ L de solução salina a 90 μ L da suspensão de eritrócitos; para o controle de 100% de hemólise, foram adicionados 10 μ L de solução salina acrescida de 1% (v/v) de Triton X-100 (SIGMA) a 90 μ L de suspensão de eritrócitos. Cada placa foi incubada à temperatura ambiente por duas horas sob agitação. Após este período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por cinco minutos a 3000 rpm em uma centrífuga para microtubos Eppendorf (modelo EPPENDROF 5415D). O sobrenadante de cada

preparação foi utilizado para a montagem de uma nova placa, para realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (AMERSHAM BIOSCIENCE, modelo Biotrak II), com filtro de 540 nm (fig. 12).

Figura 12: Esquema dos métodos utilizados para um experimento de atividade hemolítica.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

3.4 Atividade antibiótica

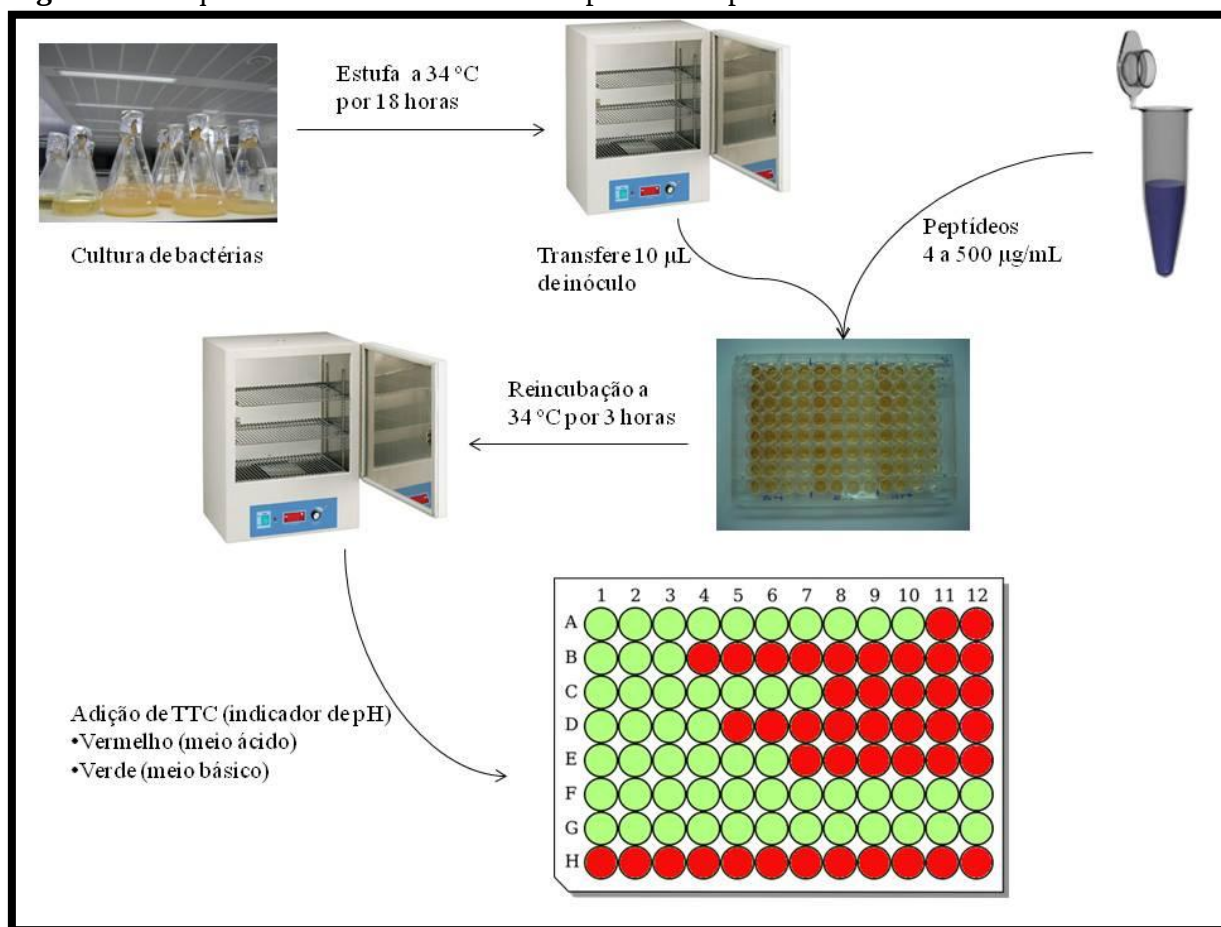
Durante as últimas décadas, houve a descoberta e uso farmacêutico de uma variedade de antibióticos e seu amplo uso no combate a infecções resultou no aumento progressivo da resistência de linhagens de microrganismos patogênicos a estes compostos, limitando progressivamente seu uso no combate a infecções. Os genomas procarióticos caracterizam-se pela elevada plasticidade e pelo enorme potencial evolutivo, incluindo a transmissão horizontal de genes, os quais fornecem através de seus produtos, a resistência a antibióticos, levando estes microrganismos terem um grande poder de adaptação (LÖFGREN, 2007). Recentemente, novas classes de antibióticos, incluindo peptídeos ou proteínas antimicrobianas

(AMP) de origem animal, têm sido extensivamente investigadas como alternativas a esse problema emergente (MATSUZAKI et al., 1997).

Os microrganismos utilizados para a realização dos antibiogramas foram duas espécies de bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *S. pneumoniae* (espécie clínica); e duas gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *E. aerogenes*, obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais do IBRC/UNESP. Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (DIFCO), meio de cultivo Müller-HintonBroth (DIFCO) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo material a ser utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (PHOENIX) por 20 minutos à 121 °C e 1 atm.

O inóculo foi preparado utilizando-se 2 mL de salina e uma “alçada” de células, previamente cultivadas, em Müller-Hinton Agar (DIFCO). Foi ajustada a concentração de células através da comparação com 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 µL do inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, esta suspensão foi utilizada nos testes com o peptídeo. A determinação do MIC (Concentração Inibitória Mínima, em inglês abrevia-se, MIC) foi realizada em microplacas (COSTAR), em triplicata, onde cada um dos orifícios foi preenchido com 90 µL da suspensão de células, 10 µL de solução de peptídeo (TyPep 14 a 18) ou antibióticos controle (Cloranfenicol e Oxitetraciclina) em concentrações que variaram de 0,5 a 500 µg/mL. Para o valor de referência zero, foram montados pocinhos contendo 90 µL de meio de cultivo Müller-Hinton e 10 µL de água Milli-Q. Para o valor de referência 100% foram acrescentados ao orifício 90 µL de suspensão de células, 10 µL de água. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34 °C por 18 horas. Após esse período, a cada orifício foram adicionados 10 µL de cloreto de Trifeniltetrazolium (TTC) 5% (m/v) em água. As leituras foram realizadas após três horas de re-incubação das placas em estufa a 34 °C (fig. 13).

Figura 13: Esquema dos métodos utilizados para um experimento de atividade antibiótica.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

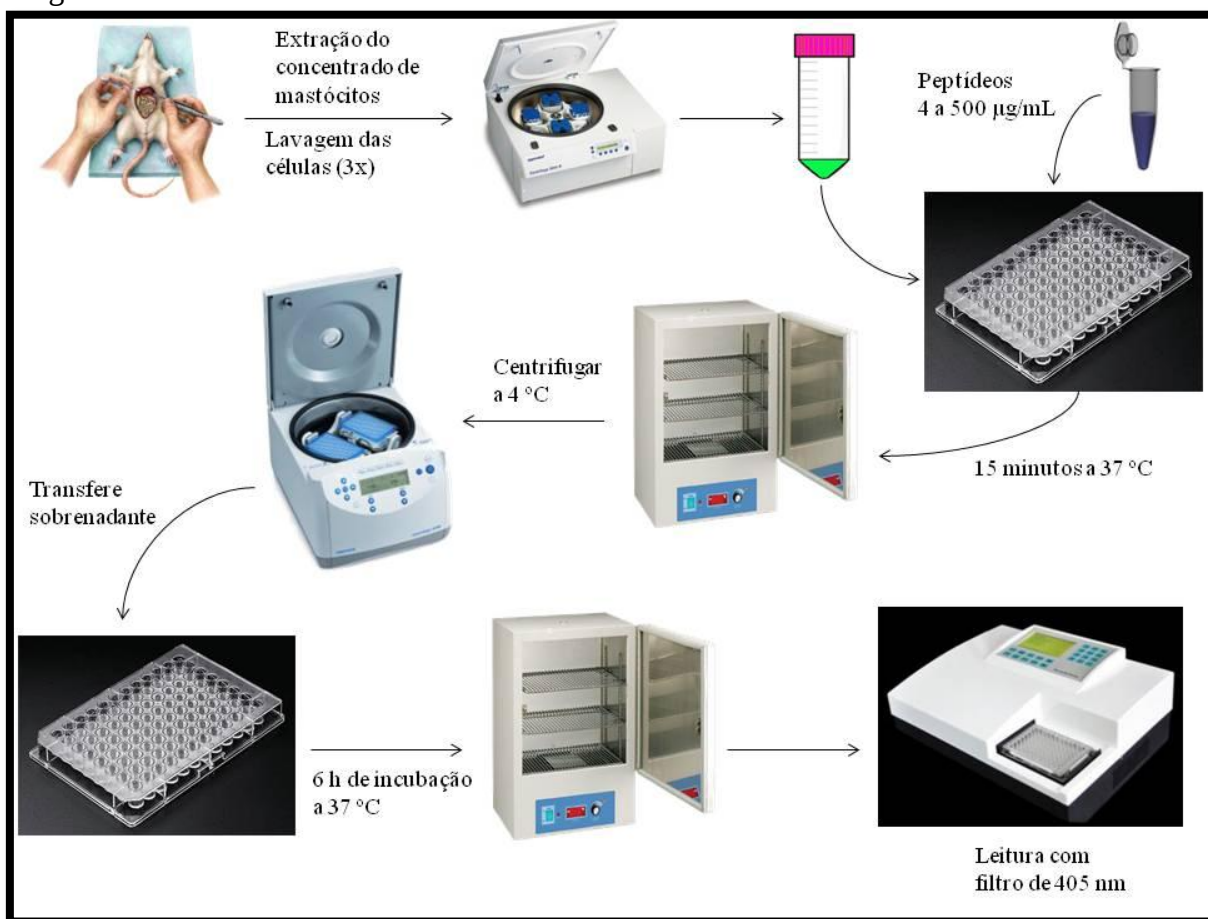
Neste experimento, não há a utilização da leitora de microplacas, o experimento é determinado pela observação da coloração final dos pocinhos, sendo aqueles indicados pela cor vermelha, local onde as bactérias cresceram produzindo CO₂, responsável por acidificar o meio, evidenciando que estas bactérias não sofreram nenhum efeito antibacteriano dos peptídeos; os pocinhos com coloração verde indicam que os peptídeos tiveram ação antibacteriana, não permitindo o metabolismo e produção de gás carbônico, mantendo assim o meio básico.

3.5 Atividade desgranuladora de mastócitos

A desgranulação de mastócitos é determinada através de medidas da liberação de β-D-glucosaminidase, que se co-localiza com a histamina nos grânulos dos mastócitos, segundo metodologia descrita por Hide et al. (1993), seu comportamento na liberação dos grânulos é determinada pela exocitose de “tudo ou nada” (fig. 14).

As células extraídas através da lavagem peritoneal de ratos *Wistar* foram incubadas em uma solução 150 mM NaCl (MERCK), 4 mM KCl (MERCK), 4 mM NaH₂PO₄ (SYNTH), 3 mM KH₂PO₄ (SYNTH), 5 mM glicose (SYNTH), 15 mM BSA (SIGMA) e 1 mM CaCl₂ (VETEC), contendo várias concentrações do peptídeo sintético (4 a 500 µg/mL) ou controle positivo (peptídeo HR1), por 15 minutos a 37 °C. Em seguida foram centrifugadas a 4 °C e, aos sobrenadantes, foram acrescentados p-nitrofenil-β-D-glucosamina (SIGMA) em solução 0,2 M de citrato de sódio (MERCK), com pH 4.5. Após seis horas de incubação a 37 °C foi feita leitura de absorbância a 405 nm em espectrofotômetro MF 200 UV-VIS (INCIBRÁS), medindo-se a taxa de p-nitrofenol formado.

Figura 14: Esquema dos métodos utilizados para um experimento de atividade desgranuladora de mastócitos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

Para suspensões de mastócitos, o final da secreção depende da força do estímulo. Qualquer que seja a concentração de um ligante dirigido ao receptor é aplicado a células intactas ou, a concentração de efetores intracelulares (íons Ca²⁺ e os nucleotídeos de guanina) aplicado a células permeabilizadas. Para medir o grau de secreção para as respostas ao nível

de uma única célula, é essencial assegurar que a todo seu conteúdo foi extravazado. Se não foi, a secreção parcial é determinada após um período fixo de tempo indicando que poderia ser devido a uma taxa mais lenta de liberação (HIDE et al., 1993).

3.6 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Essa atividade mede a liberação da lactato desidrogenase dos mastócitos (LDH) para o meio extracelular, como indicador de lise dos mastócitos pelo peptídeo. A LDH é uma enzima citoplasmática, que catalisa a redução reversível do piruvato a lactato, utilizando NADH como fonte de energia. A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos extraídos da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, como descrito para os ensaios de desgranulação de mastócitos (item 3.5) e cinco de repetições (n=5). Incubou-se 20 μ L do sobrenadante da suspensão de mastócitos com 800 μ L de tampão UV-LDH [Reagente 1 (TRIS 50 mM pH 7,4, ácido pirúvico 1,2 mM, EDTA 5 mM) 80% (v/v). Reagente 2 (NADH 0,18 mM) 20% (v/v)] por 5 minutos a 25 °C e os peptídeos (TyPep 14 a 18) ou peptídeo controle (HR1) com concentrações que variaram de 4 a 500 μ g/mL.

Após esse período, a cinética de consumo do substrato NADH foi monitorada pela medida do decréscimo da absorbância a 340 nm, durante 10 minutos a 25 °C. Os resultados foram inicialmente calculados como unidades catalíticas (micromols de NADH consumidos por minuto a 25 °C, pH 7,4). Esses valores foram convertidos em atividade relativa, através da atividade de LDH total (100%) da suspensão de mastócitos lisados, na presença de Triton X-100 0,1% (v/v).

3.7 Efeito hiperalgésico

O modelo de von Frey eletrônico (analgesímetro digital, fig. 15) é utilizado para avaliação dos efeitos hiperalgésicos (dor): os camundongos são colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas, pelo menos 30 minutos antes do início do teste, para adaptação comportamental. Os testes são realizados apenas quando os animais estiverem quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem lambe-rem seus membros (fig. 16). Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica é mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80,0 g (Insight Equipamentos

Ltda., Ribeirão Preto, SP, BRA). O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. Uma força perpendicular crescente é aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro é retirado. O teste é repetido até se obter três medidas subsequentes, de tal forma que a variação entre as medidas não são maiores que 1,0 g.

Os camundongos machos foram devidamente acondicionados na sala de experimentação um dia antes do experimento para a habituação com ciclos de 12:12 horas com luz acesa e no escuro (as luzes ligavam-se às 6:00 horas) e sob temperatura de 23 ± 1 °C, com água e ração *ad libitum*.

Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico ($20 \times 20 \times 30$ cm) sobre uma tela (cada orifício da tela possui 0.5×0.5 cm) e acondicionados por pelo menos 30 minutos para adaptação (fig. 16). Estes animais foram submetidos ao von Frey nos tempos zero (antes das injeções dos peptídeos ou salina), 60, 180 e 300 minutos após a administração, por via intraplantar, dos peptídeos com concentrações de 10 µg/30 µL e 30 µg/30 µL (utiliza-se mais de uma concentração para que obtenha uma precisão maior nos resultados) e salina (0,9% NaCl) com o mesmo volume final dos peptídeos (30 µL), sendo este último o controle negativo. Para o controle positivo foram utilizadas as curvas das respostas à carragenina com concentração de 1 e 25 µg/mL, respectivamente.

Figura 15: Analgesímetro digital (von Frey eletrônico).



Fonte: Insight.

Figura 16: Braço do aparelho von Frey eletrônico aferindo a hiperalgesia (dor) na pata traseira direita de ratos.



Fonte: Figura retirada de Hösch, 2015.

3.8 Efeito edematogênico

Para a realização do edema da pata é avaliado o efeito edematogênico (capacidade de causar inflamação) dos peptídeos. Os camundongos recebem uma aplicação intraplantar (em uma das patas) de peptídeos (10 µg/30 µL e 30 µg/30 µL) e 30 µL de salina (0,9% NaCl) como veículo controle. Para o controle positivo foram utilizadas as curvas das respostas à carragenina com concentração de 1 e 25 µg/mL, respectivamente. O volume da pata é aferido nos tempos zero (antes das injeções dos peptídeos ou salina), 60, 180 e 300 minutos após a injeção dos peptídeos (fig. 17), utilizando-se um paquímetro digital da marca MitutoyoR (Código 500-196-20B) de especificação 0-150 X 0,01 mm, paquímetro (modelo CD-6''CSX-B, MITUTOYO SUL AMERICANA Ltda) (fig. 18).

