

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**ANDRÉ MIASATO HIGA**

**PROPRIEDADES MOLECULARES, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E**  
**IMUNOLÓGICAS DAS TOXINAS PROTÉICAS DO VENENO DE**  
***Brotheas amazonicus* LOURENÇO, 1988 (CHACTIDAE, SCORPIONES)**

**Manaus/AM**  
**2008**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**ANDRÉ MIASATO HIGA**

**PROPRIEDADES MOLECULARES, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E**  
**IMUNOLÓGICAS DAS TOXINAS PROTÉICAS DO VENENO DE**  
***Brotheas amazonicus* LOURENÇO, 1988 (CHACTIDAE, SCORPIONES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof°. Dr°. Jorge Luis López Lozano

**Manaus/AM**  
**2008**

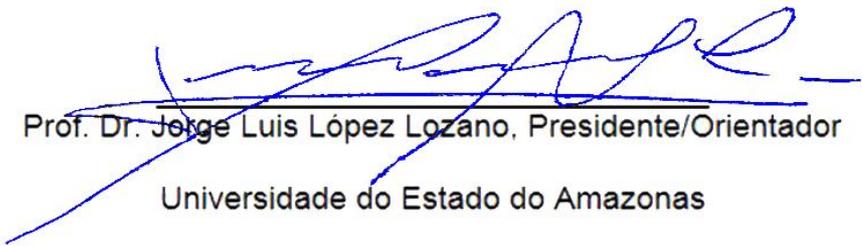
ANDRÉ MIASATO HIGA

**PROPRIEDADES MOLECULARES, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E  
IMUNOLÓGICAS DAS TOXINAS PROTÉICAS DO VENENO DE  
*Brotheas amazonicus* LOURENÇO, 1988 (CHACTIDAE, SCORPIONES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade Estadual do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Ciências Biológicas.

Aprovado em 30/12/2008

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Jorge Luis López Lozano, Presidente/Orientador

Universidade do Estado do Amazonas

  
Profª. Drª. Rosany Picolloto Carvalho, Membro

Universidade Federal do Amazonas

  
Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, Membro

Universidade Federal do Amazonas

À minha avó Sigureko Miasato

Em memória de Seibim Miasato, e Thameo e Hatsuko Higa

"Conhecendo a ti mesmo e ao teu inimigo, não precisarás temer o resultado de cem batalhas"

*Sun Tzu*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que sempre, de alguma forma, procurou me incentivar a fazer o melhor possível em tudo;

Ao professor Luís López Lozano, pela paciência, amizade, incentivo e principalmente, por ter acreditado em nossa capacidade;

À Maria das Dores Nogueira Noronha, pela amizade sincera e disposição em ajudar, mesmo nas horas mais difíceis;

Aos colegas novatos de mestrado Rebecca Tavares, André Luiz e João Paulo, pelo companheirismo e amizade no laboratório e fora dele;

Aos colegas Marx Pereira, Bruno Medeiros, Emiro Muniz e Thiago de Araújo, por terem me ajudado nos primeiros passos rumo à toxinologia;

À Juliana de Souza Araújo e à Professora Nair Otaviano Aguiar, por contribuir com o Centro de Ofidismo Prof. Paulo Friedrich Bürnhein, e assim realizarmos nosso trabalho;

Ao professor Paulo Friedrich Bürnhein, que apesar de nunca te-lo conhecido em vida, foi o responsável pelos recursos humanos e de infra-estrutura necessários para o estudo da toxinologia no Amazonas;

À professora Rosany Piccolotto Carvalho pelas lições e recomendações acerca do trabalho, e ao professor Edmar Vaz de Andrade pelas críticas construtivas ao trabalho;

Aos colegas do curso de graduação, assim como aos professores, pelos momentos compartilhados juntos e pela dedicação ao curso;

À CAPES pela bolsa, à UEA pela oportunidade de qualificação e ao CNPq e à FINEP pelo financiamento do equipamento.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**μL** – microlitro

**μg** – micrograma

**Aα** – cadeia A alfa

**AgNO<sub>3</sub>** – nitrato de prata

**Bβ** – cadeia B beta

**Cγ** – cadeia C gama

**Ca<sup>+</sup>** – íon cálcio

**Cl<sup>2+</sup>** – íon potássio

**DL 50** – dose letal 50%

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

**K<sup>+</sup>** – íon potássio

**kDa** – kilodaltons

**L** – litro

**M** – molar

**mA** – miliamperes

**mg** – miligrama

**mL** – mililitro

**mm** – milímetro

**Na<sup>+</sup>** – íon sódio

**NL** – Não linear (Non linear)

**PBS** – Tampão fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

**pH** – potencial Hidrogeniônico

**pI** – Ponto isoelétrico

**PMS** – Fenil metano sulfonil fluoridro

**SDS** – Sódio dodecil sulfato

**SSF** – Solução salina fisiológica

**TBS** – Tris-Glicina-Metanol

**TBS-T** – Tris-Glicina-Metanol-Tween

**V** – Voltz

**W** - Watts

## LISTA DE TABELAS

- tabela 1** – Atividade fosfolipásica  $A_2$  do veneno de *Brotheas amazonicus*.....45
- tabela 2** – Avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos sobre a atividade fosfolipásica do veneno de *B. amazonicus* .....46
- tabela 3** – Neutralização pelo soro antiescorpiônico da atividade proteolítica do veneno de *B. amazonicus* sobre o fibrinogênio bovino .....49
- tabela 4** – Efeito analgésico do veneno de *B. amazonicus* avaliado pela quantificação das contorções abdominais em camundongos induzidos por ácido acético glacial 0,6%.....52
- tabela 5** – Efeito analgésico do veneno de *B. amazonicus* avaliado pela quantificação do tempo de duração da dor nas patas de camundongos induzidos por formalina 2%. .....52

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>gráfico 1</b> – Atividade inflamatória do veneno bruto (Vermelho) e veneno bruto com proteases inibidas (Azul) de <i>Brotheas amazonicus</i> , nos coxins das patas esquerdas (Vermelho) e direitas (Azul) de camundongos após injeção, em um intervalo de 6 horas .....	50
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>figura 1</b> – <i>Brotheas amazonicus</i> LOURENÇO, 1988 (macho).....	17
<b>figura 2</b> – Gráfico representando a incidência de escorpionismo no mundo.....	20
<b>figura 3</b> – Representação da toxina LqhaIT, de <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i> , altamente tóxica para insetos e pouco tóxica a humanos.....	24
<b>figura 4</b> – Representação do canal de sódio .....	25
<b>figura 5</b> – Toxinas de escorpiões específicas para canais de potássio e seus domínios.....	26
<b>figura 6</b> – Estrutura de uma toxina específica para canais de cloro.....	27
<b>figura 7</b> – Métodos de captura de escorpiões.....	45
<b>figura 8</b> – Atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> do veneno de <i>Brotheas amazonicus</i> . .....	51
<b>figura 9</b> – Avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos sobre a atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> do veneno de <i>B. amazonicus</i> . .....	46
<b>figura 10</b> – Avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos sobre a atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> do veneno de <i>B. amazonicus</i> . .....	46
<b>figura 11</b> – Zimograma da atividade proteolítica sobre gelatina .....	47
<b>figura 12</b> – Zimograma da atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino .....	47
<b>figura 13</b> – Zimograma de avaliação da inibição de atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino do veneno de <i>Brotheas amazonicus</i> . .....	48
<b>figura 14</b> – Tubos de ensaio contendo solução de fibrinogênio bovino incubados previamente com o veneno de <i>Brotheas amazonicus</i> , e em seguida aplicado 2 µg do veneno de <i>Bothrops atrox</i> . .....	49
<b>figura 15</b> – Perfil molecular SDS-PAGE da degradação proteolítica do fibrinogênio bovino pelo veneno de <i>B. amazonicus</i> . .....	50
<b>figura 16</b> – Eletroforese SDS-PAGE a 12,5%, corado com prata. ....	53
<b>figura 17</b> – Eletroforese tris-tricina do veneno de <i>B. amazonicus</i> , corado com nitrato de prata. ....	54
<b>figura 18</b> – Eletroforese bidimensional do veneno de <i>Brotheas amazonicus</i> (500 µg), pH 3,0 – 11,0 NL gel gradiente SDS-PAGE 4 % a 20% de acrilamida, “strips” 13 cm. ....	55
<b>figura 19</b> – Eletroforese bidimensional do veneno de <i>Brotheas amazonicus</i> (750 µg), pH 4,0 – 7,0 NL gel gradiente SDS-PAGE 4% a 20% de acrilamida, e “strips” de 13 cm. ....	56