Os camundongos são devidamente acondicionados na sala de experimentação um dia antes do experimento para a habituação com ciclos de 12:12 horas com luz acesa e no escuro (as luzes ligavam-se às 6:00 horas) e sob temperatura de 23 ± 1 °C, com água e ração *ad libitum*. Este experimento utiliza os mesmos animais do item anterior (3.7) para as avaliações de edema nas patas, ou seja, passam pelos mesmos padrões de tratamento e condicionamento antes e após os experimentos.

Figura 17: Determinação do volume da pata através do paquímetro digital.



Fonte: Figura retirada de Silva, 2014.

Figura 18: Paquímetro digital.



Fonte: Figura retirada de Mitutoyo.

O aumento percentual do volume das patas foi calculado através da expressão:

$$A (\%) = (V_f - V_i) \times 100 / V_i$$

Onde:

A (%) = aumento percentual do volume da pata;

V_i = volume inicial da pata;

V_f = volume da pata após a injeção dos peptídeos, carragenina ou veículo (controle).

O resultado final é obtido subtraindo-se os valores controles (animais injetados com veículo) dos valores testes (animais injetados com os peptídeos).

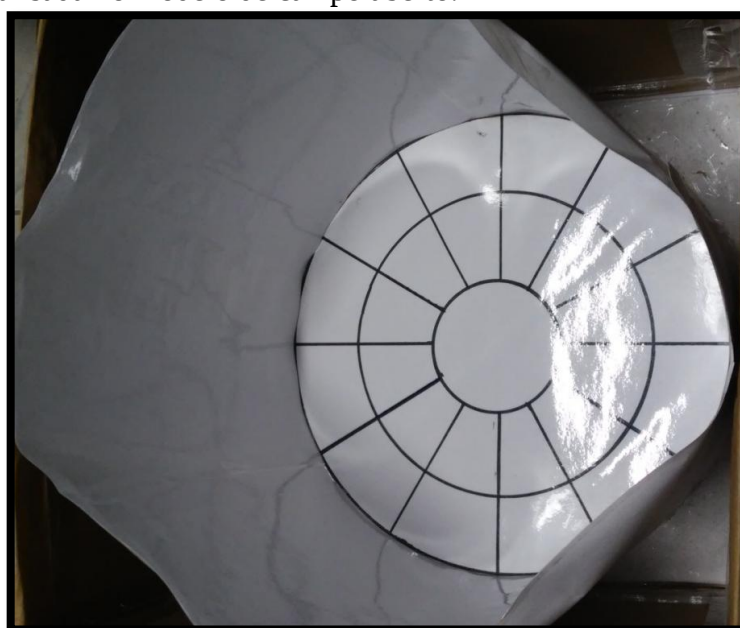
3.9 Avaliação da atividade geral dos animais analisada no modelo de Campo Aberto

Este teste é realizado com uma dose (10 mg/kg) e pela administração intraperitoneal (i.p.) dos peptídeos comparando os resultados obtidos com o grupo controle constituídos por

animais que receberam salina (0,9% NaCl). Desta maneira são avaliadas as respostas obtidas somente para a dose. As análises são feitas após 15 minutos da administração dos peptídeos ou salina.

O campo aberto para camundongos é uma arena de cartolina plastificada com formato cilíndrico de 40 cm de altura e base de 40 cm de diâmetro. A base da arena é subdividida em 25 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por três circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais (fig. 19).

Figura 19: Arena utilizada para os experimentos da avaliação da atividade geral dos camundongos analisada no modelo de campo aberto.



Fonte: Foto registrada pelo autor.

O campo aberto é utilizado para avaliação da atividade geral dos camundongos, que é determinada pela avaliação da frequência de locomoção (ato de o animal penetrar, com as quatro patas, em uma das divisões do chão da arena) e o de levantar (postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores). Os camundongos são colocados, individualmente, no centro da arena para observar as frequências de locomoção e de levantar, por um período de três minutos. Entre a observação de um indivíduo para outro a arena é higienizada com algodão embebido em álcool 5%.

Os animais são devidamente acondicionados na sala de experimentação um dia antes do experimento para a habituação com ciclos de 12:12 horas com luz acesa e no escuro (as luzes se ligavam às 6:00 horas) e sob temperatura de 23 ± 1 °C, com água e ração *ad libitum*.

3.10 Análise estatística

Os resultados dos itens **3.7**, **3.8** e **3.9** foram expressos como média $\pm$ SEM. Os dados referentes aos tratamentos foram estatisticamente examinados utilizando ANOVA de duas vias, seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Tukey ($p < 0,05$) (KLEINBAUM et al., 1998).

3.11 Comitê de Ética de Uso de Animais

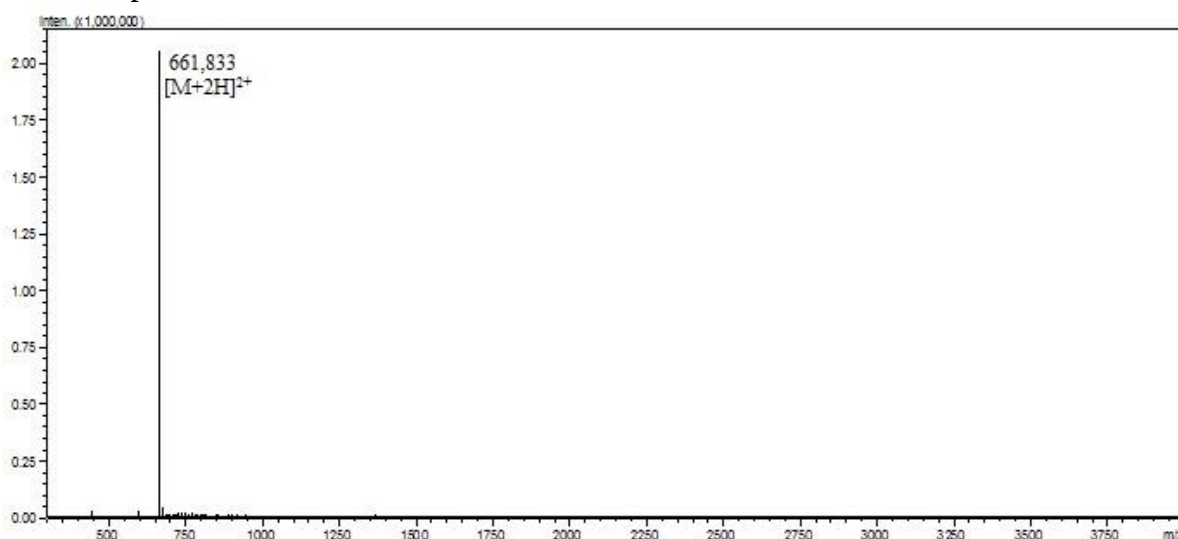
O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais responsável pela Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Rio Claro, sob protocolo 4192.

4 RESULTADOS

A síntese feita no sintetizador automático evita a contaminação dos reagentes pela manipulação, além disso, evita que o pesquisador se contamine com os gases tóxicos provenientes dos vários reagentes necessários à síntese. Este equipamento utilizado é capaz de sintetizar até seis peptídeos simultaneamente em algumas horas. O rendimento e pureza do peptídeo sintético foram extremamente altos necessitando apenas de uma purificação por um filtro com 0,45 μm de diâmetro dos poros para filtragem de eventuais contaminantes de grande tamanho.

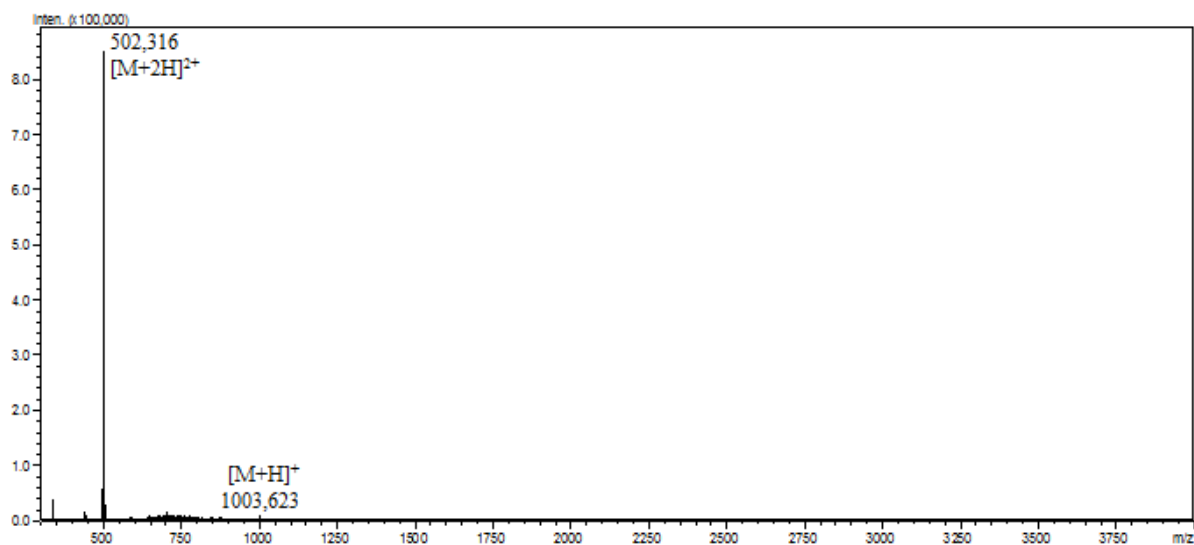
A qualidade da síntese foi avaliada pela análise em espectrometria de massas, o espectrômetro utilizado foi equipado com fonte de ionização “*electrospray*” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas “IonTrap” e “Time-of-Flight” (IT-ToF). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento. Os espectros de massa adquiridos a partir das análises dos peptídeos TyPep 14 a 18 estão relacionados nas figuras 20 a 24, respectivamente.

Figura 20: Espectro MS referente à molécula protonada do peptídeo TyPep 14, onde se pode observar o pico de m/z 661,833 na forma $[M+2H]^{2+}$.



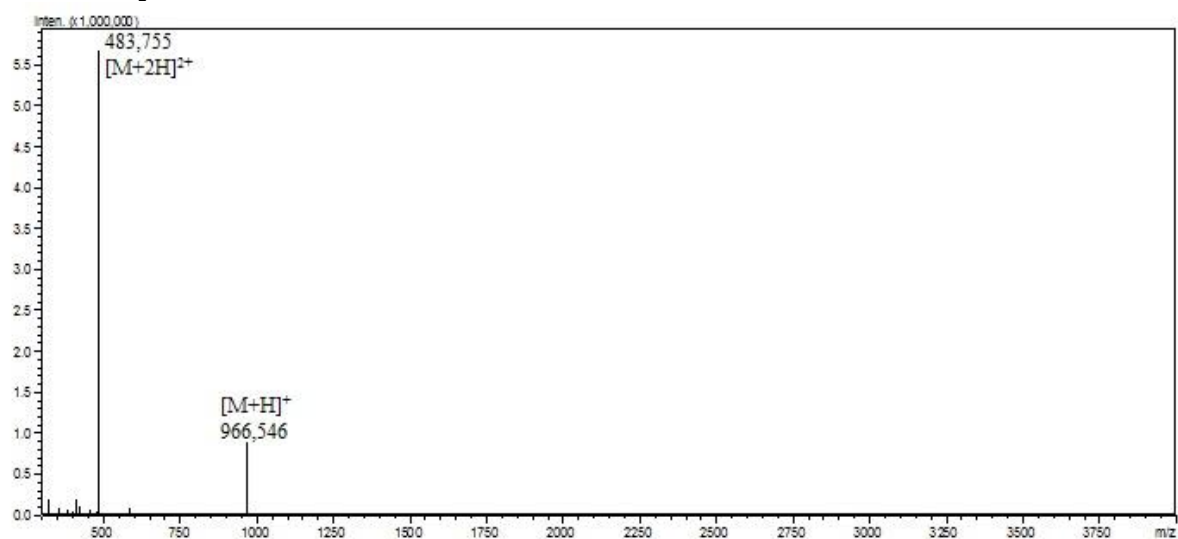
Fonte: Dados do autor.

Figura 21: Espectro MS referente à molécula protonada do peptídeo TyPep 15, onde se pode observar os picos de m/z 502,316 na forma $[M+2H]^{2+}$ e m/z 1003,623 na forma $[M+H]^+$.



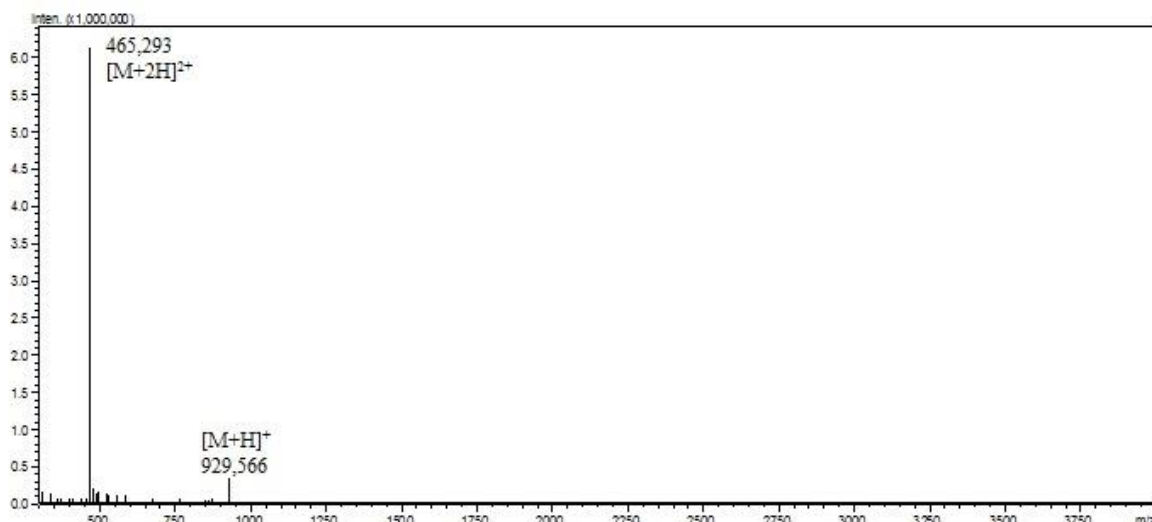
Fonte: Dados do autor.

Figura 22: Espectro MS referente à molécula protonada do peptídeo TyPep 16, onde se pode observar os picos de m/z 483,755 na forma $[M+2H]^{2+}$ e m/z 966,546 na forma $[M+H]^+$.



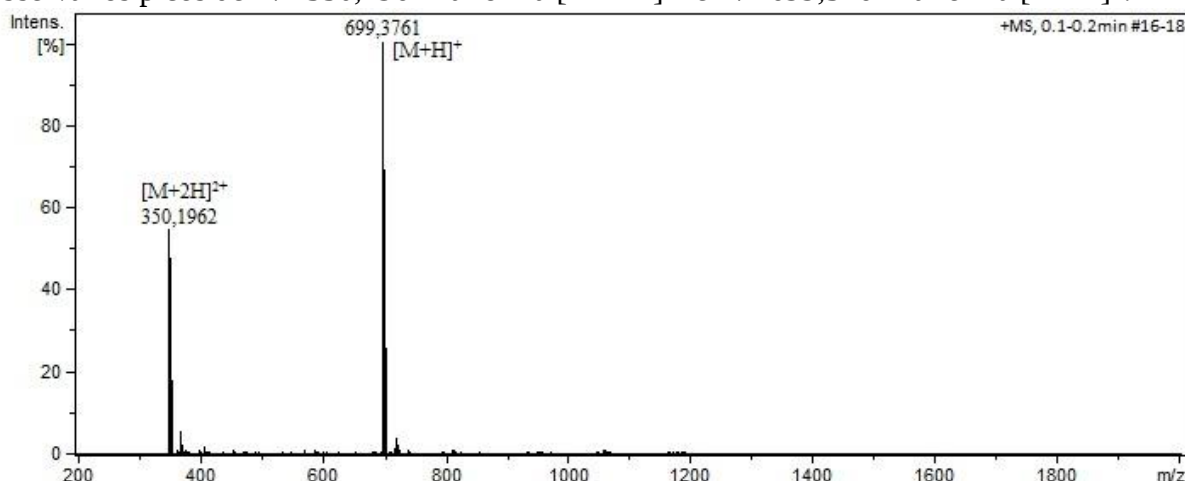
Fonte: Dados do autor.

Figura 23: Espectro MS referente à molécula protonada peptídeo do TyPep 17, onde se pode observar os picos de m/z 465,293 na forma $[M+2H]^{2+}$ e m/z 929,566 na forma $[M+H]^+$.



Fonte: Dados do autor.

Figura 24: Espectro MS referente à molécula protonada do peptídeo TyPep 18, onde se pode observar os picos de m/z 350,1962 na forma $[M+2H]^{2+}$ e m/z 699,3761 na forma $[M+H]^+$.



Fonte: Dados do autor.

Os espectros MS/MS referente às análises dos peptídeos TyPep 14 a 18 não serão mostrados, porém as sequências dos peptídeos foram obtidas e corresponderam exatamente às sequências propostas à síntese.