**figura 20** – Eletroforese bidimensional do veneno de *Brotheas amazonicus* (750 µg), pH 7,0 – 10,0 NL gel gradiente SDS-PAGE 4% a 20% de acrilamida, e “strips” de 13 cm. .... 57

**figura 21** – Perfil imunológico por western blotting do veneno de *B. amazonicus* em condições não redutoras..... 58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 BIOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
1.1.1 <i>Brotheas amazonicus</i> (Lourenço, 1998).....	17
<b>1.2 ESCORPIONISMO</b> .....	<b>18</b>
1.2.1 Importância médica .....	19
1.2.2 Escorpionismo no mundo.....	19
1.2.3 Escorpionismo no Brasil.....	20
<b>1.3 TOXINOLOGIA DO VENENO DE ESCORPIÃO</b> .....	<b>21</b>
1.3.1 Proteínas de alta massa molecular em venenos de escorpiões .....	22
1.3.2 Toxinas de baixa massa molecular: peptídeos .....	23
1.3.2.1 <i>Toxinas com afinidade para canais de Na<sup>+</sup></i> .....	23
1.3.2.2 <i>Toxinas com afinidade para canais de K<sup>+</sup></i> .....	25
1.3.2.3 <i>Toxinas com afinidade para canais de Cl<sup>-</sup></i> .....	26
1.3.2.4 <i>Toxinas com afinidade para canais de Ca<sup>2+</sup></i> .....	27
<b>1.4 A DOR E ANALGÉSICOS</b> .....	<b>28</b>
1.4.1 Neuropeptídeos de escorpiões como analgésicos.....	29
<b>1.5 BIOTECNOLOGIA ASSOCIADA AO VENENO DE ESCORPIÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 ANIMAIS DE LABORATÓRIO</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 OBTENÇÃO DO VENENO</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE <i>Brotheas amazonicus</i></b> .....	<b>34</b>
4.3.1 Avaliação e neutralização por antivenenos da atividade fosfolipásica A <sup>2</sup> .....	34

4.3.2	Avaliação da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio .....	35
4.3.3	Degradação das atividades do fibrinogênio .....	36
4.3.4	Avaliação da atividade inflamatória .....	36
4.3.5	Avaliação da atividade letal.....	36
4.3.5.1	<i>Avaliação das atividades do veneno sobre a hemostasia sanguínea</i> ....	37
4.3.5.2	<i>Inoculação das atividades do veneno no Sistema Nervoso Central</i> .....	37
4.3.6	Avaliação da atividade analgésica .....	38
4.3.6.1	<i>Teste do ácido acético</i> .....	38
4.3.6.2	<i>Teste da formalina</i> .....	38
<b>4.4</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DO VENENO DE <i>Brotheas amazonicus</i></b> .....	<b>39</b>
4.4.1	Eletroforese SDS-PAGE .....	39
4.4.2	Eletroforese gradiente SDS-PAGE .....	39
4.4.3	Zimograma da atividade proteolítica sobre fibrinogênio e gelatina .....	40
4.4.4	Eletroforese SDS-PAGE Tris-tricina .....	40
4.4.5	eletroforese Bi-dimensional.....	41
4.4.5.1	<i>Primeira dimensão: Focalização isoelétrica</i> .....	41
4.4.5.2	<i>Eletroforese gradiente SDS-PAGE</i> .....	42
<b>4.5</b>	<b>COLORAÇÕES PARA O GEL DE POLIACRILAMIDA.....</b>	<b>42</b>
4.5.1	Coloração por “coomassie blue” .....	42
4.5.2	Eletroforese gradiente SDS-PAGE .....	42
<b>4.6</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS .....</b>	<b>43</b>
4.6.1	Análise por “Western Blotting” .....	43
<b>4.7</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>44</b>
<b>4.8</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE <i>Brotheas amazonicus</i></b> .....	<b>45</b>
5.1.1	Detecção da atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	45
5.1.2	Avaliação e neutralização por antivenenos da atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	47

5.1.2.1 Zimograma da inibição da atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino.....	48
5.1.2.2 Avaliação da degradação proteolítica do fibrinogênio bovino pelo veneno de <i>B. amazonicus</i> .....	49
5.1.2.3 Imuno-neutralização pelo soro anti-escorpiônico da atividade proteolítica do veneno de <i>B. amazonicus</i> sobre o fibrinogênio bovino .....	49
5.1.2.4 Perfil eletroforético da degradação proteolítica do fibrinogênio bovino pelo veneno de <i>B. amazonicus</i> .....	50
5.1.3 Avaliação da atividade letal e do efeito de hemostasia sangüínea do veneno de <i>B. amazonicus</i> .....	51
5.1.4 Avaliação da atividade inflamatória.....	51
5.1.5 Avaliação por injeção intracranial do efeito analgésico do veneno e da morfina .....	52
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS TOXINAS do veneno de <i>Brotheas amazonicus</i> .....</b>	<b>53</b>
5.2.1 Perfil molecular por eletroforese unidimensional SDS-PAGE .....	53
5.2.2 Perfil molecular por eletroforese bidimensional.....	55
5.2.3 Análise imunológica por “western blotting” .....	58
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>9 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>67</b>

## RESUMO

Venenos de escorpiões apresentam uma mistura complexa de proteínas e peptídeos neurotóxicos, que são os responsáveis pelos efeitos tóxicos nos mamíferos e insetos. O escorpião *Brotheas amazonicus* é uma espécie muito comum nas florestas das áreas rurais de Manaus, alimentando-se de insetos, mas evidências clínicas sugerem baixa toxicidade de suas toxinas em caso de acidente em humanos. Neste trabalho estamos apresentando dados sobre a composição química, propriedades biológicas e imunológicas das toxinas do veneno de *B. amazonicus*. Técnicas proteômicas (SDS-PAGE gradiente, SDS-PAGE tris-tricina e 2D) indicam constituintes com massas moleculares de 7 a 80 kDa, principalmente toxinas com pI de 4 a 7. No veneno foi detectada atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> que não foi inibida pelos antivenenos antiescorpiônico, antiaracnídeo, antielapídico, antilonomia e antiofídico, sugerindo epitopos próprios da espécie. Foi detectada a atividade de serinoproteases com massa molecular de 70 kDa que degrada as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio bovino sem produzir coágulo de fibrina. A atividade da serinoprotease foi inibida pelo soro antiescorpiônico. Quando injetado intravenosamente em camundongos, o veneno não produz hemorragia e o sangue não se torna incoagulável. Com a dose máxima testada (100  $\mu$ g), via intracranial e endovenosa, não foi observada letalidade em camundongos. Os testes de indução da dor com a formalina e o ácido acético indicam, ao nível do sistema nervoso central, uma potente atividade inibitória do veneno sobre a dor de origem inflamatória e em menor grau sobre a dor de origem neurogênica, e não foram observados sintomas de euforia. Análises por Western Blotting demonstraram a formação de complexo antígeno-anticorpos entre as toxinas de *B. amazonicus* e as IgG dos antivenenos antiescorpiônico e antiaracnídeo, mas nenhum desses antivenenos reconheceu as toxinas de 7 kDa do veneno. A baixa toxicidade do veneno e o potente efeito analgésico das toxinas do veneno de *B. amazonicus* sugerem um grande potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

## ABSTRACT

Scorpion venoms show a complex mixture of neurotoxic protein and peptides which causes toxic effects in mammals and insects. *Brotheas amazonicus* scorpion is an abundant specimen in Manaus rural areas and feeds of insects. Clinical evidences suggest very low toxicity from his venom for humans. In this work we are introducing results about chemical composition, biological and immunological properties of toxins from *B. amazonicus* venom. Proteomic methods (gradient SDS-PAGE, tris-tricine SDS-PAGE and 2D) showed constituents 7 and 80 kDa molecular mass range, mainly toxins with Ip 4 – 7 range. The venom showed phospholipasic A<sub>2</sub> activity that was not inhibited by antiscorpion, antiarachnide, antilonomia, antielapidic and antiophydian antivenoms, suggesting exclusive toxin epitopes of the specie. Venom also showed serineproteases toxins with 70 kDa molecular mass, which degrades A $\alpha$  and B $\beta$  bovine fibrinogen chain, and without fibrin coagulation. Serineproteinase activity was inhibited by antiscorpion antivenom. Bleeding and blood incoagulation was not detected in mice after intravenous venom injection. Lethal activity with 100  $\mu$ g of venom was not observed in mice after intracranial and intravenous venom injection. Formalin and acetic acid test to pain induction showed that, in nervous central system level, venom toxins have a potent analgesic activity of pain of inflammatory origin but in minor level to pain of neurogenic origin, and euphoria signals were not observed. Western blotting test showed antigen-antibody interaction between *B. amazonicus* venom toxins and IgG antibody antiscorpionic and antiarachnide antivenoms, but both antivenoms were not detected at 7kDa venom toxins. Venom has very low toxicity in mice (mammals), and a potent analgesic activity of toxins from *B. amazonicus* venom suggest a high biotechnological application to development of analgesic drugs.

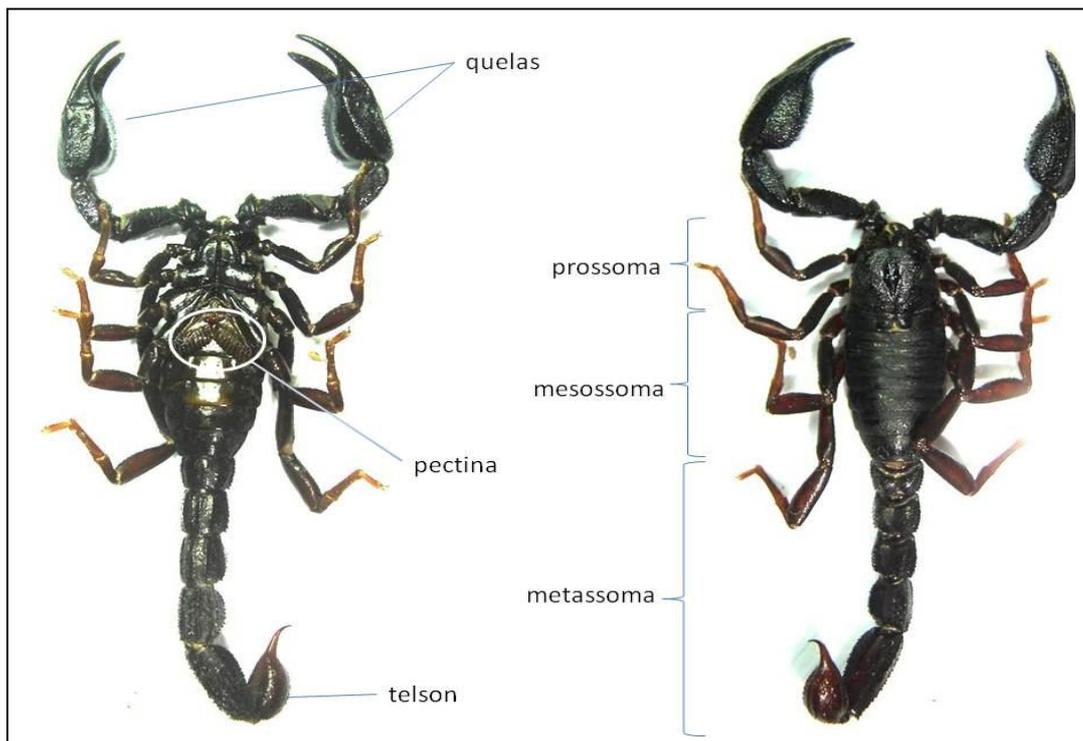
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *BIOLOGIA*

Considerados pelos estudiosos como um dos grupos de artrópodes terrestres mais bem sucedidos no mundo devido à sua plasticidade, os escorpiões estão distribuídos por todo o globo terrestre, a não ser nos pólos. Junto com as aranhas e ácaros, eles fazem parte da classe Arachnida, tendo como característica principal as oito patas além do cefalotórax e abdômen (BARNES, 1996).

Como característica exclusiva desse grupo, eles possuem um órgão sensório externo, a pectina, mas eles são reconhecidos principalmente por possuírem um par de apêndice em forma de pinça, conhecidas como quelas, e uma estrutura inoculadora e produtora de veneno, o télson. A produção do veneno ocorre em duas glândulas situadas no télson, na parte mais distal do metassoma (POLIS, 1990).

Erroneamente chamada de cauda, o metassoma é na verdade uma continuação do abdômen. Todos os escorpiões possuem glândulas de veneno, mas apenas poucas das mais de 1500 espécies são reconhecidas por serem perigosas e letais ao homem (LOURENÇO, 2007).



**Figura 1: *Brotheas amazonicus* LOURENÇO, 1988 (macho).** Vista ventral (esquerda) e vista dorsal (direita).

### 1.1.1 *Brotheas amazonicus* (Lourenço, 1988)

Escorpião pertencente à família Chactidae, é encontrado basicamente em platôs de floresta primária e campina, vivendo embaixo de troncos em decomposição, em buracos no chão da floresta, próximo a colônias de cupim e em liteira de palmeiras. Endêmico de regiões próximas à Manaus, é uma espécie reconhecida por ser um dos escorpiões que prefere viver perto do solo, já que muitas espécies de escorpiões preferem habitar outros tipos de extratos florestais.

Animais insetívoros são uma constante ameaça para *B. amazonicus*, tendo principalmente as formigas caçadoras, sapos e lagartos como seus principais predadores. Acredita-se que, devido à incidência de predadores, o fato de encontrar esta espécie em locais com várias estruturas naturais para se esconder é uma resposta de *B. amazonicus* à predação (HÖFER, 1996). É considerado uma das maiores espécies de escorpião da Amazônia, podendo chegar até 7 cm de comprimento. Seu gênero é encontrado na América do Sul, compreendendo o Brasil, Colômbia, as Guianas e Venezuela (LOURENÇO, 2002).

*B. amazonicus* tem o veneno de baixa letalidade em mamíferos. Sua DL<sub>50</sub> para camundongos (*Mus musculus*) é de 90,909 mg/Kg, muito menos letal do que o veneno de *Tityus serrulatus* (BORGES, 2007), uma das espécies que mais causa acidentes no sudeste brasileiro (NISHIKAWA, 2004). Não se tem informações epidemiológicas da letalidade de *B. amazonicus* em humanos.

## **1.2 ESCORPIONISMO**

### **1.2.1 Importância Médica**

Até a década de 90, escorpiões foram os animais não-parasitas que mais causaram morte no mundo, com exceção de cobras e abelhas (POLIS, 1990). Entretanto, no ano de 2001 a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta os escorpiões como segunda maior causa de fatalidades no mundo. 30 espécies de escorpiões estão registradas atualmente como nocivas ao homem, sendo a maioria da família Buthidae, e apenas uma espécie da família Scorpionidae.

O tratamento do acidente escorpiônico é feito com soro anti-escorpiônico, que são anticorpos obtidos do soro de mamíferos imunizados com doses moderadas de veneno, do respectivo escorpião que causa acidentes letais na região (THEAKSTON, 2003). Entretanto, devido a muitos problemas de choques anafiláticos causados pelos próprios soros, cogita-se a criação de vacinas sintéticas a partir de peptídeos fabricados a partir das toxinas de escorpiões (THEAKSTON apud CALDERON-ARANDA, 2003), com peptídeos de baixa massa molecular de até 20 kDa (CALDERON-ARANDA, 1995), uma vez que os sítios das toxinas nocivas ao homem são pequenos segmentos de proteína (epítomos) com poucos resíduos de aminoácidos (GAZARIAN, 2005).