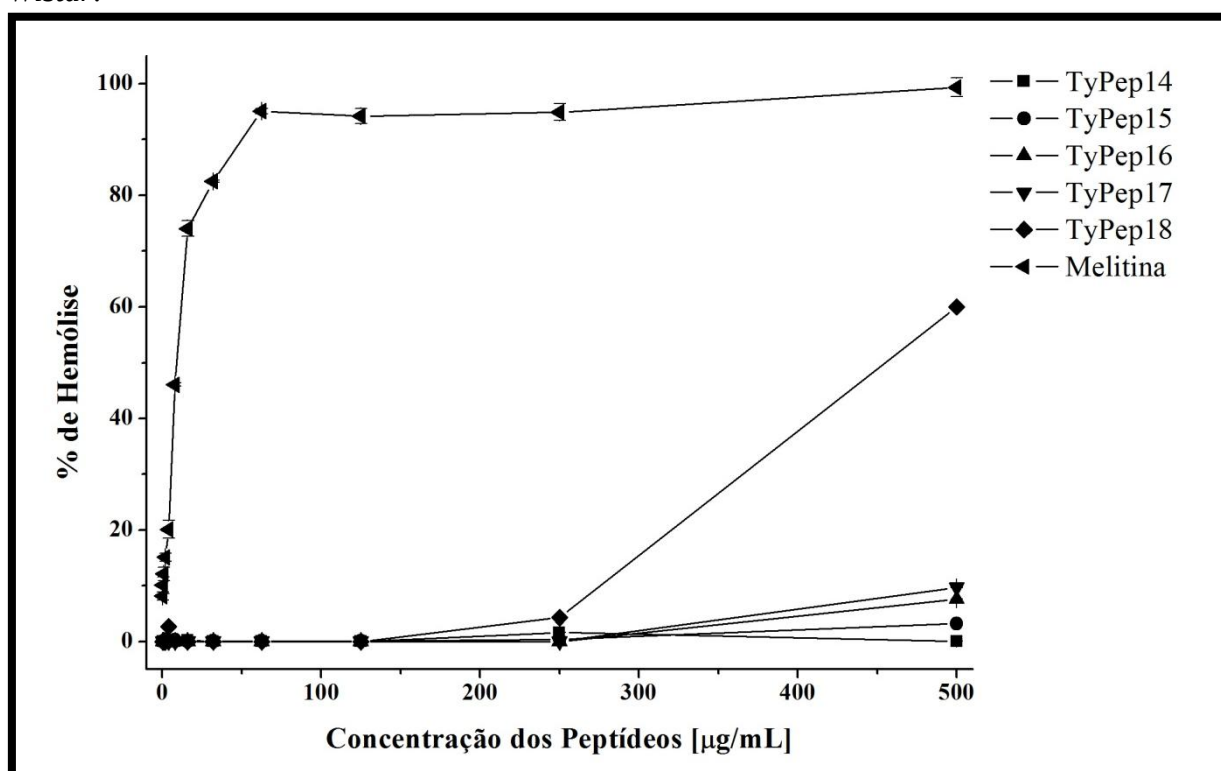
4.1 Atividade hemolítica

Para este ensaio, foi utilizado como padrão de hemólise o peptídeo Melitina (KATSU et al., 1988). Um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana é a Melitina, sendo este um dos componentes mais abundantes do veneno da abelha *Apis*

mellifera. Este peptídeo foi descrito como sendo hemolítico, é constituído por 26 resíduos de aminoácidos e possui estrutura anfipática (PÉREZ-PAYÁ et al., 1997). Além disso, foi observado que o mesmo é capaz de assumir várias conformações e estados de agregação diferentes, em soluções aquosas de diferentes composições (PÉREZ-PAYÁ et al., 1995).

Todos os resultados dos ensaios de hemólise foram expressos em porcentagem, sendo estes valores obtidos através da comparação com um controle de 100% feito pela incubação dos eritrócitos em solução de Triton X-100 (1%, v/v). A figura 25 mostra as curvas de atividade hemolítica em função da concentração para os cinco peptídeos sintéticos (4, 8, 16, 32, 64, 125, 250 e 500 µg/mL) e para o padrão de hemólise utilizado (Melitina) nas mesmas concentrações.

Figura 25: Atividade hemolítica dos peptídeos TyPep 14 a 18 em oito concentrações diferentes, variando de 4 a 500 µg/mL. O teste foi realizado utilizando-se eritrócitos de ratos Wistar.



Fonte: Dados do autor.

Somente o peptídeo TyPep 18 apresentou 60% de atividade hemolítica na dose mais elevada (500 µg/mL); mesmo possuindo atividade hemolítica, a mesma ocorre em concentrações muito elevadas fisiologicamente.

4.2 Atividade antibiótica

A tabela 3 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica realizado para os cinco peptídeos sintéticos e dois antibióticos padrão (Cloranfenicol e Oxitetraciclina), sendo os resultados expressos em µg/mL.

Tabela 3: Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em µg/mL, para os cinco peptídeos estudados no presente trabalho e antibióticos de referência (Cloranfenicol e Oxitetraciclina) frente às bactérias Gram+ e Gram-.

PEPTÍDEOS	Valores de MIC (µg/mL)			
	Gram -		Gram +	
	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
TyPep 14	>500	>500	>500	>500
TyPep 15	>500	>500	>500	125
TyPep 16	>500	>500	>500	>500
TyPep 17	>500	>500	>500	>500
TyPep 18	>500	>500	>500	>500
Cloranfenicol	4	4	8	2
Oxitetraciclina	1	2	8	2

Fonte: Dados do autor.

Como pode ser observado na tabela 3 o peptídeo TyPep 15 inibiu somente o crescimento da bactéria Gram+ *S. pneumoniae* nas concentrações de 125 µg/mL ou maiores, enquanto os demais peptídeos não apresentaram atividade antibiótica considerável. Pela atividade antibiótica do peptídeo TyPep 15 ser reduzida, e somente sobre uma cepa, ele é considerado um peptídeo sem ação antibacteriana, sendo assim, nenhum destes peptídeos possui atividade antibiótica.

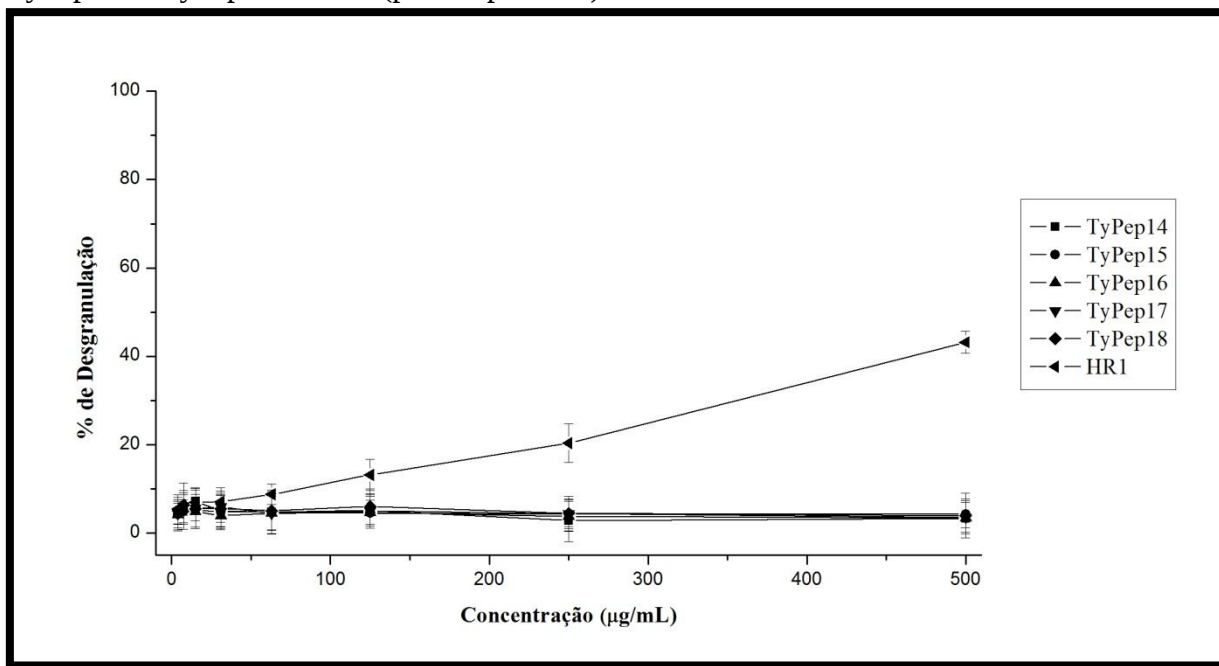
4.3 Atividade desgranuladora de mastócitos e liberação de LDH

As amostras foram ensaiadas em diferentes concentrações, variando de 4 a 500 µg/mL. Os resultados foram expressos em porcentagem de desgranulação. O padrão utilizado para este ensaio foi o peptídeo HR1 (INLKAIAALVKKVL-NH₂) que é um mastoparano isolado do veneno da vespa *Vespa orientalis*, causador de desgranulação de mastócitos e, conseqüentemente, inicia a liberação de histamina (TUICHIBAEV et al., 1988).

A figura 26 representa a atividade de desgranulação de mastócitos peritoneais em função das concentrações de cada um dos peptídeos; tal atividade foi expressa em

porcentagem, sendo valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v).

Figura 26: Atividade de desgranulação de mastócitos em resposta à ação dos peptídeos TyPep 14 a TyPep 18 e HR1 (padrão positivo).

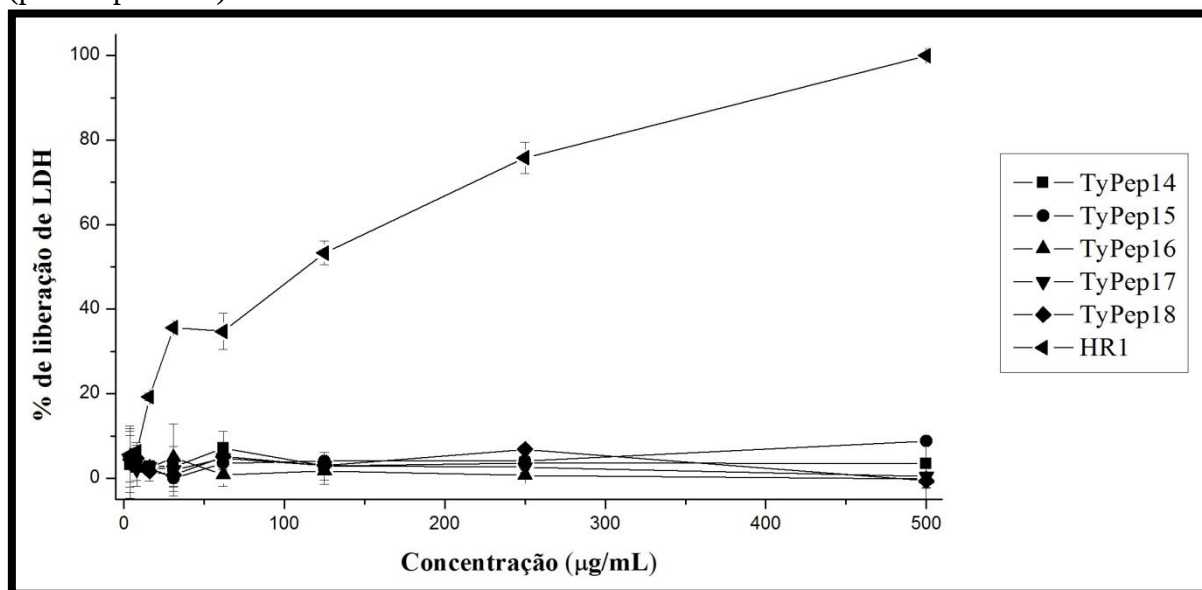


Fonte: Dados do autor.

Os resultados demonstram que em presença dos cinco peptídeos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, não ocorre a desgranulação dos mastócitos. Já na presença do peptídeo padrão (HR1) podemos constatar a ocorrência de 43% de desgranulação na concentração de 500 µM.

A atividade liberadora de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos, coletados da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, assim como descrito para os ensaios de desgranulação (item 3.5). Os resultados de LDH são demonstrados na figura 27 e foram expressos em porcentagem, valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v). O peptídeo HR1 também foi utilizado como padrão neste ensaio.

Figura 27: Atividade de LDH em resposta à ação dos peptídeos TyPep 14 a TyPep 18 e HR1 (padrão positivo).

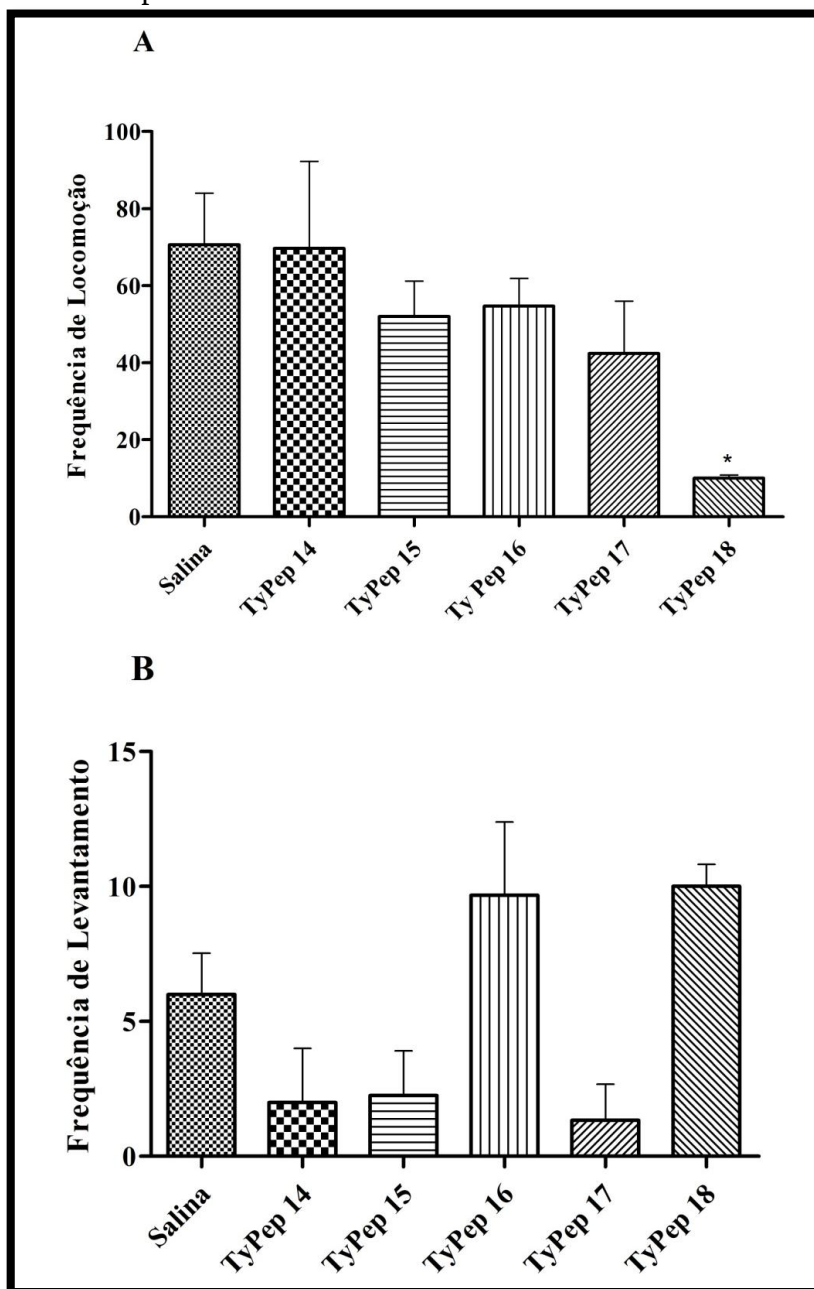


Fonte: Dados do autor.

4.4 Influência dos peptídeos nas atividades de locomoção e levantamento

Os camundongos tratados com TyPep 14, 15, 16 e 17 não tiveram alteração na frequência de locomoção dos camundongos e em relação ao levantamento, alterações significativas não foram observadas por efeito de nenhum dos peptídeos ensaiados. Entretanto, ressalta-se que somente na locomoção a atividade do TyPep 18 foi, a princípio, o único que produziu efeito na frequência de locomoção dos animais, quando comparada com os resultados obtidos para os outros peptídeos (fig. 28).

Figura 28: Frequências de locomoção e levantamento após administração dos peptídeos sintéticos contabilizados pelos três minutos dentro da arena.



Fonte: Dados do autor.

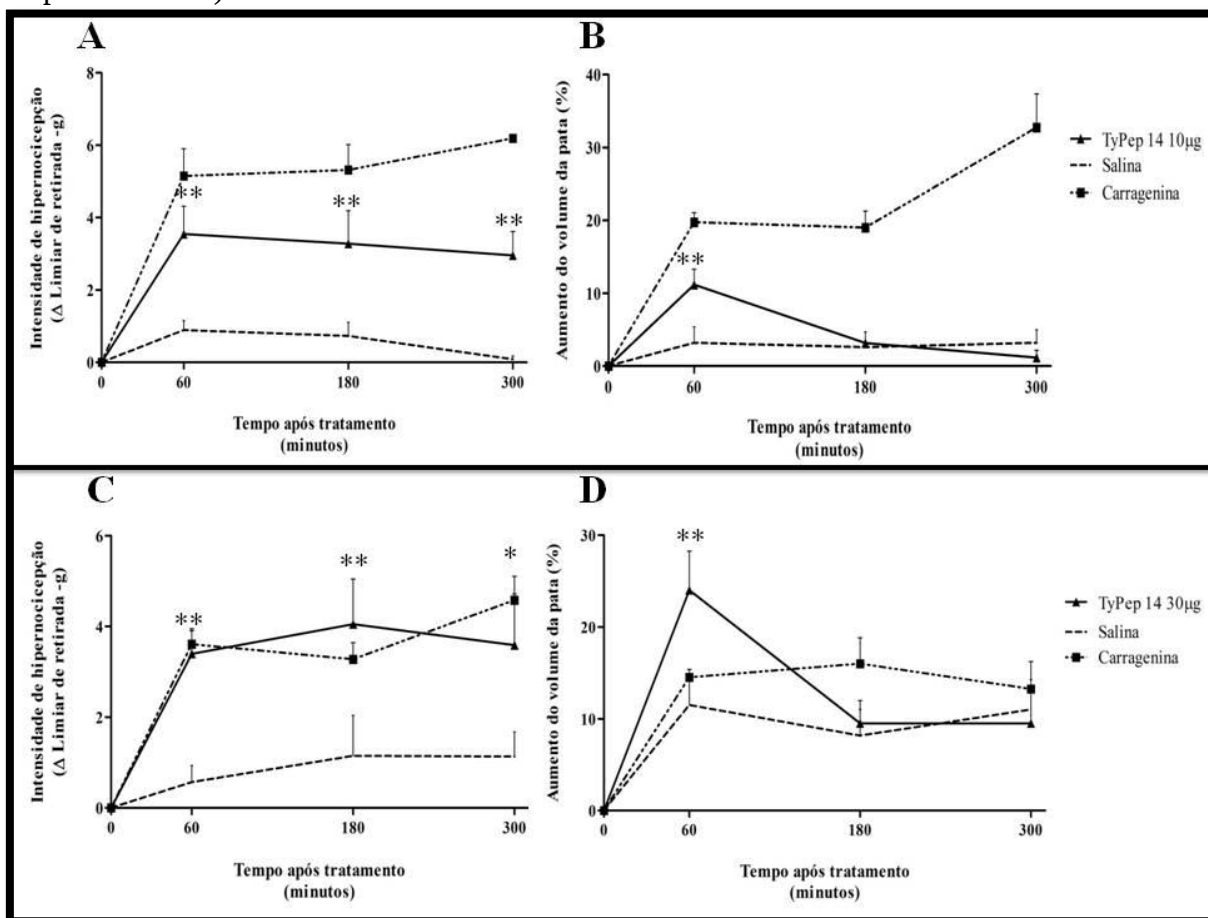
4.5 Atividade hiperalgésica e edematogênica

Foram avaliadas as atividades sobre a sensibilidade dolorosa no modelo de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico), sendo o limiar nociceptivo representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para retirada da pata (itens **A** e **C** das figuras 29 a 33). O efeito edematogênico foi avaliado através do paquímetro digital (itens **B** e **D** das figuras 29 a 33). Foram administrados nos camundongos, por via intraplantar (i.pl.), os

peptídeos TyPep 14 a 18 nas concentrações de 10 µg/30 µL e 30 µg/30 µL. Nos gráficos foram adicionadas as curvas da Carragenina nas concentrações (1 µg/30 µL e 25 µg/30 µL, respectivamente) substância hiperalgésica e edematogênica a fim de ter um controle positivo para as comparações das demais curvas.

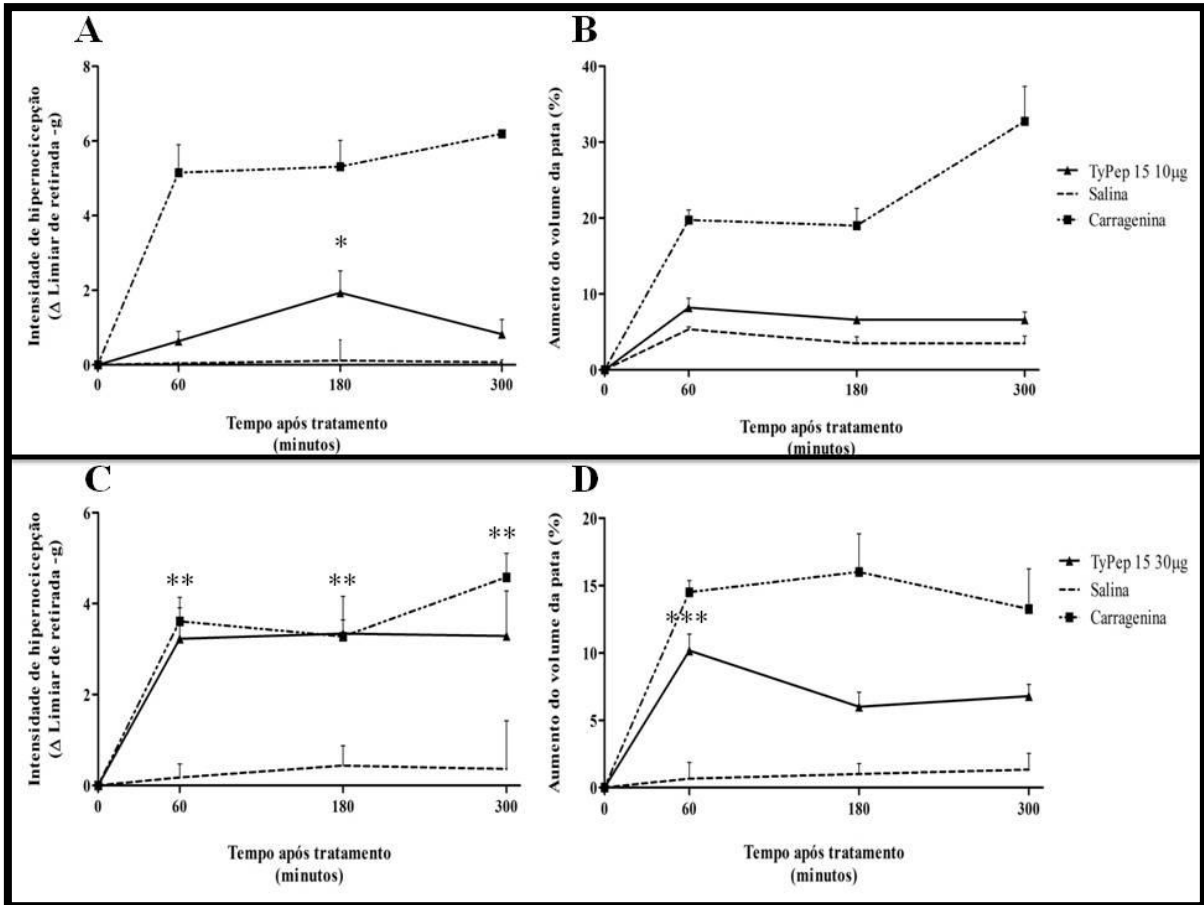
As medidas foram realizadas no tempo zero (antes da administração) e após 60, 180 e 300 minutos da administração dos peptídeos. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina com o mesmo volume (30 µL) e nas mesmas condições experimentais. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM de animais por grupo e nas figuras, representados estatisticamente por: *) sendo $p < 0,05$; **) sendo $p < 0,01$; ***) sendo $p < 0,001$. Estes resultados foram sumarizados na tabela 4 para facilitar a discussão.

Figura 29: Efeito do peptídeo TyPep 14 na concentração de 10 µg/30 µL sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste com von Frey eletrônico (A) e sobre o aumento do volume da pata (edema) (B) e na concentração de 30 µg/30 µL (C e D, respectivamente).



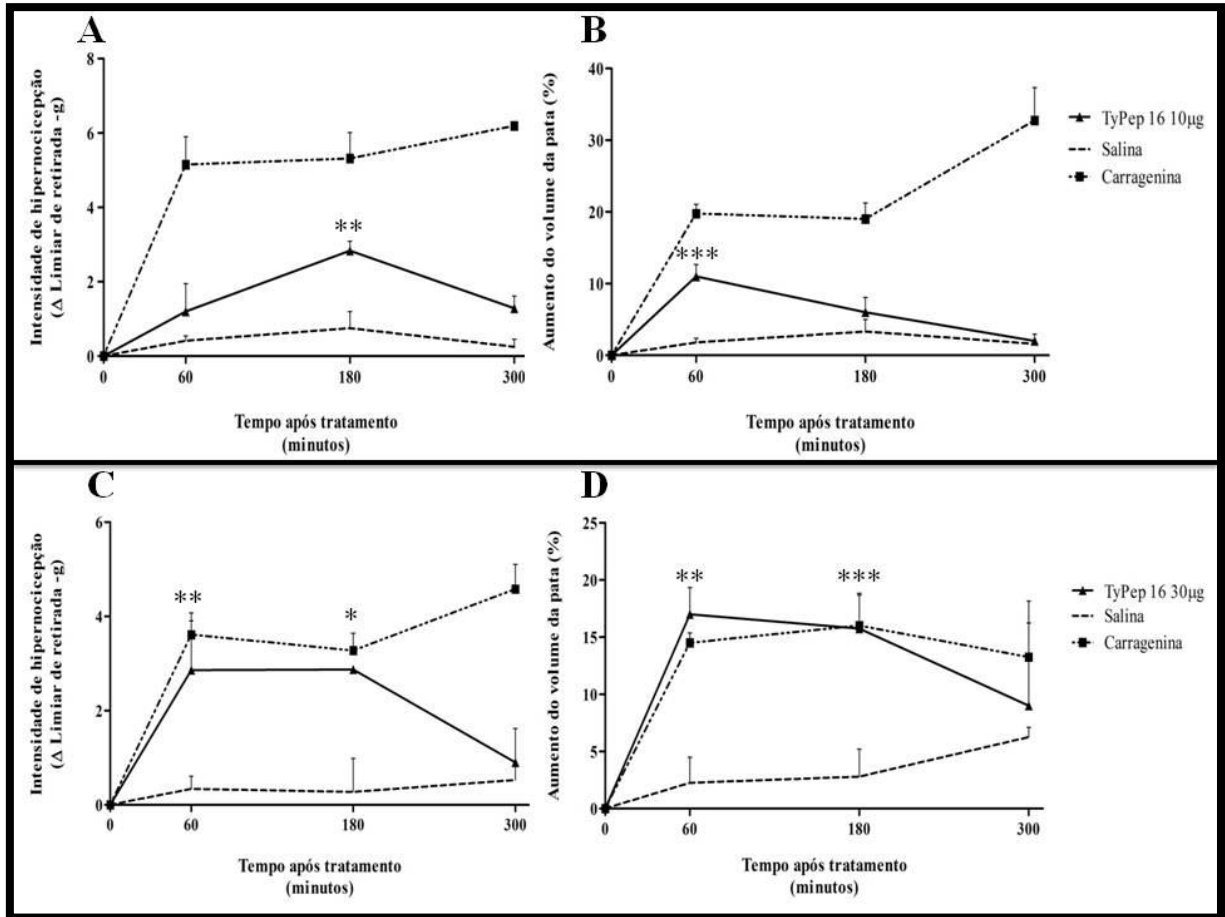
Fonte: Dados do autor.

Figura 30: Efeito do peptídeo TyPep 15 na concentração de 10 µg/30 µL sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste com von Frey eletrônico (A) e sobre o aumento do volume da pata (edema) (B) e na concentração de 30 µg/30 µL (C e D, respectivamente).



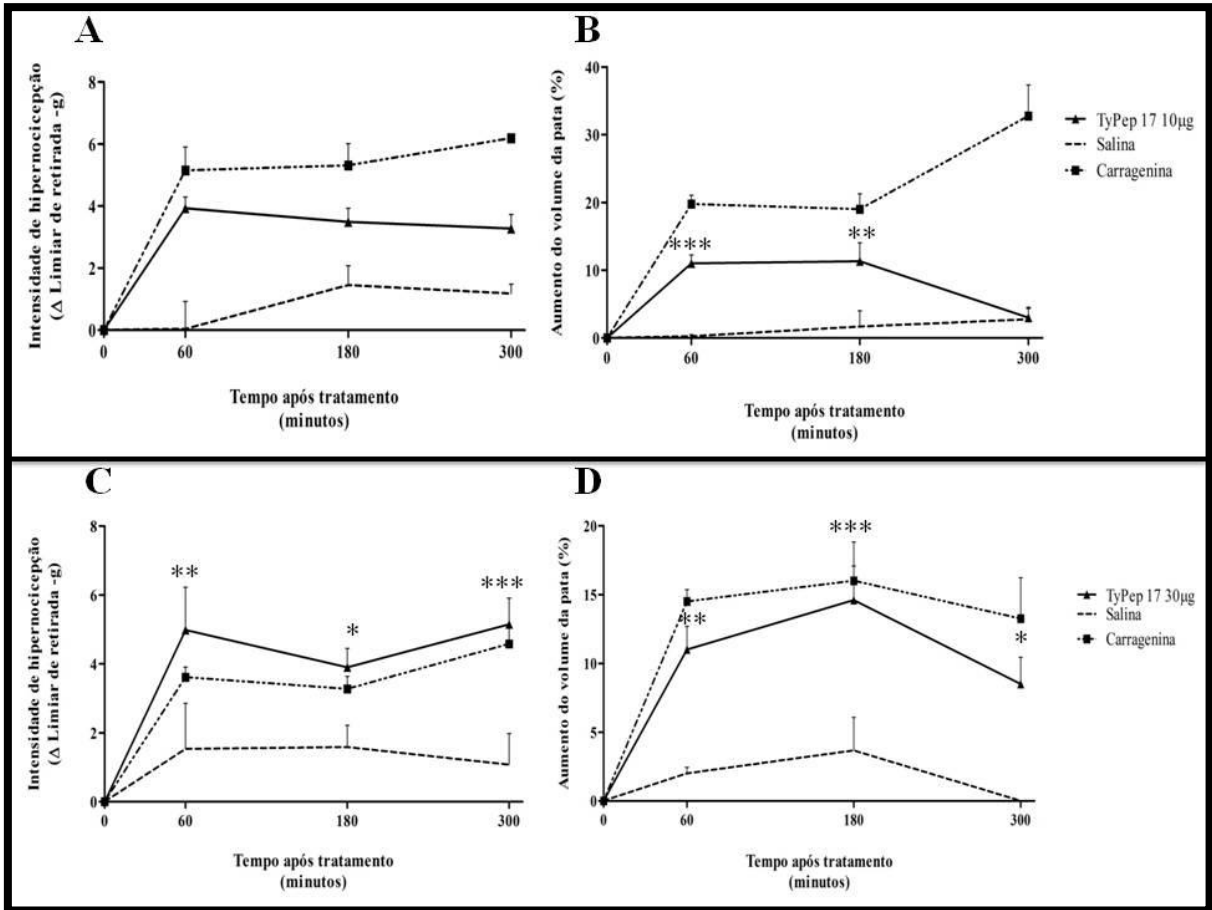
Fonte: Dados do autor.

Figura 31: Efeito do peptídeo TyPep 16 na concentração de 10 $\mu\text{g}/30\text{ }\mu\text{L}$ sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste com von Frey eletrônico (A) e sobre o aumento do volume da pata (edema) (B) e na concentração de 30 $\mu\text{g}/30\text{ }\mu\text{L}$ (C e D, respectivamente).