A dor local é uma constante no escorpionismo (acidente por picada de escorpião). A gravidade do acidente escorpiônico varia de leve (dor no local da picada), moderada (dor intensa e complicações sistêmicas) e grave, esta última com dor, edema pulmonar e choque anafilático. Nos acidentes moderados e graves, observados principalmente em crianças, podem surgir manifestações sistêmicas como hipo ou hipertermia e sudorese profusa, digestivas (náuseas, vômitos,

sialorréia), cardiovasculares (arritmias cardíacas, hiper ou hipotensão arterial, insuficiência congestiva e choque), respiratórias (taquipnéia, dispnéia e edema pulmonar agudo) e neurológicas (agitação, sonolência, confusão mental, hipertonia e tremores) (FUNASA, 2001).

Em apenas uma espécie, *Hemiscorpius lepturus*, escorpião da família Liochelidae (infra-ordem Lurida), se encontra um veneno de alta toxicidade com mais efeitos adversos. Além das manifestações sistêmicas observadas nas espécies da família Buthidae, observa-se também efeitos citotóxicos: eritema, lesões purpúricas, edema, bolhas, úlceras e danos vasculares, incomuns em espécies de outros escorpiões. Esta espécie é encontrada no oriente médio, na região do Irã (RADMANESH, 1998).

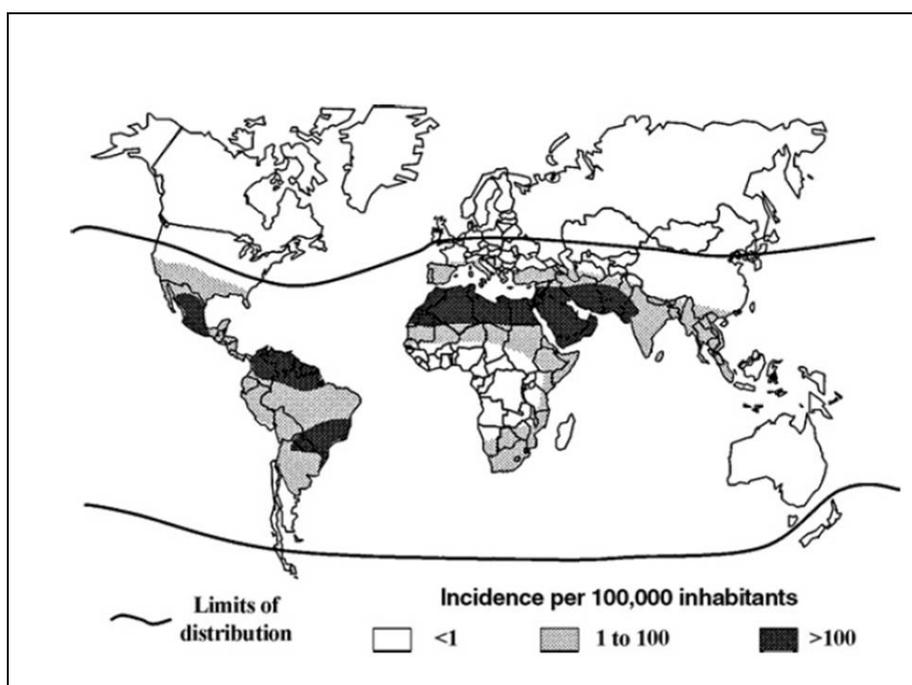
Em pacientes acometidos pelo escorpionismo, foi observado também altas doses de citocinas e cininas nos soros de pacientes após o acidente. As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 mais o TNF- $\alpha$  podem indicar, além das manifestações sistêmicas, a gravidade do envenenamento, e as cininas levam a vários quadros inflamatórios segundo a gravidade do acidente (FUKUHARA, 2002, ibidem, 2003).

### 1.2.2 Escorpionismo no mundo

Apesar do pouco número de espécies perigosas de escorpiões no mundo, há uma grande preocupação mundial. Somente no México, na década de 80 foram reportadas entre 1.000 e 2.000 mortes por escorpionismo a cada ano, porém esse número foi reduzido a algumas centenas nesse século, com um total de 143.000 picadas a cada ano. Outras áreas de risco compreendem o norte e sul da África, o Oriente Médio, Índia, as Américas, Trinidad e Tobago. O uso do antiveneno é quase unânime nessas regiões, mas em alguns locais se usam em conjunto outros medicamentos, tais como vasodilatadores e analgésicos (THEAKSTON, 2003).

Hoje se conhece mais de 30 espécies de escorpiões capazes de representar perigo ao homem, e quase um terço deles pode causar envenenamento sério ou morte. Todos, com exceção de *H. lepturus*, pertencem à família Buthidae. As espécies de maior perigo estão ao norte da África e Oriente médio, com os gêneros *Androctonus* e *Leiurus*; parte da Ásia, com o *Hemiscorpius lepturus* e *Hottentota*

*tamulus*; na América do norte e central com o gênero *Centruroides* e na América do sul com o gênero *Tityus*. Muitas das informações sobre escorpionismo não são precisas, principalmente por que em vários casos a toxicidade em adultos é menor do que em crianças e pelo próprio sistema de saúde, deficiente na obtenção de dados clínicos precisos (CHIPPAUX, 2008).



**Figura 2: Gráfico representando a incidência de escorpionismo no mundo.** As regiões em branco são áreas com pouca ou nenhuma ocorrência, as áreas em cinza são 1 a 100 ocorrências entre 100 mil habitantes, e a região escura, mais de 100 ocorrências por 100 mil habitantes (CHIPPAUX, 2008).

### 1.2.3 Escorpionismo no Brasil

O principal gênero nocivo ao homem que ocorre no Brasil é *Tityus*, e ocorre na região amazônica (*Tityus metuendus*), nordeste (*T. stigmurus*) e sudeste (*T. serrulatus* e *T. bahiensis*). A região em que mais ocorre casos de escorpionismo é a sudeste, apresentando só no Estado de Minas Gerais, 2.449 casos até o ano de 1941 com 145 mortes, e na cidade de Ribeirão Preto 985 acidentes entre 1945 e 1950. No estado de São Paulo, 1279 pacientes foram atendidos entre 1954 e 1965, e mesmo com o uso de inseticidas, houveram registros de 3.860 casos em Belo

Horizonte (1972-1987), 967 casos com 2 mortes em Ribeirão Preto (1982-1986) e 906 casos em São Paulo (1985-1986). Em todo o Brasil, mais de 7 mil casos de escorpionismo com ou sem espécies identificadas resultaram em 72 mortes, no período de 1988 a 1989. A taxa de mortalidade foi 0,95% nesse período (DORCE, 1992).

O período que se seguiu teve maiores proporções, na qual mais de 12.500 casos de escorpionismo foram registrados somente no ano de 2000, mas apenas 16 mortes foram registradas em todo o país. No período de 2000 a 2008, uma média de 27.153 casos de escorpionismo foram reportados, sendo que mais de 37.000 casos foram registrados em 2006. Os óbitos registrados nesse período chegaram a 66 casos em 2007, com uma média de 46 mortes entre os anos de 2000 a 2008. Os estados com o maiores índices de escorpionismo seguidos de óbitos foram Minas Gerais e Bahia, com 141 e 131 óbitos registrados entre 2000 e 2008. Na região Norte, 12.639 casos de escorpionismo com 27 óbitos foram registrados entre 2000 e 2008, sendo o Pará o estado com maior índice, de 8.169 casos e 20 óbitos. Somente no estado do Amazonas, como referência, nos últimos 9 anos houveram 872 casos de escorpionismo, com dois óbitos em 2005. Acredita-se, porém, que esse número seja maior, devido à maior dificuldade em transporte dos acidentados e acesso aos antivenenos antiescorpiônicos na região amazônica (SINAN/SVS/MS, 2008).

### **1.3 TOXINOLOGIA DO VENENO DE ESCORPIÃO**

No veneno de escorpiões é possível encontrar moléculas proteicas de várias massas moleculares, compreendendo mucopolissacarídeos, lipídeos, sais inorgânicos, moléculas de alta massa molecular com ou sem atividade catalítica, além de outras moléculas de baixa massa molecular, principalmente as fosfolipases e os neuropeptídeos (PLESSIS, 2007; POSSANI apud EL-ALFY, 2007).