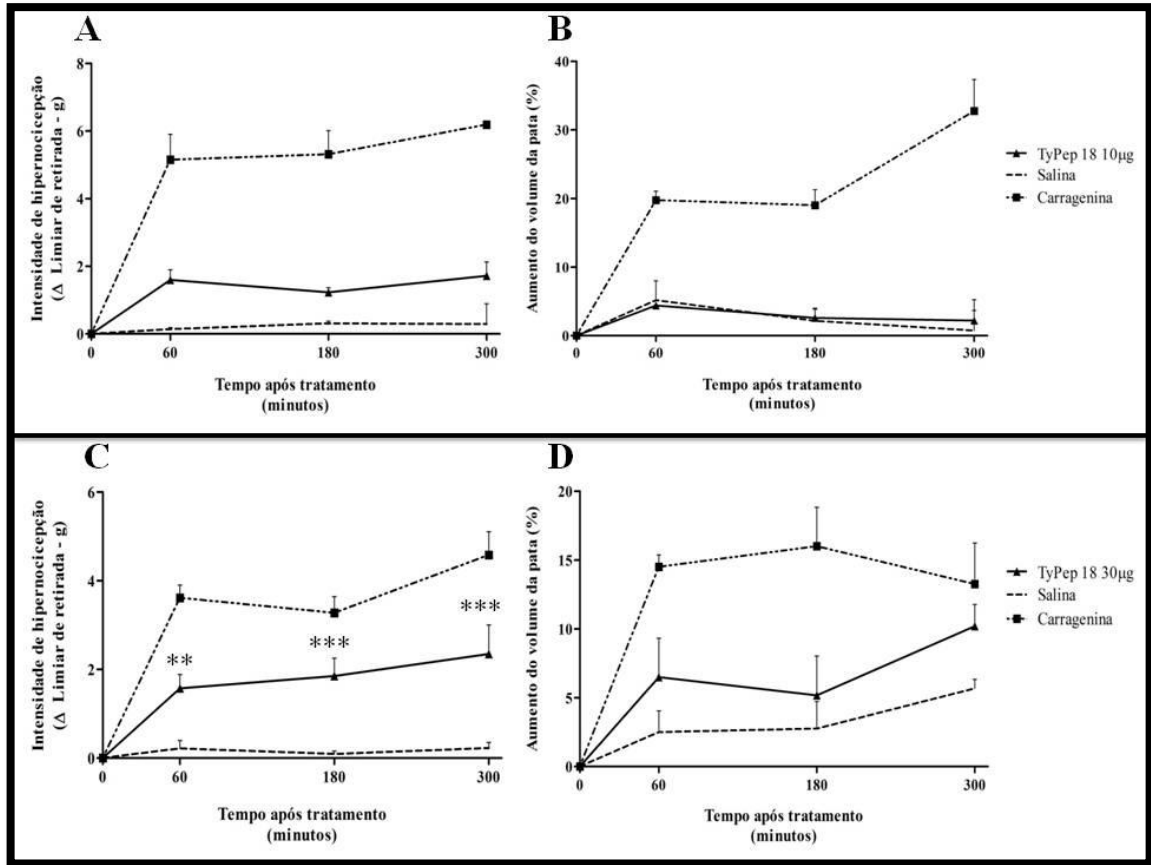
Fonte: Dados do autor.

Figura 32: Efeito do peptídeo TyPep 17 na concentração de 10 $\mu\text{g}/30\text{ }\mu\text{L}$ sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste com von Frey eletrônico (A) e sobre o aumento do volume da pata (edema) (B) e na concentração de 30 $\mu\text{g}/30\text{ }\mu\text{L}$ (C e D, respectivamente).



Fonte: Dados do autor.

Figura 33: Efeito do peptídeo TyPep 18 na concentração de 10 µg/30 µL sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste com von Frey eletrônico (A) e sobre o aumento do volume da pata (edema) (B) e na concentração de 30 µg/30 µL (C e D, respectivamente).



Fonte: Dados do autor.

Em resumo, a tabela 4 demonstra de forma simplificada os resultados obtidos e demonstrados nas figuras 29 a 33.

Tabela 4: Resultados simplificados das figuras 29 a 33. A estatística representada por * é dada por: *) sendo $p < 0,05$; **) sendo $p < 0,01$; ***) sendo $p < 0,001$.

	TyPep 14						TyPep 15						TyPep 16					
	10µg			30µg			10µg			30µg			10µg			30µg		
Tempo (min.)	60	180	300	60	180	300	60	180	300	60	180	300	60	180	300	60	180	300
Hiperalgesia	**	**	**	**	**	*	*			**	**	**		**		**	*	
Edema	**			**						***			***			**	***	

	TyPep 17						TyPep 18					
	10µg			30µg			10µg			30µg		
Tempo (min.)	60	180	300	60	180	300	60	180	300	60	180	300
Hiperalgesia				**	*	***				**	***	***
Edema	***	**		**	***	*						

Fonte: Dados do autor.

5 DISCUSSÃO

O veneno dos escorpiões é composto por uma mistura complexa e pode induzir diferentes níveis de intoxicação em humanos e pode levar até a morte, dependendo do caso. O estudo dos componentes do veneno é de extrema importância para a compreensão de como este veneno pode afetar os seres humanos, e quais componentes são os causadores dos efeitos adversos, tais como: dor, inflamação, ativação de macrófagos e células T, convulsões, ativação dos sistemas simpático e parassimpático, liberação massiva de neurotransmissores (PUCCA et al., 2015a).

Muitas neurotoxinas dos venenos de escorpiões já foram analisadas pelas técnicas proteômica, genoma e transcriptoma. Os peptídeos neurotóxicos atuam especialmente em canais iônicos (Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{2+}) e outros receptores de membranas, sugerindo uma grande variedade de funções, as quais as toxinas do veneno são capazes de atuar (HAKIM et al., 2015).

O escorpião *T. serrulatus* é o mais estudado dentre todos do grupo (Scorpionidae), e apesar disso, nenhum estudo foi feito com peptídeos com massa molar abaixo de 3000 Da (RATES et al., 2008). Na tentativa de estudar os peptídeos lineares, Rates et al., em 2008, extraíram os peptídeos do veneno em água, o que não favorece os pequenos peptídeos lineares (5 a 20 resíduos de aminoácido) pela estrutura hidrofóbica que possuem. Outro fato importante que deve ser observado é que os ensaios biológicos com estes peptídeos são muito raros, o que torna o presente trabalho importante como um ponto de partida para o início dos estudos das atividades biológicas com pequenos peptídeos lineares dos venenos de escorpiões.

Os peptídeos foram escolhidos de uma lista contendo mais de 70 peptídeos recém-descobertos e sequenciados pela doutoranda Nathalia Baptista Dias, integrante do grupo de pesquisas (Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica).

Ao serem comparados com o banco de dados NCBI através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), a qual localiza regiões com sequências similares, foi identificado que:

- O peptídeo TyPep 14 possui 100% de identidade, com o peptídeo depositado com código de acesso P86825.1 (UNIPROT), sendo este um peptídeo identificado do veneno de *T. serrulatus* (RATES et al., 2008); a única diferença está na presença de dois resíduos de aminoácidos a mais presentes no VP1 (KHFGKDSNFPFGT) em relação ao TyPep 14 (KHFGKDSNFPF-NH₂) (fig. 34). Este é um peptídeo pequeno que não possui pontes dissulfeto (NDBP) e, segundo os autores, há evidências de que ele pode ser um peptídeo

antimicrobiano, porém como foi apresentado nos resultados do presente trabalho, a fração do peptídeo VP1 chamado de TyPep 14 não apresentou atividade antibiótica, talvez a presença de dois resíduos a mais em VP1 possa ter conferido algum nível de organização da estrutura secundária de VP1, tornando-o antibiótico, ou a presença do grupo amina no TyPep 14 tenha algum efeito de bloqueio de atividade;

Figura 34: Resultado do alinhamento obtido pela comparação da sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo TyPep 14 com o banco de dados do NCBI realizado pela ferramenta Blast_p (*Basic Local Alignment Search Tool: Protein*).

RecName: Full=Venom peptide 1; Contains: RecName: Full=Venom peptide 2 [Tityus serrulatus]				
Sequence ID: sp P86825.1 VP1_TITSE Length: 13 Number of Matches: 1				
Range 1: 1 to 11 GenPept Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
39.7 bits(86)	0.002	11/11(100%)	11/11(100%)	0/11(0%)
Query 1	KHFGKDSNFPF	11		
	KHFGKDSNFPF			
Sbjct 1	KHFGKDSNFPF	11		

Fonte: NCBI Blast: Protein obtido com dados do autor.

- O peptídeo TyPep 15 não obteve identidade com qualquer outro peptídeos e/ou fragmento de proteína depositada no NCBI;
- O TyPep 16 (GLREKHVQ) foi identificado com 100% de identidade dos resíduos de aminoácidos, com um fragmento do peptídeo neurotóxico do tipo β -KTx-like (peptídeo que possui 87 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto é citolítico e bloqueador do canais de potássio Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3) dos venenos dos escorpiões *T. trivittatus*, *T. discrepans*, *T. costatus* e *T. serrulatus*, este último (Ts) está descrito com o nome de TsTXK-beta, e código de acesso P69940.2 junto ao Uniprot (ROGOWSKI et al., 1994, 1996; LEGROS et al., 1998; KALAPOTHAKIS et al., 2001; RATES et al., 2008; COLOGNA et al., 2009) (fig. 35);

Figura 35: Resultado do alinhamento obtido pela comparação da sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo TyPep 16 com o banco de dados do NCBI realizado pela ferramenta Blast_p (*Basic Local Alignment Search Tool: Protein*).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
beta-KTx-like peptide [Tityus trivittatus]	28.6	28.6	100%	39	100%	ABU94955.1
scorpine-like peptide precursor [Tityus costatus]	28.6	28.6	100%	56	100%	AAW72464.1
RecName: Full=Scorpine-like peptide Tco 41.46-2; Contains: RecName: Full=Scorpine-like peptide Tco 42.14; AltName: Full=Tco-beta-KTx; Short=	28.6	28.6	100%	56	100%	Q5G8A6.1
RecName: Full=Potassium channel toxin Ttr-beta-KTx; Short=TtrbetaKTx; Flags: Precursor [Tityus trivittatus]	28.6	28.6	100%	56	100%	Q0GY46.2
RecName: Full=Potassium channel toxin TsTXK-beta; AltName: Full=Potassium channel toxin beta-KTx 1; AltName: Full=Tityustoxin K-beta; Short=	28.6	28.6	100%	56	100%	P69940.2
RecName: Full=Potassium channel toxin Tdi-beta-KTx; Short=TdibetaKTx; Flags: Precursor [Tityus discrepans]	28.6	28.6	100%	56	100%	Q0GY44.1

Molecule processing				
Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Signal peptide ⁱ	1 - 19	19	Sequence analysis	
Propeptide ⁱ	20 - 27	8	1 Publication	
Chain ⁱ	28 - 87	60	Potassium channel toxin TsTXK-beta	

RecName: Full=Potassium channel toxin TsTXK-beta; AltName: Full=Potassium channel toxin beta-KTx 1; AltName: Full=Tityustoxin K-beta; Short=TsTX K beta; Short=TsTX-K beta; Short=TsTXKbeta; AltName: Full=Ts8; AltName: Full=TsK2; Flags: Precursor [Tityus serrulatus]

Sequence ID: [sp|P69940.2|KBX1_TITSE](#) Length: 87 Number of Matches: 1

Range 1: 20 to 27 GenPept Graphics				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
28.6 bits(60)	56	8/8(100%)	8/8(100%)	0/8(0%)

Query 1 GLREKHVQ 8
 GLREKHVQ
 Sbjct 20 GLREKHVQ 27

Fonte: NCBI Blast: Protein obtido com dados do autor.

• O TyPep 17 foi identificado como sendo parte de um neuropeptídeo de 91 resíduos de aminoácidos toxina presente nos venenos de *T. discrepans*, *T. trivittatus*, *T. stigmurus* e *T. serrulatus*, toxina citolítica e bloqueadora de canais de potássio Kv1.2 e Kv1.3 (BATISTA et al., 2006, 2007; DIEGO-GARCIA et al., 2007; D'SUZE et al., 2009; ALVARENGA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; PUCCA et al., 2014). Em *T. serrulatus*, este peptídeo está depositado no Uniprot sob o código de acesso P86822.2 (fig. 36). Os autores não descreveram se estes fragmentos são resultados do processo de maturação pós-traducional, ou se eles possuem alguma atividade biológica;

Figura 36: Resultado do alinhamento obtido pela comparação da sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo TyPep 16 com o banco de dados do NCBI realizado pela ferramenta Blast_p (*Basic Local Alignment Search Tool: Protein*).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2; AltName: Full=Ts19; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1; AltName: Full=Ts19 fragment I; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2; AltName: Full=Ts19 fragment II; Flags: Precursor [Tityus stigmurus]	29.5	29.5	100%	33	100%	P86822.2
RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2; AltName: Full=Ts19; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1; AltName: Full=Ts19 fragment I; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2; AltName: Full=Ts19 fragment II; Flags: Precursor [Tityus stigmurus]	29.5	29.5	100%	33	100%	P0C8W4.2
RecName: Full=Toxin To56; AltName: Full=Toxin Tc56 [Tityus cambridgei]	26.9	26.9	88%	45	100%	P84689.1

Molecule processing				
Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Signal peptide ⁱ	1 - 25	25	Sequence analysis	
Propeptide ⁱ	26 - 33	8	1 Publication	
Peptide ⁱ	34 - 90	57	Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1 1 Publication	
Peptide ⁱ	43 - 91	49	Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2 1 Publication	

RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2; AltName: Full=Ts19; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1; AltName: Full=Ts19 fragment I; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2; AltName: Full=Ts19 fragment II; Flags: Precursor				
Sequence ID: sp P86822.2 KBX2_TITSE Length: 91 Number of Matches: 1				
Range 1: 26 to 34 GenPept Graphics Next Match Previous Match				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
29.5 bits(62)	33	9/9(100%)	9/9(100%)	0/9(0%)
Query 1	GKQKEILGK	9		
Sbjct 26	GKQKEILGK	34		

Fonte: NCBI Blast: Protein obtido com dados do autor.

- O TyPep 18 não obteve identidade com qualquer outro peptídeos e/ou fragmento de proteína depositada no NCBI.

Um aspecto importante que deve ser mencionado é o fato de que os venenos de escorpiões estudados em nosso laboratório, e que deram origem às sequências dos peptídeos sob estudo, foram sempre solubilizados em meios contendo um coquetel de inibidores de proteases, antes de qualquer manipulação. Isso deve ter prevenido a ocorrência de clivagem proteolítica descontrolada das proteínas e peptídeos maiores, como artefatos de manipulação dos venenos. Sempre lembrando que o material sob investigação neste trabalho são de origem sintética.

5.1 Atividade hemolítica

Para muitos NDBPs de escorpiões a concentração de peptídeo com potencial terapêutico (MIC, concentração inibitória mínima) testada em microrganismos é muito próxima daquela em que estes peptídeos apresentam citotoxicidade para mamíferos, que são

normalmente estudadas por análises de hemólise em eritrócitos. Um exemplo é a hadrurina um dos primeiros NDBPs a apresentar atividade antibiótica, sendo capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com valores de MIC entre 10 e 50 μM ; entretanto, este peptídeo também apresenta um grande potencial hemolítico contra eritrócitos humanos em concentrações a partir de 30 μM (ORTIZ et al., 2015). Esta dualidade entre antibiose e hemólise é repetida em quase todos os AMPs (“Antimicrobial Peptides”, do inglês, Peptídeos Antimicrobianos) de escorpiões descritos até o momento (tabela 5).

Tabela 5: Lista de todos os NDBPs funcionalmente caracterizados com seu número correspondente de resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico, carga, função biológica e espécies de escorpiões.

NDBPs	Number of amino acids	Isoelectric point	Charge	Biological activities	Scorpion species
Peptide T	13	6.65	0	Bradykinin-potentiating	<i>Tityus serrulatus</i>
K 12	21	6.52	0	Bradykinin-potentiating	<i>Buthus occitanus</i>
Hadrurin	41	11.09	+5	Antimicrobial, hemolytic	<i>Hadrurus aztecus</i>
Pandinin 1	44	10.49	+4	Antimicrobial, hemolytic	<i>Pandinus imperator</i>
Pandinin 2	24	10.80	+3	Antimicrobial, hemolytic	<i>Pandinus imperator</i>
Opistoporin 1	44	10.58	+4	Antimicrobial, immune-modulatory, hemolytic	<i>Opisthophthalmus carinatus</i>
BmKb1	18	9.67	+1	Antimicrobial	<i>Mesobuthus martensii</i>
BmKn2	13	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Mesobuthus martensii</i>
IsCT	13	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>
IsCT2	13	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>
Parabutoporin	45	10.75	+7	Antimicrobial, immune-modulatory, hemolytic	<i>Parabuthus schlechteri</i>
Mucroporin	17	9.69	+1	Antimicrobial	<i>Lychas mucronatus</i>
Meucin-13	13	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic, cytolytic	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Meucin-18	18	10.80	+3	Antimicrobial, hemolytic, cytolytic	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Imcroporin	17	10.1	+1	Antimicrobial, hemolytic, cytolytic	<i>Isometrus maculatus</i>
StCT1	14	6.34	0	Antimicrobial, hemolytic	<i>Scorpiops tibetanus</i>
Meucin-24	24	10.96	+4	Antimalarial	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Meucin-25	25	11.13	+4	Antimalarial	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Im-1	56	10.82	+7	Antimicrobial, hemolytic, cytolytic	<i>Isometrus maculatus</i>
HP 1090	13	10.80	+2	Antiviral	<i>Heterometrus petersii</i>
Vejovine	47	10.97	+4	Antimicrobial, hemolytic	<i>Vaejovis mexicanus</i>
Ctriporin	19	10.80	+2	Antimicrobial	<i>Chaerilus tricotatus</i>
BmKbpp	47	10.82	+7	Antimicrobial, hemolytic, bradykinin-potentiating	<i>Mesobuthus martensii</i>
VmCT1	13	10.1	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Vaejovis mexicanus</i>
VmCT2	13	10.1	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Vaejovis mexicanus</i>
AamAP1	18	9.72	+2	Antimicrobial, hemolytic	<i>Androctonus amoreuxi</i>
AamAP2	18	9.72	+2	Antimicrobial, hemolytic	<i>Androctonus amoreuxi</i>
StCT2	14	9.88	+2	Antimicrobial	<i>Scorpiops tibetanus</i>
HsAP	29	10.75	+3	Antimicrobial, hemolytic	<i>Heterometrus spinifer</i>
Css54	25	11.25	+4	Antimicrobial, hemolytic	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>
UyCT1	14	9.53	+2	Antimicrobial, hemolytic	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
UyCT2	13	9.55	+2	Antimicrobial, hemolytic	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
UyCT3	13	9.69	+2	Antimicrobial, hemolytic	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
UyCT5	13	9.69	+2	Antimicrobial, hemolytic	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
Pantinin-1	14	9.55	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Pandinus imperator</i>
Pantini-2	13	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Pandinus imperator</i>
Pantinin-3	13	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic	<i>Pandinus imperator</i>
Mauriporin	48	10.82	+6	Anticancer	<i>Androctonus mauritanicus</i>
TsAP-1	17	9.69	+1	Antimicrobial, anticancer	<i>Tityus serrulatus</i>
TsAP-2	17	9.69	+1	Antimicrobial, hemolytic, anticancer	<i>Tityus serrulatus</i>

Fonte: Tabela retirada de Almaaytah e Albalas, 2014.