Os neuropeptídeos de escorpiões são amplamente estudados, e como principal característica, tem a capacidade de reconhecer canais iônicos e receptores em

membranas excitáveis, induzindo severos processos neurotóxicos em muitos organismos incluindo o homem (BÜCHERL, 1977; POSSANI, 1984).

Quatro diferentes famílias de toxinas dos venenos de escorpiões que interagem especificamente com canais iônicos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , ou  $\text{Ca}^{+2}$ , têm sido até agora descritas (POSSANI et al., 1999). Os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , ou  $\text{Ca}^{+2}$  são responsáveis pela sístole e diástole do coração, pelo potencial de membrana e também apresentam um papel fundamental nas sinapses cerebrais (SOMJEN, 1979; PAGE, 2004), assim, alterações nos canais iônicos em acidentes por escorpionismo podem ser uma das principais causas de mortes, devido a complicações neurológicas e cardiovasculares que os pacientes poderiam apresentar (ISMAIL apud GUENRON, 1992).

### 1.3.1 Proteínas de alta massa molecular em venenos de escorpiões

Apesar de muitas toxinas isoladas de escorpiões serem de baixa massa molecular, há também no veneno de muitos escorpiões toxinas com atividade proteolítica. Uma das atividades mais pronunciadas de atividade proteolítica do veneno de escorpiões, talvez seja a de *Hemiscorpius lepturus*, proveniente do oriente médio. Seu veneno é capaz de induzir em humanos, necrose, ulceração e hemólise, levando o paciente até a falência renal (SHAHBAZZADEH, 2007). Este escorpião pertence ao grupo *lurida*, o mesmo grupo taxonômico de *B. amazonicus*.

A grande maioria dos escorpiões não apresenta em seus venenos efeito citotóxico sobre humanos. Porém, toxinas com atividade proteolítica já foram isoladas de venenos dos escorpiões do gênero *Tityus*, e foram capazes de induzir descargas de zimogênios pancreáticos em mamíferos (POSSANI, 1991). Zimogênios ou pró-enzimas são precursores de enzimas, que ao sofrer proteólise parcial da proteína, passam a ter atividade catalítica. Assim, ao serem produzidas no interior das células, esses zimogênios não degradam o meio intracelular, mas passam a ter ação catalítica quando excretadas (VOET, 2006). O estímulo à produção de zimogênios pelo veneno de escorpiões, pode explicar a pancreatite em pacientes vítimas de escorpionismo do gênero *Tityus*, pois nesse caso ocorre a ativação dos zimogênios intrapancreáticos (RENNER, 1983).

Ainda não se sabe qual o mecanismo que causa a atividade miotóxica do veneno de *H. lepturus*, e nem o mecanismo de ativação dos zimogênios pancreáticos pelo veneno de escorpiões do gênero *Tityus* (ALMEIDA, 2002; PIPELZADEH, 2007), mas já foram parcialmente caracterizadas toxinas de *Tityus bahiensis* e *T. serrulatus* capazes de degradar gelatina e fibrinogênio.

ALMEIDA *et al.* (2002) descobriu serinoproteases nos venenos de ambas as espécies, e MOURA *et al.* (2007) descobriu uma fração do veneno de *T. serrulatus* capaz de degradar as subunidades A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, que fora caracterizado como metaloproteases. Um escorpião amazônico, *T. metuendus* também teve seu veneno caracterizado parcialmente por ARAÚJO *et al.* (2007), detectando serinoproteases com 23 e 50 kDa.

### **1.3.2 Toxinas de baixa massa molecular: peptídeos**

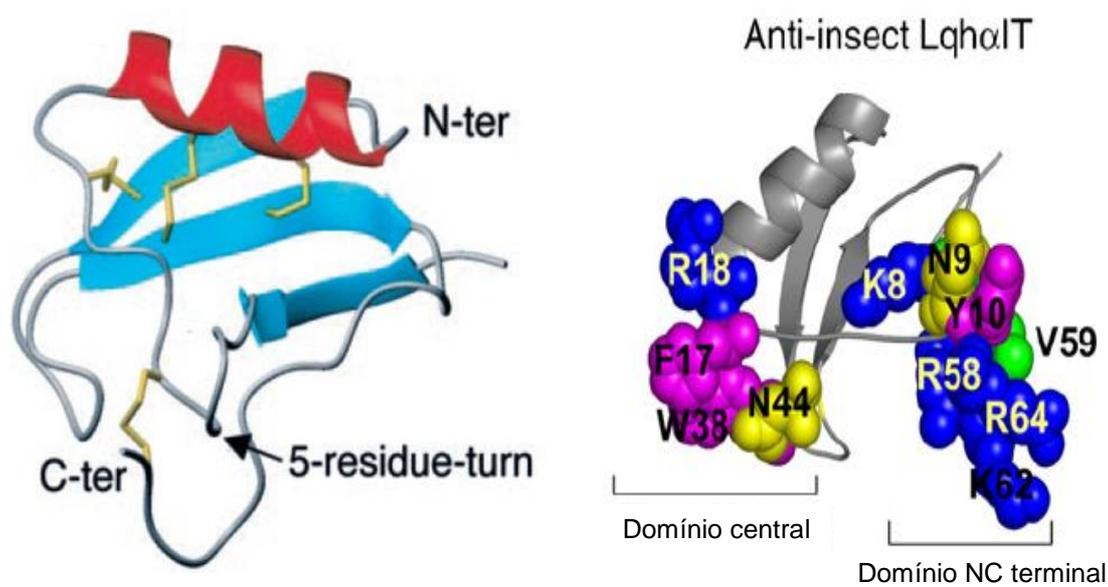
Os peptídeos dos venenos de escorpiões apresentam diferentes efeitos nos vertebrados e artrópodes, e podem ser classificados de acordo ao seu efeito neurotóxico específico: toxinas anti-mamíferos, anti-insetos e anti-crustáceos (De LIMA & MARTINEAUCLAIRE, 1995).

A especificidade de cada peptídeo se deve principalmente à composição da estrutura primária, que logo vai influenciar na estrutura secundária e terciária (LORET & HAMMOCK, 2001). Já foram isolados diversos peptídeos, e pela comparação entre as estruturas primárias e terciárias, tenta-se criar novas moléculas a partir de peptídeos pré existentes, a fim de aumentar ou diminuir a afinidade dessa toxina por determinado canal iônico, ou alterar a função dessas toxinas. Tais peptídeos quiméricos, uma vez expressos a partir de cDNA modificados, podem levar ao descobrimento de novas drogas (KARBAT, 2004).