Melo et al., 2015, estudaram um peptídeo sintético do escorpião *T. stigmurus* conhecido por Stigmurin (17 resíduos de aminoácidos). Este peptídeo foi descoberto através do transcriptoma da glândula de veneno do escorpião e então sintetizado. Apesar de possuir atividade antibacteriana, não possui atividade hemolítica. Em Xiaoxiao et al., 2013, foi estudada a atividade hemolítica e antibacteriana de dois peptídeos com 17 resíduos de aminoácidos (TsAP-1 e TsAP-2) do veneno do escorpião *T. serrulatus*; ambos peptídeos produziram efeitos hemolíticos e antibacterianos em algumas cepas de bactérias.

A melitina, peptídeo utilizado para o controle positivo em hemólise, é o composto mais abundante no veneno da abelha *Apis mellifera* e contém 26 resíduos de aminoácidos. Esta toxina possui uma atividade hemolítica extremamente poderosa. Muitos estudos já foram feitos com o propósito de elucidar a natureza da interação da melitina com membranas sempre com o intuito de entender os mecanismos moleculares de sua ação hemolítica (DEMPSEY, 1990).

Sabe-se que a atividade hemolítica é dependente de perturbações na membrana dos eritrócitos causada pelos peptídeos. Pode-se constatar que a melitina, um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana, utilizado como padrão, apresentou 100% de atividade hemolítica na concentração de 62 µg/mL ou maiores, enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade hemolítica significativa em doses mais baixas. O único peptídeo linear (dentre aqueles investigados) que apresentou alguma atividade hemolítica foi o TyPep 18, que causou 60% de hemólise, na dose mais elevada (500 µg/mL).

5.2 Atividade antibiótica

Compreender os mecanismos através dos quais o controle biológico de doenças ocorre é fundamental para a eventual melhoria e utilização mais específica de métodos de controle biológico (FRAVEL, 1988).

Um dos maiores desafios para o sistema de saúde no mundo, hoje em dia, é o surgimento e disseminação da resistência das bactérias aos antibióticos. Muitos patógenos que antes eram sensíveis a uma droga, agora, possuem resistência a multi-drogas, o que reduziu o valor terapêutico dos antibióticos clássicos. Esta resistência levou à busca por compostos naturais que poderiam driblar nestes mecanismos de resistência a multi-drogas.

Na última década tem aumentado o número de pesquisas feitas com peptídeos lineares (NDBP), devido às propriedades biológicas que estes peptídeos possuem. Muitos destes peptídeos apresentam potentes atividades antimicrobianas, inibindo o crescimento de bactéria, fungos, leveduras e parasitas e rompem as partículas virais (AMP). Estes peptídeos constituem uma nova alternativa, servindo diretamente como antibióticos ou como um esqueleto para a engenharia de novas moléculas com potencial clínico (RAMÍREZ-CARRETO et al., 2015).

Os AMPs de escorpiões compartilham várias características, incluindo um tamanho relativamente pequeno (13 a 56 resíduos de aminoácidos) e geralmente com carga positiva de

resíduos catiônicos, mas também na presença de resíduos hidrofóbicos. Esta combinação permite adotar uma estrutura anfipática de α -hélice em membranas ou ambientes mímicos (50 a 60% de trifluoroetanol) enquanto possuem uma estrutura randômica em ambientes aquosos iônicos. Até agora muitos AMPs de escorpiões já foram encontrados e alguns deles são: IsCT1 e IsCT2 (DAI et al., 2001 e 2002) de *Opisthacanthus madagascariensis*; hadrurina (TORRES-LARIOS et al., 2000) de *Hadrurus aztecus* atualmente chamando de *H. gertschi*; pandinina 1 e 2 (CORZO et al., 2001) e scorpina (CONDE et al., 2000) de *Pandinus imperator*; opistoporina 1 e 2 (MOERMAN et al., 2002) de *O. carinatus*; BmKn1 e BmKn2 (ZENG et al., 2001b, 2004 e 2012) de *Mesobuthus martensii*; imcroporina (ZHAO et al., 2009) de *Isometrus maculatus*; mucroporina (DAI et al., 2008) de *Lychas mucronatus*; Css54 (GARCIA et al., 2013) de *Centruroides suffusus suffusus*; vejovine e VmCT1 (HERNANDEZ-APONTE et al., 2011) de *Vaejovis mexicanus*; stigmurin (MELO et al., 2015) de *T. stigmurus*; TsAP-1 e TsAP-2 (XIAOXIAO et al., 2013) de *T. serrulatus*.

Os peptídeos estudados no presente trabalho não apresentaram atividade antibiótica suficiente para que fossem considerados antibióticos em potencial, até mesmo o peptídeo TyPep 15 que apresentou MIC igual a 125 $\mu\text{g/mL}$ (ou concentrações superiores; o mesmo ocorreu sobre uma única cepa de bactéria, e não sobre todas as cepas testadas). Um bom antibiótico atua com concentrações baixas sobre todas as cepas, como foi demonstrado nos resultados ao utilizar os antibióticos controles, Cloranfenicol e Oxitetraciclina.

5.3 Atividade desgranuladora de mastócitos e liberação de LDH

Os mastócitos são células preenchidas com vários grânulos que contêm histamina e outros potentes agentes biologicamente ativos, que quando expostos a substâncias estranhas, liberam o conteúdo destes grânulos citoplasmáticos (HIGASHIJIMA; BURNIER; ROSS, 1990; MENDES; SOUZA; PALMA, 2005).

Desgranulação de mastócitos é importante na patogênese de doenças alérgicas e anafilaxia. Muitos venenos animais contêm componentes que podem induzir a desgranulação dos mastócitos, e possivelmente este fator contribui para a patologia e mortalidade causada por envenenamento. Além de suas funções como células efetoras da anafilaxia e distúrbios alérgicos, existem evidências de que os mastócitos podem melhorar a resposta imune inata por meio de funções, tais como matar diretamente os patógenos ou aumentar as respostas inflamatórias induzidas por agentes patogênicos ou por degradar peptídeos endógenos potencialmente tóxicos gerados em tais configurações (MITSUTERU et al., 2011).

No interior da célula do mastócito há a enzima β -D-glucosaminidase, que quando liberada durante o processo de desgranulação, reage com um substrato sintético, o p-nitrofenil- β -D-glucosamina, clivando-o, e resultando na liberação de p-nitrofenol, o qual possui coloração amarelada em meio básico. O substrato é adicionado em cada pocinho durante o experimento, para se monitorar a desgranulação dos mastócitos, e subsequentemente a liberação da enzima.

A enzima lactato desidrogenase é de localização citoplasmática, e sua liberação para o meio extracelular é utilizada como indicador de lise das membranas plasmáticas dos mastócitos.

Os resultados demonstram que em presença dos cinco peptídeos estudados não ocorreu a liberação de lactato desidrogenase do citoplasma dos mastócitos, e também não ocorreu desgranulação dos mastócitos. Na presença do peptídeo padrão HR1, na concentração de 190 $\mu\text{g/mL}$, pode-se constatar a ocorrência de liberação de 60% da atividade de LDH e 43% de desgranulação na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

5.4 Influência dos peptídeos nas atividades de locomoção e levantamento

A popularidade do teste de campo aberto (desde os anos 1970) provavelmente decorre em grande parte por causa da sua simplicidade, possuindo medição fácil e rápida de comportamentos claramente definidos, e uma interpretação geralmente aceita destes comportamentos. Além disso, alguns dos comportamentos medidos são sensíveis a uma vasta gama manipulações genéticas, experimentais, fisiológicas e farmacológicas, e são suficientemente confiáveis sob condições padronizadas para dar medidas repetíveis em uma vasta gama de variáveis independentes (WALSH; CUMMINS, 1976).

Bhattacharya em 1995 administrou via IC o veneno bruto de *Mesobuthus tamulus* (posteriormente conhecido como *Buthus tamulus*) e foi observado que os ratos diminuíram o número de casas (da arena) locomovidas, permanecendo mais tempo imóveis; levantaram menos (ficar de pé sobre as patas traseiras) e defecaram mais em relação aos animais que receberam somente o veículo controle. Estes dados se aproximaram muito do controle positivo Yohimbine (alcaloide que bloqueia a atividade do receptor α -adrenérgico, produzindo o aumento das sinapses pelo aumento da quantidade de noradrenalina liberada), uma droga que combate a ansiedade (ERNST; PITTLER, 1998).

Nos estudos de Lourenço, Lebrum e Dorce, em 2011, injetou-se (via intravenosa) frações o veneno de *T. bahiensis* (P2 a P7), ou solução salina, em camundongos, sendo que

logo em seguida os animais foram colocados no centro da arena de campo aberto, observando-se os comportamentos por 10 minutos. Neste trabalho foram contabilizados os números de vezes que os camundongos se locomoveram de uma unidade a outra, assim como, registrou-se a frequência de levantamento (ato do animal permanecer sobre as patas traseiras), o tempo que permaneceu imóvel, e número de convulsões. As frações P5, P6 e P7 promoveram um decréscimo no número de casas andadas e levantamentos corporais, e também se observou aumento no tempo em os animais que permaneceram imóveis, possivelmente causado pelos sintomas de convulsões apresentados pelos animais. A fração P3 diminuiu o número de locomoções e levantamento, porém não apresentou sintomas de convulsões; enquanto que a fração P2 diminuiu somente o número de levantamentos.

A administração via intraperitoneal não possui efeitos tão rápidos quanto a via intravenosa, por este motivo, após a administração IP, foi aguardado 15 minutos para o início da avaliação das atividades dos camundongos o modelo de Campo Aberto. Nos experimentos apresentados neste trabalho, somente o peptídeo TyPep 18 apresentou alterações na atividade dos camundongos, aumentando o número de casas andadas (locomoção); porém, sem efeito sobre a levantamento do corpo.

5.5 Atividade hiperalgésica e edematogênica

No campo da dor, peptídeos dos venenos de escorpiões proveram importantes papéis na pesquisa de base e aplicações clínicas; entretanto, apesar da importância destas moléculas e a natureza do veneno deveriam ser mais profundamente investigadas. Até o momento, apenas alguns venenos de escorpiões foram estudados nesse sentido, sendo que as toxinas que ativam canais de sódio foram reportadas como hiperalgésicas (HAKIM et al, 2015). Dentre os peptídeos causadores de dor e ligantes de canais de sódio estudados estão: Amm VIII - toxina do escorpião *Androctonus mauretanicus mauretanicus* que provoca dor, e liga-se ao canal de sódio- sensível à TTX (ABBAS et al., 2013); BmK 1, toxina do escorpião *B. martensi* Karsch, que liga-se ao sítio 3 do receptor do modulador do canal de sódio (BAI et al., 2010).

Apenas alguns trabalhos foram desenvolvidos envolvendo hiperalgesia ou analgesia em animais. Um exemplo foi descrito por Shao et al., 2014: estes pesquisadores analisaram o potencial analgésico do veneno do escorpião *B. martensii*, comparando os efeitos de um peptídeo, BmK AGAP-SYPU2 obtido após vários fracionamentos em HPLC ou controle positivo (morfina). O peptídeo possui alta homologia às α -toxinas de escorpiões, bloqueadoras de canais de sódio, inibindo a neurotransmissão. Apesar de apresentar efeitos

mais lentos que a morfina, apresentou forte efeito analgésico contra dores viscerais e somáticas.

Petricevich et al. (2007) analisaram a toxina Ts1 e uma das frações do veneno de *T. serrulatus* e detectaram o potencial efeito imunomodulador em macrófagos, provocando a liberação de IL-1 α e IL-1 β , que são citocinas responsáveis pelo combate à inflamação.

Pessini et al., em 2008, injetaram de 0,1 a 10 μ g do veneno bruto de *T. serrulatus* diluído em salina intra plantarmente em ratos *Wistar*. Foram observados comportamentos relacionados à dor, resposta mecânica (von Frey) e formação de edema. Após testes prévios, observou-se que a dor iniciava em 30 minutos, teve seu auge após uma hora, e após seis horas voltou a apresentar valores próximos ao do controle negativo (salina).

Com base no presente trabalho podemos afirmar que as concentrações utilizadas foram adequadas (10 e 30 μ g/30 μ L), levando-se em conta que foi utilizado somente peptídeos isolados e não o veneno bruto diluído. Com 10 μ g de peptídeo, para peptídeos biologicamente ativos, já é uma concentração ótima para apresentar os efeitos nos testes de atividade biológica. Foi utilizada uma concentração maior, de 30 μ g/30 μ L, para obter resultados mais abrangentes e confirmar os efeitos que poderiam surgir nos testes com 10 μ g/30 μ L.

As análises das curvas dos gráficos da sensibilidade dolorosa e efeito edematogênico indicam que:

- O peptídeo TyPep 14 alterou significativamente a sensibilidade dolorosa nas concentrações de 10 e 30 μ g/30 μ L, dentro dos parâmetros analisados, podendo afirmar que é um peptídeo que possui potencial efeito hiperalgésico. Somente na primeira hora após a administração que ocorreu reação inflamatória significativa, mas não se pode afirmar que é edematogênico, pois a curva da salina repete o formato e intensidade, talvez pela absorção do volume administrado pela pata ser lenta, influenciando os dados;
- O peptídeo TyPep 15, apresentou efeitos somente na concentração de 30 μ g/30 μ L; sendo assim, dentro dos parâmetros analisados, pode-se afirmar que é um peptídeo que possui potencial efeito hiperalgésico. No caso dos testes de edema, apresentou somente significância nos primeiros 60 minutos, da mesma forma que o TyPep 14, com base nos dados, não podemos afirmar que possui efeito edematogênico em camundongos;
- O peptídeo TyPep 16 em concentração de 10 μ g/30 μ L não apresenta efeito hiperalgésico e edematogênico apesar de possuir um ponto com significância, porém em tempos diferentes. Com 30 μ g/30 μ L o peptídeo mostra resultados positivos e significativos em 60 e 180 minutos, tanto nos testes de hiperalgesia quanto em edematogenia. Este peptídeo

apresenta potencial hiperalgésico e edematogênico para a concentração de 30 µg/30 µL durante as primeiras 3 horas subsequentes da administração do mesmo;

- O peptídeo TyPep 17 com concentração de 10 µg/30 µL não apresentou significativamente potencial hiperalgésico, porém nas três primeiras horas apresentou potencial edematogênico. Na concentração de 30 µg/30 µL, o peptídeo demonstrou características similares ao do controle positivo (Carragenina), tal fato, a princípio, pode ser interpretado como possuindo potencial à hiperalgesia e edematogenia na pata do camundongo;

- O peptídeo TyPep 18 não demonstrou resultados significativos com a concentração de 10 µg/30 µL; na concentração de 30 µg/30 µL apresentou hiperalgesia significativa e nenhuma edematogenia. A partir dos dados pode-se observar que apesar da hiperalgesia apresentada na maior concentração, esta resposta indica uma fraca sensibilidade dolorosa e com curvas similares às da salina, não podendo ser considerado, desta forma, como possuindo um potencial efeito hiperalgésico.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho investigou-se cinco novos pequenos peptídeos lineares isolados do veneno do escorpião *T. serrulatus*, solúveis em acetonitrila 50% (v/v); estes peptídeos foram isolados, sequenciados, sintetizados e purificados, sendo então submetidos a uma série de ensaios biológicos, na tentativa de caracterização funcional dos mesmos.

Nenhum dos peptídeos apresentou atividades hemolíticas, antibióticas, desgranuladoras de mastócitos, ou foi liberado LDH em sua presença. Os peptídeos TyPep 14, 15, 16 e 17 não apresentaram atividade sobre o padrão de locomoção e levantamento do corpo.

O peptídeo TyPep 14 apresentou forte efeito hiperalgésico, e fraco efeito edematogênico, tanto na concentração de 10 µg quanto com 30 µg/30 µL.

O peptídeo TyPep 15 na concentração 10 µg/30 µL apresentou fraco efeito hiperalgésico, e nenhum efeito edematogênico; com 30 µg/30 µL apresentou forte efeito hiperalgésico e fraco efeito edematogênico.

O peptídeo TyPep 16 na concentração 10 µg/30 µL apresentou fraco efeito hiperalgésico, e fraco efeito edematogênico; com 30 µg/30 µL apresentou médio efeito hiperalgésico e médio efeito edematogênico.