#### **1.3.2.1 Toxinas com afinidade para canais de Na<sup>+</sup>**

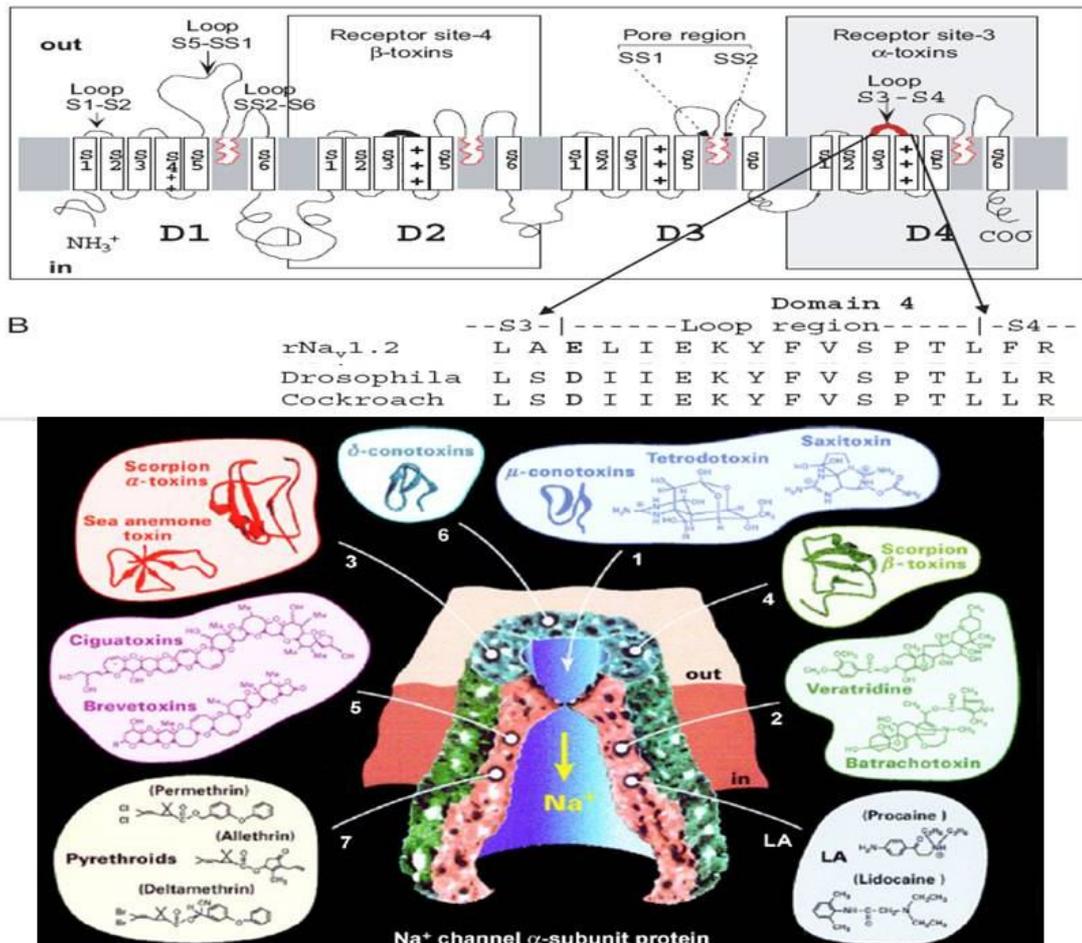
Os peptídeos conhecidos com afinidade por canais de Na<sup>+</sup> possuem massa molecular variando entre 58 – 76 resíduos de aminoácidos, com massa molecular na faixa de 6,5 – 8,5 kDa (RODRIGUEZ DE LA VEGA, 1995). Possuem 2 domínios, o

central, e o N e C terminais. No domínio central ocorrem 6 cisteínas, que formam 3 ligações dissulfeto, e mais uma quarta ligação dissulfeto que pode variar em três arranjos diferentes (MOUHAT, 2004). Em sua estrutura terciária há pelo menos uma estrutura  $\alpha$ -hélice e três estruturas  $\beta$ -folha antiparalelas.



**Figura 3: Representação da toxina Lqh $\alpha$ IT, de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, altamente tóxica para insetos e pouco tóxica a humanos.** A estrutura  $\alpha$ -hélice (vermelho) e as três  $\beta$ -folhas (ciano) aliadas às ligações dissulfeto (amarelo escuro) são importantes para a determinação de sua especificidade. (KARBAT, 2004).

Esse grupo de neuropeptídeos é o mais bem estudado, tanto que é subdividido em dois grupos: toxinas  $\alpha$  e toxinas  $\beta$  (GUREVITZ, 1998). As toxinas  $\alpha$  se ligam ao sítio 3 do canal de sódio, e podem ser específicas para mamíferos (anti-mamífero clássica), específicas para insetos (anti-inseto clássica) e específicas para mamíferos e insetos ( $\alpha$ -like) (GORDON, 2006). As toxinas  $\beta$  além de se ligarem ao sítio 4 do canal de sódio, vão apresentar peptídeos específicos para mamíferos, específicos para insetos e mamíferos, e com atividade excitatória em insetos (toxinas possuem ligações dissulfeto em outras posições, em relação a outras toxinas, e são de maior tamanho), e ação depressoras em insetos (GUREVITZ, 2007).



**Figura 4: Representação do canal de sódio.** Os 4 domínios (acima) e estrutura tridimensional, bem como as toxinas que interagem com os respectivos sítios (abaixo) estão discriminados. A região S3 e S4 com a comparação entre as seqüências primárias de humanos (rNa<sub>v</sub>1.2) e insetos é demonstrada. As regiões S3 e S4 só vão diferir em um resíduo de aminoácido entre mamíferos e insetos. (GORDON, 2007).

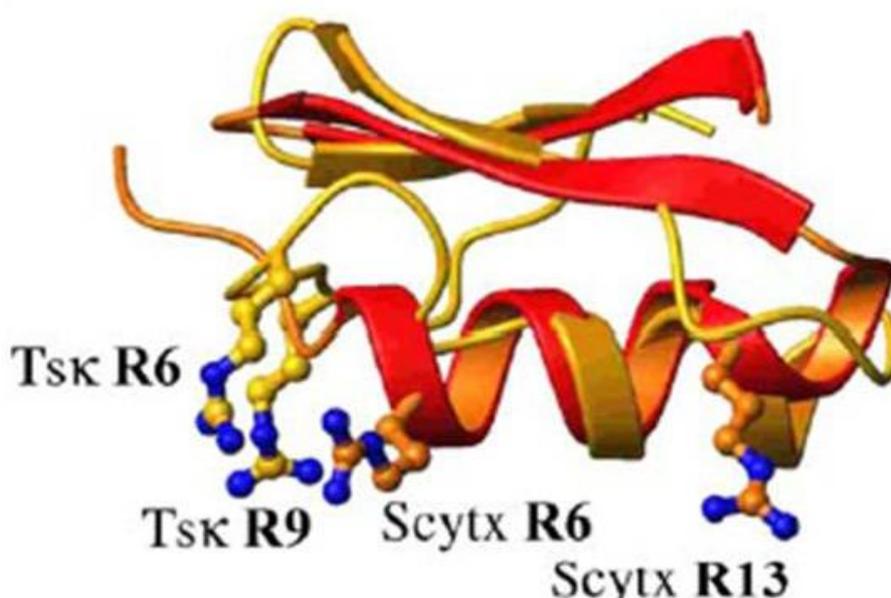
### 1.3.2.2 Toxinas com afinidade para canais de K<sup>+</sup>

Possuem 23 a 64 resíduos de aminoácidos, ligados por 3 ou 4 ligações dissulfeto. Se dividem em três famílias, as  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx e  $\gamma$ -KTx, de acordo com o alinhamento dos resíduos de cisteína e outros aminoácidos (TYTGAT, 1999). Podem se ligar também a canais de Ca<sup>2+</sup>, e apresentam pelo menos duas pontes dissulfeto que ligam uma  $\beta$ -folha a uma  $\alpha$ -hélice (RODRÍGUEZ DE LA VEGA, 2004).

Em geral, tais toxinas atuam como bloqueadores ou como modificadores de canais de potássio, impedindo fluxo de potássio (GOLDSTEIN, 1994; HARVEY, 1995; MILLER, 1995). Essa relação das toxinas com canais iônicos é uma das

interações mais fortes e específicas conhecidas em interações proteína-proteína, uma vez que há vários resíduos de aminoácidos capazes de se acoplarem entre a toxina e o canal, bem como o espaço do canal iônico que permite a passagem e acoplamento da toxina (MACKINNON, 1998). Essa especificidade tem gerado vários modelos para a bioinformática, na qual a interação entre proteínas é determinada por cálculos baseados na dinâmica Browniana (CUI, 2001; FU, 2002; YU, 2004).

Os domínios responsáveis pela interação com os canais iônicos de potássio são encontrados nas regiões da  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha ou em ambas, dependendo da família de toxinas as quais pertencem (RODRÍGUEZ DE LA VEGA, 2004).



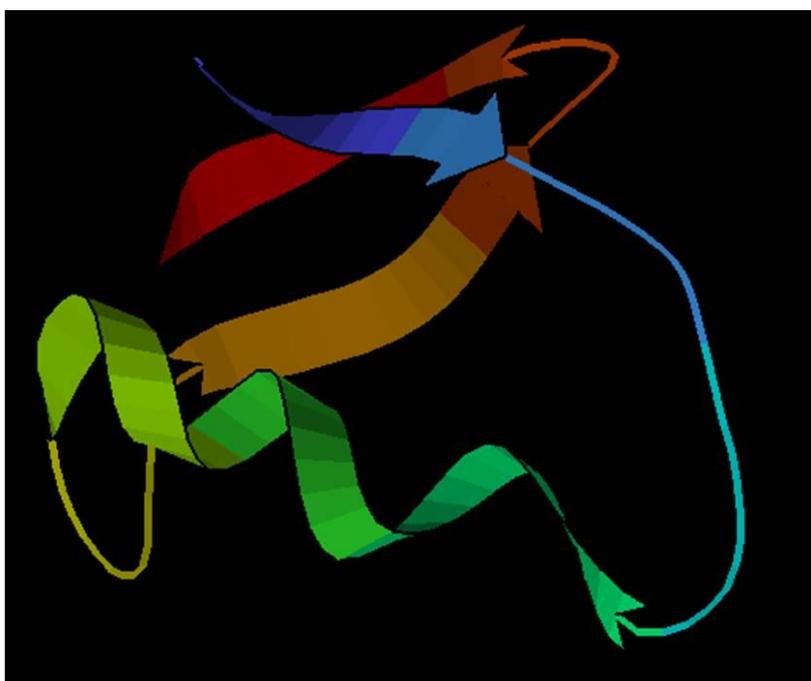
**Figura 5: Toxinas de escorpiões específicas para canais de potássio e seus domínios.** Toxina Tsk (amarelo) e “Scyallotoxin” (vermelho), e seus respectivos epítomos funcionais (RODRÍGUEZ DE LA VEGA, 2004).

### 1.3.2.3 Toxinas com afinidade para canais de Cl

Uma das primeiras toxinas isoladas de escorpião específicas para canais de cloro foi isolada de *Leiurus quinquestriatus*, um escorpião com veneno altamente tóxico para humanos. Semelhante a pequenas toxinas anti-inseto (30-35 resíduos de aminoácidos), essa toxina se liga com alta afinidade em canais iônicos de cloro, e é responsável pela paralisia da presa durante o ataque de *L. quinquestriatus* (DEBIN, 1991). Mais tarde, se descobriu que essa toxina tinha alta afinidade por canais de

cloro expressos em células de glioma, mas não em células cerebrais sadias (DESHANE, 2002).

Essa característica abriu portas para a pesquisa sobre o uso terapêutico de toxinas de escorpiões incorporadas com iodo radioativo, com toxicidade muito baixa (SHEN, 2005). A primeira toxina semelhante à clorotoxina isolada foi da espécie *Buthus martensii* Karsch, tendo aproximadamente 36 resíduos de aminoácidos e interligado por quatro pontes dissulfeto (WU, 2000).



**Figura 6: Estrutura de uma toxina específica para canais de cloro.** Modelo estrutural da “chlorotoxin”, sem as ligações dissulfeto (LIPPENS, 1995).

### 1.3.2.3 Toxinas com afinidade para canais de $Ca^{2+}$

O escorpião *Parabuthus transvaalicus*, espécie mais perigosa na África do Sul, possui em seu veneno a toxina “Kurtoxin”, capaz de se ligar a canais de cálcio e possui 63 resíduos de aminoácidos e massa molecular próxima a 8 kDa (CHUANG, 1998). Pouco se sabe sobre esse tipo de toxinas em escorpiões. Sabe-se que eles possuem alta afinidade por canais de cálcio sensíveis a rianodina (PLESSIS, 2007).

Recentemente, foi isolado de *H. lepturus*, que possui um veneno altamente letal e tóxico ao ser humano, a hemicalcina, que possui 33 resíduos aminoácidos e 3 ligações dissulfeto. Outras espécies que possuem toxinas que se ligam a canais de

cálcio sensíveis à rianodina são a IpTx I e A (*Pandinus imperator*), maurocalcina (*Scorpio maurus*), BmK-PL (*Buthus martensii* Karsh) e BJT<sub>x</sub>-1 e BJT<sub>x</sub>-2 (*Buthotus judaicus*) (SHABAZZADEH, 2007).

#### 1.4 A DOR E ANALGÉSICOS

Apesar de ser considerada como uma forma de defesa ao ambiente, um meio de evitar a auto-destruição e um primeiro sinal de doença, a dor é um problema para várias pessoas que tiveram derrame ou alguma injúria do sistema nervoso. Além de sofrerem a dor nociceptiva (estímulo direto dos receptores de dor) e a dor inflamatória (estímulo por mediadores liberados pelo próprio organismo), o indivíduo ainda sente a dor neuropática, causada por danos ou disfunções no sistema nervoso central e periférico (SCHOLZ, 2002).

A busca por drogas mais eficientes e que não causem dependência é uma constante, já que a morfina, um dos principais agentes analgésicos utilizados, pode causar além de dependência, tolerância em pacientes, fazendo-se necessário o uso de doses muito altas da morfina. Uma das estratégias é a aplicação dessa droga juntamente com adjuvantes analgésicos, para reduzir a quantidade de morfina utilizada. O excesso de morfina causa diversos efeitos colaterais, que diminuem a qualidade de vida (UEDA, 2003).

A busca pelos mecanismos de dor é uma constante na medicina, e essa busca se complementa no estudo dos sistemas fisiológicos e com pesquisas celulares e moleculares (HARGREAVES, 2001). A área de pesquisa em novos fármacos, através dos conhecimentos moleculares, está levando ao conhecimento de novos alvos contra a dor, e assim, buscando novas substâncias capazes de atuar sobre esses locais (WOOLF, 2001).

Recentemente, se descobriu que em casos de dores crônicas, os canais de sódio são os principais agentes causadores da dor neuropática e de outras dores crônicas, e o seu bloqueio por drogas que interagem com esses canais pode ser muito eficiente no tratamento da dor (PRIEST, 2007).

### 1.4.1 Neuropeptídeos de escorpiões como analgésicos

Na China, a medicina tradicional emprega o uso de escorpiões da espécie *B. martensii* Karsh para curar dores e tratar distúrbios nervosos, utilizando-o na forma desidratada (XIONG, 1998). Descobriu-se que o princípio ativo da atividade analgésica estava em seu veneno (LIU, 1989) e a primeira neurotoxina anti-epilepsia em mamíferos, com atividade depressora em insetos foi isolada desse veneno (ZHOU, 1989).

Outra toxina excitatória em insetos foi isolada, e também possui atividade analgésica em camunongos (XIONG, 1998). Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual as toxinas com afinidade para canais de sódio presentes no veneno de *B. martensii* Karsh inibiam a dor, e até setembro de 2002, haviam sido descobertas toxinas analgésicas em camundongos com propriedades excitatórias ou depressoras em insetos (BmK IT-AP, BmK AngP1 e BmKIT2), além de outra somente analgésica em camundongos (GOULDER, 2002).

Houve ainda a descoberta de um peptídeo com atividade anti-tumoral e anti-nociceptiva (AGAP), e desconfia-se que a atividade depressora em insetos dessas toxinas analgésicas em mamíferos estão correlacionadas (LIU, 2002).

## 1.5 BIOTECNOLOGIA ASSOCIADA AO VENENO DE ESCORPIÃO

Toxinas que causam efeitos excitatórios e depressores altamente específicas para insetos, tem sido purificadas dos venenos de escorpiões, e estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de novos inseticidas (ZLOTKIN, 1986; ZLOTKIN, 1993).

Outras pesquisas revelam que toxinas de escorpião podem ser utilizadas no tratamento de cânceres cerebrais, uma vez que neurotoxinas específicas para canais iônicos específicos de células nervosas cancerosas, podem ser associadas a agentes radioquímicos utilizados no tratamento de tumores. O tratamento de gliomas, que apresentam canais de cloro diferentes do de células gliais saudáveis, com certas toxinas de escorpiões, que possuem especificidade para estes canais de

cloro de gliomas, são uma realidade. Agentes radioquímicos, como o  $^{125}\text{I}$ , são incorporados a essas toxinas através da oxidação destas, e o que mais se destaca nessas pesquisas é a baixa toxicidade do tratamento (SOROCEANU, 1998).