O peptídeo TyPep 17 na concentração 10 µg/30 µL apresentou fraco efeito edematogênico e nenhum efeito hiperalgésico; com 30 µg/30 µL apresentou forte efeito hiperalgésico e forte efeito edematogênico.

O peptídeo TyPep 18 na concentração 10 µg/30 µL não apresentou efeitos edematogênico e hiperalgésico; com 30 µg/30 µL apresentou forte efeito hiperalgésico e nenhum efeito edematogênico. Esse peptídeo ainda apresentou ativação no padrão de locomoção dos animais-teste, porém, sem efeito sobre o levantamento do corpo.

De uma maneira geral, parece que os peptídeos ensaiados possuem atividades relacionadas a processos inflamatórios, com produção de dor e formação de edemas localizados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, N.; GAUDIOSO-TYZRA, C.; BONNET, C.; GABRIAC, M.; AMSALEM, M.; LONIGRO, A.; PADILLA, F.; CREST, M.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; DELMAS, P. The scorpion toxin Amm VIII induces pain hypersensitivity through gain-of-function of TTX-sensitive Na⁺ channels. **Pain**, v. 154, p. 1204-1215, 2013.

ALI, S. A.; STOEVA, S.; SCHÜTZ, J.; KAYED, R.; ABASSI, A.; ZAIDI, Z. H.; VOELTER, W. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 121, p. 323-332, 1998.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35-45, 2014.

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

ALMEIDA, D. D.; TORRES, T. M.; BARBOSA, E. G.; LIMA, J. P.; DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 430, n. 1, p. 113-118, 2013.

ALVARENGA, E. R.; MENDES, T. M.; MAGALHAES, B. F.; SIQUEIRA, F. F.; DANTAS, A. E.; BARROCA, T. M.; HORTA, C. C.; KALAPOTHAKIS, E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **O. J. Gen.**, v. 2, p. 210-220, 2012.

AMIR, R.; ARGOFF, C. E.; BENNETT, G. J.; CUMMINS, T. R.; DURIEUX, M. E.; GERNER, P.; GOLD, M. S.; PORRECA, F.; STRICHARTZ, G. R. The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain. **J. Pain**, v. 7, n. 5, s. 3, p. S01-S29, 2006.

ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; SAMPAIO, S. V.; 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. 27, p. 907-916, 1989.

ASHCROFT, F. M. **Ion Channels and Disease**. Academic Press, San Diego, California, 2000.

BAI, Z. T.; LIU, T.; JIANG, F.; CHENG, M.; PANG, X. Y.; HUA, L. M.; SHI, J.; ZHOU, J. J.; SHU, X. Q.; ZHANG, J. W.; JI, Y. H. Phenotypes and peripheral mechanisms underlying inflammatory pain-related behaviors induced by BmK I, a modulator of sodium channels. **Exp. Neurol.**, v. 226, p. 159-172, 2010.

BAO, A.; ZHONG, J.; ZENG, X.; NIE, Y.; ZHANG, L.; PENG, Z. F. A novel cysteine-free venom peptide with strong antimicrobial activity against antibiotics resistant pathogens from the scorpion *Opisthophthalmus glabrifrons*. **J. Pept. Sci.**, v. 21, p. 758-764, 2015.

BATISTA, C. V. F.; DEL POZO, L.; ZAMUDIO, F. Z.; CONTERAS, S.; BECERRIL, B.; WANKE, E.; POSSANI, L. D. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **J. Chromatogr. B**, v. 803, p. 55-66, 2004.

BATISTA, C. V. F.; D'SUZE, G.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; ZAMUDIO, F. Z.; ENCARNACIÓN, S.; SEVCIK, C.; POSSANI, L. D. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. **Proteomics**, v. 6, p. 3718-3727, 2006.

BATISTA, C. V.; ROMAN-GONZALEZ, S. A. SALAS-CASTILLO, S. P.; ZAMUDIO, F. Z.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 146, n. 1-2, p. 147-157, 2007.

BERTAZZI, D. T.; ASSIS-PANDOCHI, A. I.; AZZOLINI, A. E. C. S.; TALHAFFERRO, V. L.; LAZZARINI, M.; ARANTES, E. C. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. **Toxicon**, v. 41, p. 501-508, 2003.

BERTAZZI, D. T.; DE ASSIS-PANDOCHI, A. I.; TALHAFFERRO, V. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; CROTT, L. S. P.; ARANTES, E. C. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, n. 6, p. 1077-1084, 2005.

BHATTACHARYA, S. K. Anxiogenic activity of centrally administered scorpion (*Mesobuthus tumulus*) venom in rats. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1491-1499, 1995.

BIRNBAUM, S. G.; VARGA, A. W.; YUAN, L. L.; ANDERSON, A. E.; SWEATT, J. D.; SCHRADER, L. A. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 803-833, 2004.

BORCHANI, L.; STANKIEWICZ, M.; KOPEYAN, C.; MANSUELLE, P.; KHARRAT, R.; CESTÈLE, S.; KAROUI, H.; ROCHAT, H.; PELHATE, M.; EL AYEB, M. Purification, structure and activity of three insect toxins from *Buthus occitanus tunetanus* venom. **Toxicon**, v. 35, p. 365-382, 1997.

BORTOLUZZI, L. R.; QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 7, n. 3, p. 357-359, 2007.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os escorpiões**. EDUFBA, Salvador, Bahia, Brasil, 2010.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 169-184, 2004.

CAO, L.; LI, Z.; ZHANG, R.; WU, Y.; LI, W.; CAO, Z. StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 213-220, 2012.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated calcium channels. **Annu. Rev. Cell Dev. Bio.**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, W. A.; CESTÈLE, S.; YAROV-YAROVY, V.; YU, F. H.; KONOKI, K.; SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124-141, 2007.

CATTERALL, W. A.; GOLDIN, A. L.; WAXMAN, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 4, p. 397-409, 2005b.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005a.

CESTÈLE, S.; SCHEUER, T.; MANTEGAZZA, M.; ROCHAT, H.; CATTERALL, W. A. Neutralization of Gating Charges in Domain II of the Sodium Channel α Subunit Enhances Voltage-Sensor Trapping by a β -Scorpion Toxin. **J. Gen. Physiol.**, v. 118, n. 3, p. 291-301, 2001.

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

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. **Acta Trop.**, v. 107, p. 71-79, 2008.

CHOE, S. Potassium channel structures. **Nature Rev.**, v. 3, p. 115-121, 2002.

CODDINGTON, J. A.; COLWELL, R. K. Arachnida. In: LEVIN, S. C. (Org.). **Encyclopedia of biodiversity**. New York: Academic Press, 2001. p. 199-218.

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

CONDE, R.; ZAMUDIO, F. Z.; RODRIGUEZ, M. H.; POSSANI, L. D. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. **FEBS Lett.**, v. 471, p. 165-168, 2000.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; VILLEGAS, E.; BARNHAM, K. J.; HE, W.; NORTON, R. S.; NAKAJIMA, T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. **Biochem. J.**, v. 359, p. 35-45, 2001.

CREST, M.; JACQUET, G.; GOLLA, M.; ZERROUK, H.; BENSLIMANE, A.; ROCHAT, H.; MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIR, M. Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca^{2+} -activated K^{+} channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. **J. Bio. Chem.**, v. 267, n. 3, p. 1640-1647, 1992.

DAI, L.; YASUDA, A.; NAOKI, H.; CORZO, G.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAGIMA, T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 286, p. 820-825, 2001.

DAI, L.; CORZO, G.; NAOKI, H.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, p. 1514-1522, 2002.

DAI, C.; MA, Y.; ZHAO, Z.; ZHAO, R.; WANG, Q.; WU, Y.; CAO, Z.; LI, W. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 3967-3972, 2008.

DARBON, H.; ZLOTKIN, E.; KOPEYAN, C.; van RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H. Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion *Androctonus australis* Hector. **Int. J. Pept. Protein Res.**, v. 20, p. 320-330, 1982.

DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **Am. J. Physiol.**, v. 264 (Cell Physiol. 33), p. C361-C369, 1993.

DEMPSEY, C. E. The actions of melittin on membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1031, p. 143-161, 1990.

DI, Z. Y.; YANG, Z. Z.; YIN, S. J.; CAO, Z. J.; LI, W. X. History of study, updated checklist, distribution and key of scorpions (Arachnida: Scorpiones) from China. **Zool. Res.**, v. 35, n. 1, p. 3-19, 2014.

DIEGO-GARCIA, E.; SCHWARTZ, E. F.; D'SUZE, G.; GONZALEZ, S. A.; BATISTA, C. V.; GARCIA, B. I.; DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of 'orphan' components. **Peptides**, v. 28, n. 1, p. 31-37, 2007.

D'SUZE, G.; SCHWARTZ, E. F.; GARCIA-GOMEZ, B. I.; SEVCIK, C.; POSSANI, L. D. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. **Biochimie**, v. 91, n. 8, p. 1010-1019, 2009.

D'SUZE, G.; SANDOVAL, M.; SEVCIK, C. Characterizing *Tityus discrepans* scorpion venom from a fractal perspective: venom complexity, effects of captivity, sexual dimorphism, differences among species. **Toxicon**, v. 108, p. 62-72, 2015.

DU PLESSIS, L. H.; ELGAR, D.; DU PLESSIS, J. L. Southern African scorpion toxins: An overview. **Toxicon**, v. 51, p. 1-9, 2008.

DUAN, K. Z.; XU, Q.; ZHANG, X. M.; ZHAO, Z. Q.; MEI, Y. A.; ZHANG, Y. Q. Targeting A-type K(+) channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in a rat model. **Pain**, v. 153, n. 3, p. 562-574, 2012.

DURAY, P. H.; HATFILL, S. J.; PELLIS, N. R. Venom peptides as human pharmaceuticals. **Sci. & Med.**, v. 4, n. 5, p. 6-15, 1997.

EDMUNDS, M. C.; SIBLY, R. M. Optimal sting use in the feeding behavior of the scorpion *Hadrurus spadix*. **J. Arachnol.**, v. 38, p. 123-125, 2010.

EITAN, M.; FOWLER, E.; HERRMANN, R.; DUVAL, A.; PELHATE, M.; ZLOTKIN, E. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. **Biochem.**, v. 29, p. 5941-5947, 1990.

ERNST, E.; PITTLER, M. H. Yohimbine for erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **J. Urol.**, v. 159, p. 433-436, 1998.

ESCOUBAS, P.; PALMA, M. F.; NAKAJIMA, T. A microinjection technique using *Drosophila melanogaster* for bioassay-guided isolation of neurotoxins in arthropod venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1549-1555, 1995.

FAJLOUN, Z.; KHARRAT, R.; CHEN, L.; LECOMTE, C.; DI LUCCIO, E.; BICHET, D.; EL AYEB, M.; ROCHAT, H.; ALLEN, P. D.; PESSAH, I. N.; de WAARD, M.; SABATIER, J. M. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca^{2+} release channel/ryanodine receptors. **FEBS Lett.**, v. 469, n. 2, p. 179-185, 2000.

FAN, Z.; CAO, L.; HE, Y.; HU, J.; DI, Z.; WU, Y.; LI, W.; CAO, Z. Ctriporin, a new antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Chaerilus tricostatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 11, p. 5220-5229, 2011.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. T.; FERRERO, A.; PÉREZGÓMEZ, A.; NOVELLI, A. Neurotoxins. In: WORSFOLD, P. J.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. F. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Science**. 2. ed. Elsevier Science Ltd, Oxford, UK, 2005. V. 10, p. 134-143.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, G. V.; ODELL, C. L. (Ed.). **Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics**. Pergamon Press, Oxford, 1989. p. 139-159.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A.; AMARAL, C. F. S. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon**, v. 32, p. 1009-1014, 1994.

FROY, O.; ZILBERBERG, N.; GORDON, D.; TURKOV, M.; GILLES, N.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; LORET, E.; OREN, D. A.; SHAANAN, B.;

GUREVITZ, M. The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 9, p. 5769-5776, 1999a.

FROY, O.; SAGIV, T.; POREH, M.; URBACH, D.; ZILBERBERG, N.; GUREVITZ, M. Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels. **J. Mol. Evol.**, v. 48, p. 187-96, 1999b.

FROY, O.; GUREVITZ, M. New insight on scorpion divergence inferred from comparative analysis of toxin structure, pharmacology and distribution. **Toxicon**, v. 42, p. 549-555, 2003.

GALANTER, J. M.; CORNES, S. B.; LOWENSTEIN, D. H. Principles of nervous system physiology and pharmacology. In: GOLAN de, T. J. A.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. (Ed.). **Principles of Pharmacology** - the pathophysiologic basis of drug therapy. 3. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012. Cap. 7, p. 91-106.

GAO, B.; TIAN, C.; ZHU, S. Inducible antibacterial response of scorpion venom gland. **Peptides**, v. 28, p. 2299-2305, 2007.

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

GARCIA, F.; VILLEGAS, E.; ESPINO-SOLIS, G. P.; RODRIGUEZ, A.; PANIAGUA-SOLIS, J. F.; SANDOVAL-LOPEZ, G.; POSSANI, L. D.; CORZO, G. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. **J. Antibiot. (Tokyo)**, v. 66, p. 3-10, 2013.

GAZARIAN, K. G.; GAZARIAN, T.; HERNÁNDEZ, R.; POSSANI, L. D. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. **Vaccine**, v. 23, p. 3357-3368, 2005.

GODDARD, J. **Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance**. 5. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor Francis, 2007.

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

GÓMEZ-LAGUNAS, F.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; ZAMUDIO, F. Z.; POSSANI, L. D. Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards Shaker B K⁺ channels. **J. Membr. Biol.**, v. 152, n. 1, p. 49-56, 1996.

GORDON, D.; KARBAT, I.; ILAN, N.; COHEN, L.; KAHN, R.; GILLES, N.; DONG, K.; STUHMER, W.; TYTGAT, J.; GUREVITZ, M. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 452-472, 2007.

GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M.; ZINN-JUSTIN, S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 17, p. 131-158, 1998.

GUTMAN, G. A.; CHANDY, G. K. Nomenclature of mammalian voltage-dependent potassium channel genes. **Sem. Neurosci.**, v. 5, p. 101-106, 1993.

GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G.; ADELMAN, J. P.; AIYAR, J.; BAYLISS, D. A.; CLAPHAM, D. E.; COVARRIUBIAS, M.; DESIR, G. V.; FURUICHI, K.; GANETZKY, B.; GARCIA, M. L.; GRISSMER, S.; JAN, L. Y.; KARSCHIN, A.; KIM, D.; KUPERSCHMIDT, S.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M.; LESAGE, F.; LESTER, H. A.; MCKINNON, D.; NICHOLS, C. G.; O'KELLY, I.; ROBBINS, J.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M.; SEINO, S.; STUEHMER, W.; TAMKUN, M. M.; VANDENBERG, C. A.; WEI, A.; WULFF, H.; WYMORE, R. S. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 583-586, 2003.

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

HAKIM, A.; WENBIN, J.; W.; LEI, L.; BOWEN, L.; SHILONG, Y.; YUZHU, S.; REN, L. Scorpion toxin, BmP01, induces pain by targeting TRPV1 channel. **Toxins**, v. 7, p. 3671-3687, 2015.

HERNÁNDEZ-APONTEA, C. A.; SILVA-SANCHEZ, J.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; RODRÍGUEZ-ROMERO, A.; BALDERAS, C.; POSSANI, L. D.; GURROLA, G. B. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Lychas mexicanus*. **Toxicon**, v. 57, p. 84-92, 2011.

HIDE, I.; BENNET, J. P.; PIZZEY, A.; BOONEN, G.; SAGI, D. B.; GOMPERTS, B. D.; TATHAM, P. E. R. Degranulation of individual mast cell in response to Ca^{2+} and guanine nucleotides: an all-or-none event. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 3, p. 585-593, 1993.

HIGASHIJIMA, T.; BURNIER, J.; ROSS, E. M. Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 24, p. 14176-14186, 1990.

HORIBA, M.; MUTO, T.; UEDA, N.; OPTHOF, T.; MIWA, K.; HOJO, M.; LEE, J. K.; KAMIYA, K.; KODAMA, I.; YASUI, K. T-type Ca^{2+} channel blockers prevent cardiac cell hypertrophy through an inhibition of calcineurin-NFAT3 activation as well as L-type Ca^{2+} channel blockers. **Life Sci.**, v. 82, p. 554-560, 2008.

HÖSCH, N. G. **Efeito neuroprotetor da N-acetilcisteína sobre a neuropatia alcoólica induzida experimentalmente em ratos.** 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2015.

JENTSCH, T. J.; STEIN, V.; WEINREICH, F.; ZDEBIK, A. A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 503-568, 2002.

JIAN-HUA, S.; YONG, C.; MING-YI, Z.; CHUN-FU, W.; YAN-FENG, L.; JING-HAI, Z. Purification, characterization, and bioactivity of a new analgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **Peptides**, v. 53, p. 89-96, 2014.

JOYA, G.; D'SUZE, G.; SALAZAR, V.; ROSALES, A.; SEVCIK, C.; VISBAL, G.; FERREIRA, A. T. S.; PERALES, J. Scorpion toxins modify phytopathogenic fungus physiology: A possible source of new fungicides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 6327-6337, 2011.

KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. **Toxicon**, v. 35, n. 10, p. 1523-1529, 1997.

KALAPOTHAKIS, E.; JARDIM, S.; MAGALHAES, A. C.; MENDES, T. M.; DE MARCO, L.; AFONSO, L. C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 679-685, 2001.

KHAN, S. N. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. **Mycopath**, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2007.

KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L.; MULLER, K. E.; NIZAM, A. **Selecting the best regression equation**. Applied regression analysis and other multivariable methods. 3. ed. California: Duxbury Press, 1998. p. 387-422.

KODANDARAMAIAH, S.; FRANZESI, G.; CHOW, B.; E. BOYDEN, E.; FOREST, C. R. Automated whole-cell patch clamp electrophysiology of neurons in vivo. **Nature Meth.**, v. 9, n. 6, p. 585-587, 2012.

KOPEYAN, C.; MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIRE, M-F.; ROCHAT, H.; MIRANDA, F. Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*: a new type of alpha-toxin highly toxic both to mammals and insects. **Nat. Toxins**, v. 1, p. 308-312, 1993.

LAI, J.; PORRECA, F.; HUNTER, J. C.; GOLD, M. S. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 371-397, 2004.

LEGROS, C.; CEARD, B.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ Channels. **FEBS Lett.**, v. 431, n. 3, p. 375-380, 1998.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; BRAZIL, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 289-245, 2000.

LISS, B.; FRANZ, O.; SEWING, S.; BRUNS, R.; NEUHOFF, H.; ROEPER, J. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. **EMBO J.**, v. 15, n. 20, p. 5715-5724, 2001.

LIU, T.; BAI, Z. T.; PANG, X. Y.; CHAI, Z. F.; JIANG, F.; JI, Y. H. Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 575, p. 46-56, 2007.

LIU; S. M.; LI, J.; ZHU, J. Q.; WANG, X. W.; WANG, C. S.; LIU, S. S.; CHEN, X. X.; LI, S. Transgenic plants expressing the AaIT/GNA fusion protein show increased resistance and toxicity to both chewing and sucking pests. **Insect Sci.**, v. 0, p. 1-12, 2015.

LÖFGREN, S. E. **Atividades antimicrobiana, antiparasitária e hemolítica de peptídeos antimicrobianos isolados de animais aquáticos.** 98 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LOPEZ-GONZALEZ, I.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; DE LA VEGABELTRAN, J. L.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; POSSANI, L. D.; FELIX, R.; DARSZON, A. Scorpion toxins that block T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 300, p. 408-414, 2003.

LOURENÇO, W. R. Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v. 14, n. 1, p. 19-44, 2008.

LOURENÇO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V.

(Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica**. Sarvier, São Paulo. 2003. p. 182-197.

LUTZ, A.; MELLO, O. Descrição de 5 espécies brasileiras dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica**, v. 4, p. 25-26, 1922.

LYONS, S. A.; O'NEAL, J.; SONTHEIMER, H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. **Glia**, v. 39, n. 2, p. 162-173, 2002.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Biologia. In: _____. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. São Paulo: FUNPEC-Editora, 2011. p. 1-29.

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

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1327, p. 119-130, 1997.

MATTHEWS, E. A.; BEE, L. A.; STEPHENS, G. J.; DICKENSON, A. H. The $Ca_v2.3$ calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n. 12, p. 3561-3569, 2007.

MEBS, D. Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 95, n. 3, p. 131, 2002.

MEISLER, M. H.; KEARNEY, J. A. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. **J. Clin. Invest.**, v. 15, n. 8, p. 2010-2017, 2015.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 101-106, 2005.

MÉNEZ, A.; BONTEMS, F.; ROUMESTAND, C.; GILQUIN, B.; TOMA, F. Structural basis for functional diversity of animal toxins. **Proc. R. Soc.**, v. 99, n. 1-2, p. 83-103, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Distrito Federal, Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009.

MITSUTERU, A.; CHANG, H. S.; PILIPONSKY, A. M.; METZ, M.; GUZZETTA, A.; ÅBRINK, M.; SCHLENNER, S. M.; FEYERABEND, T. B.; RODEWALD, H.; PEJLER, G.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Mast cell chymase reduces the toxicity of Gila monster venom, scorpion venom, and vasoactive intestinal polypeptide in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 10, p. 4180-4091, 2011.

MLAYAH-BELLALOUNA, S.; DUFOUR, M.; MABROUK, K.; MEJDOUB, H.; CARLIER, E.; OTHMAN, H.; BELGHAZI, M.; TARBE, M.; GOAILLARD, J. M.; GIGMES, D.; SEAGAR, M.; EL AYEB, M.; DEBANNE, D.; SRAIRI-ABID, N. AaTX1, from *Androctonus australis* scorpion venom: purification, synthesis and characterization in dopaminergic neurons. **Toxicon**, v. 92, n. 15, p. 14-23, 2014.

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; THEVISSSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J.; VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 4799-4810, 2002.

MS/FIOCRUZ/SINITOX. **Brasil**: Tabela 11. Óbitos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e circunstância. Brasil, 2010.

NENCIONI, A. L. A.; BARRETO, S. A.; LEBRUN, I.; FLORIO, J. C.; LOURENÇO, G. A.; DORCE, V. A. C. Neurotransmitter evaluation in the hippocampus of rats after intracerebral injection of TsTX scorpion toxin. **J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 15, n. 2, p. 236-254, 2009.

NISANI, Z.; BOSKOVIC, D. S.; DUNBAR, S. G.; KELLN, W.; HAYES, W. K. Investigating the chemical profile of regenerated scorpion (*Parabuthus transvaalicus*) venom in relation to metabolic cost and toxicity. **Toxicon**, v. 60, p. 315-323, 2012.

OREN, D.; FROY, O.; AMIT, E.; KLEINBERGER-DORON, N.; GUREVITZ, M.; SHAANAN, B. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional α helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. **Structure**, v. 6, p. 1095-1103, 1998.

ORTIZ, E.; POSSANI, L. D. The unfulfilled promises of scorpion insectotoxins. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 21, n. 16, 2015.

ORTIZ, E.; GURROLA, G. B.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125-135, 2015.

PÉREZ-PAYÁ, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLONDELLE, S. E. The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 3, p. 1048-1056, 1995.

PÉREZ-PAYÁ, E.; PORCAR, I.; GÓMEZ, C. M.; PEDRÓS, J.; AGUSTÍN CAMPOS, A.; ABAD, C. Binding of basic amphipathic peptides to neutral phospholipid membranes: A thermodynamic study applied to dansyl-labeled melittin and substance P analogues. **Biopolymers**, v. 42, n. 2, p. 169-181, 1997.

PETRICEVICH, V. L.; CRUZ, A. H.; CORONAS, F. I. V.; POSSANI, L. D. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. **Toxicon**, v. 50, p. 666-675, 2007.

PESSINI, A. C.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D. C.; MACHADO, R. R.; SOARES, D. M.; FIGUEIREDO, M. J.; KALAPOTHAKIS, E.; SOUZA, G. E. P. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. **Toxicon**, v. 52, p. 729-736, 2008.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediat. Inflamm.**, v. 2010, p. 1-16, 2010.

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

PUCCA, M. B.; AMORIM, F. G.; CERNI, F. A.; BORDON KDE, C.; CARDOSO, I. A.; ANJOLETTE, F. A.; ARANTES, E. C. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, p. 326-336, 2014.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; JUNIOR, E. L. P.; BORDON, K. C. F.; AMORIM, F. G.; CORDEIRO, F. A.; LONGHIM, H. T.; CREMONEZ, C. M.; OLIVEIRA, G. H.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272-284, 2015a.

PUCCA, M. B.; OLIVEIRA, F. N.; SCHWARTZ, E. F.; ARANTES, E. C.; LIRA-DASILVA, R. M. Scorpionism and dangerous species of Brazil. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. (Ed.). **Scorpion Venoms**. Springer, Netherlands. 2015b.

RATES, B.; FERRAZ, K. K.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 611-618, 2008.

REMIJSEN, Q.; VERDONCK, F.; WILLEMS, J. Parabutoporphin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: Much more than an antibiotic. **Toxicon**, v. 55, p. 180-185, 2010.

RAMÍREZ-CARRETO, S.; QUINTERO-HERNANDEZ, V.; JIMENEZ-VARGAS, J. M.; CORZO, G.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; ORTIZ, E. Gene cloning and functional

characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. **Peptides**, v. 34, p. 290-295, 2012.

RAMÍREZ-CARRETO, S.; JIMÉNEZ-VARGAS, J. M.; RIVAS-SANTIAGO, B.; CORZO, G.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; ERNESTO ORTIZ, E. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. **Peptides**, v. 73, p. 51–59, 2015.

ROGOWSKI, R. S.; KRUEGER, B. K.; COLLINS, J. H.; BLAUSTEIN, M. P. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 4, p. 1475-1479, 1994.

ROGOWSKI, R. S.; KRUEGER, B. K.; COLLINS, J. H.; BLAUSTEIN, M. P. ERRATUM. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 12051-12051, 1996.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 46, p. 455-472, 1984.

SANDHIYA, S.; DKHAR, S. A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. **Indian J. Med. Res.**, v. 129, p. 223-232, 2009.

SANTOS, M. D. S. **Descrição do macho de *Tityus kuryi* Lourenço 1997 e notas sobre os machos de *Tityus stigmurus* Thorell 1877 e *Tityus serrulatus* Lutz & Mello 1922 (Scorpiones: Buthidae)**. 41 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SATO, C.; UENO, Y.; ASAI, K.; TAKAHASHI, K.; SATO, M.; ENGEL, A.; FUJIYOSHI, Y. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. **Nature**, v. 409, p. 1047-1051, 2001.

SCHAFFRATH, S.; PREDEL, R. A simple protocol for venom peptide barcoding in Scorpions. **EuPA Open Proteomics**, v. 3, p. 239-245, 2014.

SILVA, D. T. C. **Avaliação de atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba**. 30 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SINAN/SVS/MS **Casos de acidentes por escorpiões**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013*. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-09---CASOS---escorpiao---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2015.

SISSOM, W. D. Systematics, biogeography and paleontology. In: POLIS, G. A. (Ed.). **The biology of scorpions**. California: Stanford University Press, Palo Alto, 1990. p. 64-160.

SOVAK, M.; SIEFERT, H. M.; RANGANATHAN, R. Combined methods for assessment of neurotoxicity: testing of new nonionic radiographic media. **Invest Radiol.**, v. 15, s. 6, p. S248-S253, 1980.

STEVENS, M.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Front. Pharmacol.**, v. 2, p. 1-13, 2011.

STEWART, L. M. D.; HIRST, M.; FERBER, M. L.; MERRYWEATHER, A. T.; CAYLEY, P. J.; POSSEE, R. D. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. **Nature**, v. 352, p. 85-88, 1991.

SUPPIRAMANIAM, V.; ABDEL-RAHMAN, E. A.; BUABEID, M. A.; PARAMESHWARAN, K. Ion Channels. In: MCQUEEN, C. A. (Ed.). **Comprehensive Toxicology**. Oxford: Academic Press., Auburn, AL, USA, 2010. v. 13, p. 129-171.

TAKASUGI, Y.; SHIRAI, T.; FUTAGAWA, K.; KOGA, Y.; EGAWA, K.; WATANABE, S.; UMEDA, T. Transcutaneous cisternal puncture for sampling of cerebrospinal fluid in awake rat. **Exp. Anim.**, v. 54, n. 2, p. 193-196, 2005.

TAN, P. T. J.; SRINIVASAN, K. N.; SENG, H. S.; KOH, J. L. Y.; TAN, T. W.; RANGANATHAN, S.; BRUSIC, V. Accurate prediction of scorpion toxin functional properties from primary structures. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 24, p. 17-24, 2005.

TAO, C.; ZHANG, G.; YING XIONG, Y.; ZHOU, Y. Functional dissection of synaptic circuits: *in vivo* patch-clamp recording in neuroscience. **Front. Neural Circuits**, v. 9, a. 23, p. 1-8, 2015.

TIAN, C.; YUAN, Y.; ZHU, S. Positively selected sites of scorpion depressant toxins: possible roles in toxin functional divergence. **Toxicon**, v. 51, p. 555-562, 2008.

TOMALSKI, M. D.; MILLER, L. K. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. **Nature**, v. 352, p. 82-85, 1991.

TORRES-LARIOS, A.; GURROLA, G. B.; ZAMUDIO, F. Z.; POSSANI, L. D. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5023-5031, 2000.

TUŬCHIBAEV, M. U.; AKHMEDOVA, N. U.; KAZAKOV, I.; KORNEEV, A. S.; GAGEL'GANS, A. I. Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*. Structure and function. **Biokhimiia**, v. 53, n. 2, p. 219-226, 1988.

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

VALDIVIA, H. H.; POSSANI, L. D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 8, n. 3, p. 111-118, 1998.

VALK, T. V. D.; MEIJDEN, A. V. D. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, v. 88, p. 38-43, 2014.

VASCONSELOS, 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. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 141, p. 85-92, 2005.

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

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

VERDONCK, F.; BOSTEELS, S.; DESMET, J.; MOERMAN, L.; NOPPE, W.; TYTGAT, J.; VAN DER WALT, J. A novel class of pore-forming peptides from the venom of *Parabuthus schlechteri* (Purcell). **Cimbebasia**, v. 16, p. 247-260, 2000.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: A Critical Review. **Psychol. Bull.**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WHITE, J. A.; MCALPINE, P. J.; ANTONARAKIS, S.; CANN, H.; EPPIG, J. T.; FRAZER, K.; FREZAL, J.; LANCET, D.; NAHMIAS, J.; PEARSON, P.; PETERS, J.; SCOTT, A.; SCOTT, H.; SPURR, N.; TALBOT, C.; POVEY, S. Guidelines for human gene nomenclature. **Genomics**, v. 45, p. 468-471, 1997.

WIBLE JR, J. H.; BARCO, S. J.; SCHERRER, D. E.; WOJDYLA, J. K.; ADAMS, M. D. Neurotoxicity of non-ionic X-ray contrast media after intracisternal administration in rats. **Eur. J. Radiol.**, v. 19, p. 206-211, 1995.

WILLEMS, J.; NOPPE, W.; MOERMAN, L.; VAN DER WALT, J.; VERDONCK, F. Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. **Toxicon**, v. 40, p. 1679-1683, 2002.

XIAOXIAO, G.; CHENGBANG, M.; QIANG, D.; RAN, W.; LEI, W.; MEI, Z.; TIANBAO, C.; CHRIS, S. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, p. 1784-1794, 2013.

YAJUAN, X.; XIN, L.; ZHIYUAN, L. A comparison of the performance and application differences between manual and automated patch-clamp techniques. **Curr. Chem. Genomics**, v. 6, p. 87-92, 2012.

YUAN, W.; CAO, L.; MA, Y.; MAO, P.; WANG, W.; ZHAO, R.; WU, Y.; CAO, Z.; LI, W. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 22-26, 2010.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; PENG, F.; ZHU, Z. H. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB Life**, v. 49, p. 207-210, 2000.

ZENG, X. C.; PENG, F.; LUO, F.; ZHU, S. Y.; LIU, H.; LI, W. X. Molecular cloning and characterization of four K⁺-toxin-like peptides: A new subfamily of venom peptides (alpha-KT614) and genomic analysis of a member. **Biochimie.**, v. 83, p. 883-889, 2001a.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; WANG, S. X.; ZHU, S. Y.; LUO, F. Precursor of a novel scorpion venom peptide (BmKn1) with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB Life**, v. 51, p. 117-120, 2001b.

ZENG, X. C.; WANG, S. X.; ZHU, Y.; ZHU, S. Y.; LI, W. X. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **Peptides**, v. 25, p. 143-150, 2004.

ZENG, X.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB Life**, v. 57, n. 1, p. 13-21, 2005.

ZENG, X. C.; WANG, S.; NIE, Y.; ZHANG, L.; LUO, X. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. **Peptides**, v. 33, p. 44-51, 2012.

ZENG, X.; ZHOU, L.; SHI, W.; LUO, X.; ZHANG, L.; NIE, Y.; WANG, J.; WU, S.; CAO, B.; CAO, H. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. **Peptides**, v. 45, p. 28-34, 2013.

ZHAO, Z.; MA, Y.; DAI, C.; ZHAO, R.; LI, S. R.; WU, Y.; CAO, Z.; LI, W. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculates*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 8, p. 3472-3477, 2009.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M.; WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, v. 47, p. 348-355, 2006.

ZLOTKIN, E.; MIRANDA, F.; LISSITZKY, S. Proteins in scorpion venoms toxic to mammals and insects. **Toxicon**, v. 10, p. 207-209, 1972.

ZLOTKIN, E. Pharmacology of survival: insect selective neurotoxins derived from scorpion venom. **Endeavour**, v. 11, p. 168-174, 1987.

ZLOTKIN, E. Insect selective neurotoxins from scorpion venoms affecting sodium conductance. In: LAZAROVICI, P.; GUTMAN, Y. (Ed.). **Toxins and Signal Transduction**. Harwood Press, Amsterdam, 1997. p. 95-117.