Proteínas e peptídeos extraídos de venenos são utilizados principalmente em terapias anti-câncer, na qual ocorre interação dessas moléculas com proteínas de membrana da célula cancerosa, inibindo sua proliferação e migração. No caso do veneno de escorpiões, elas podem se dividir em dois tipos: toxinas que interagem com canais iônicos, bloqueando a passagem do respectivo íon, ou alvos específicos da membrana da célula cancerosa, como a “chlorotoxin” que se liga a metaloproteinases de gliomas, matando-os. Nem todas as toxinas de escorpiões que se ligam à células cancerosas são capazes de matar as neoplasias, mas o estudo do mecanismo de acoplamento pode sugerir novas estratégias para tratamento (GAO, 2008).

Peptídeos do veneno de escorpiões são utilizados também no estudo de aumento da resistência a vírus do HIV. Através dos estudos da “Scyllatoxin”, uma toxina de escorpião com 31 aminoácidos e 3 ligações dissulfeto que ligam uma  $\alpha$ -hélice e 2  $\beta$ -folhas, foi possível produzir o CD4M33, um peptídeo sintético que imita a proteína de membrana CD4, presente em células brancas. A CD4M33 é muito menor em relação à CD4, o que facilita sua síntese. Esse peptídeo sintético é capaz de se ligar à região gp120 do vírus HIV-1, e através de estudos por cristalografia de raio x, foi possível detectar os mecanismos de mudanças conformacionais que o vírus adota, que tornam os antivirais ineficazes (HUANG, 2005). Novas toxinas com afinidade para tratamento de distúrbios relacionados a dores estão sendo procuradas (PRIEST, 2006), e o veneno de escorpiões esconde um alto potencial para o estudo de toxinas analgésicas.

## 2 JUSTIFICATIVA

As toxinas dos venenos de escorpiões apresentam ampla diversidade químico-biológica com grande interesse da indústria farmacêutica e clínica médica. Peptídeos sintéticos ou recombinantes, com amplo uso farmacológico podem ainda ser desenvolvidos a partir das toxinas de escorpiões.

As espécies mais estudadas são dos escorpiões letais ao homem, que representam 2% de todas as espécies conhecidas. Entretanto, a busca por novos peptídeos com novas funções biológicas tem incentivado a busca por espécies não letais ao homem, com um grande retorno científico e financeiro.

Toxinas protéicas, com diversas atividades biológicas dos venenos de escorpiões brasileiros, principalmente do gênero *Tityus* procedente do Sul, Sudeste e Nordeste têm sido amplamente estudados, mas a revisão da literatura sugere que a composição molecular dos venenos de escorpiões amazônicos ainda não foi descrita. Gêneros não letais ao homem, como *Brotheas*, também não possuem estudos relevantes sobre o seu veneno.

A detecção das toxinas protéicas nos venenos de escorpiões amazônicos faz-se necessária para estabelecer metodologias para purificação, análise estrutural e conhecer os seus potenciais usos biotecnológicos destas biomoléculas, principalmente como analgésicos.

Uma das características das toxinas protéicas de escorpiões é a sua alta especificidade. Toxinas pouco tóxicas a humanos, como no caso de escorpiões não letais ao homem, podem ter uma atividade biológica específica em humanos, mas com pouco ou nenhum efeito colateral.

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Caracterizar as propriedades moleculares, atividades biológicas e potencial uso biotecnológico das toxinas de espécies de escorpiões procedentes da Região de Manaus.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as atividades biológicas, *in vivo* e *in vitro*, das toxinas do escorpião *Brotheas amazonicus* procedente da região de Manaus;
- b) Caracterizar as propriedades moleculares e imunológicas do veneno de *B. amazonicus*;
- c) Avaliar o potencial biotecnológico como analgésico, das toxinas do veneno de *B. amazonicus*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS DE LABORATÓRIO

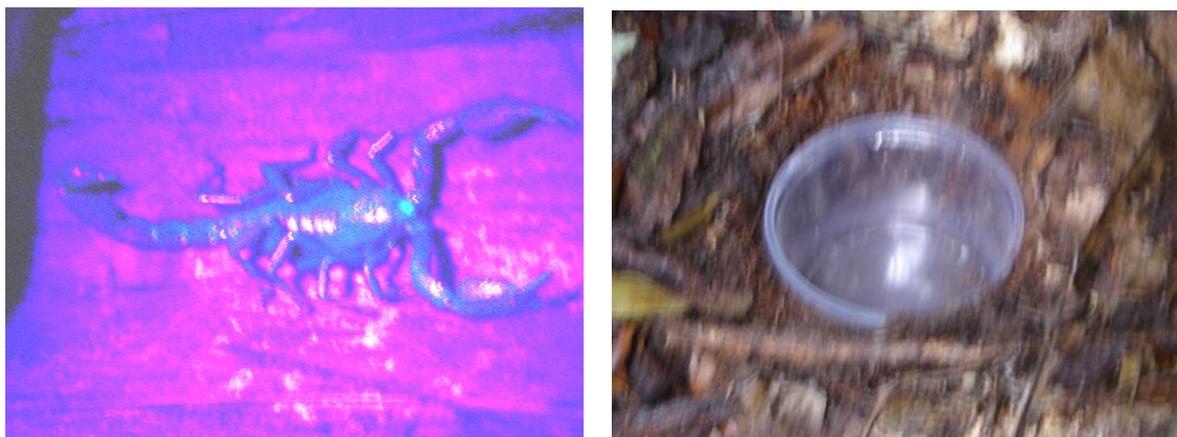
Camundongos albinos (*Mus musculus*) não isogênicos, pesando  $20\pm 2$  gramas, fornecidos pelo Biotério Experimental do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof°. Paulo Friedrich Bührnheim, foram utilizados para os experimentos *in vivo*. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com água e ração *ad libidum* e com ciclo de luz por 12 horas ao dia.

### 4.2 OBTENÇÃO DO VENENO

Os escorpiões foram coletados em áreas rurais próximas à cidade de Manaus. As capturas foram realizadas através de armadilhas do tipo “Pitfall”, e também pelo uso de luz ultra-violeta em excursões noturnas segundo metodologia descrita por LOURENÇO, 2002.

A técnica da luz ultra-violeta foi realizada à noite, em regiões de mata contínua ou em fragmentos florestais, com o uso de lanternas. A luz ultra-violeta de  $\lambda$  400 nm emite um comprimento de onda que excita as riboflavinas do exoesqueleto de escorpiões, tornando-os esverdeados e destacando-os do substrato.

O segundo método de coleta consiste em armadilhas do tipo “Pitfall”, na qual se enterram pequenos baldes secos sem tampa, sem nenhum conservante em seu interior, de modo que fiquem voltados para cima e com uma proteção contra chuvas e materiais indesejáveis que podem vir a cair na armadilha. A cada semana foi verificado o conteúdo da armadilha.



**Figura 7: Métodos de captura de escorpiões.** **A** - *Brotheas amazonicus* sobre luz ultravioleta, no período da noite. **B** – armadilha do tipo “pitfall” antes de ser colocada a proteção contra materiais indesejados.

O veneno foi obtido a partir de vários espécimes por estimulação elétrica da região do télson, e todo o veneno recolhido foi diluído em água ultra-pura a 8°C, formando um “pool” de veneno. Essa solução foi centrifugada, filtrada, congelada e liofilizada. O veneno liofilizado foi conservado a -20°C, antes de ser utilizado nos processos experimentais.

### **4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE *Brotheas amazonicus***

#### **4.3.1 Avaliação e neutralização por antivenenos da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>**

A atividade fosfolipásica do veneno foi avaliada em gel de agarose a 1%, e como fonte de fosfatidilcolina foi utilizada, gema de ovo *in natura* a 3%, em tampão salino PBS pH 8,1 e 0,04 M, com cloreto de cálcio 0,09 M e azida sódica a 200 mg/L. 30 mL da solução de agarose 1% foi colocada em uma placa de plástico e deixada para gelificar a temperatura ambiente. Após gelificação, foram realizados no gel orifícios de 3 mm de diâmetro, nos quais foram colocados 20 µL de solução com veneno (10 µg como dose desafio) em 20 µL de solução com veneno mais anti-veneno (µL).

Os anti-venenos de uso humano utilizados foram produzidos pelo Instituto Butantã. O anti-veneno trivalente liofilizado produzido pelo instituto Butantã e fornecido pelas Forças Armadas, na época estava em fase de teste em humanos.

Os anti-venenos utilizados foram o Anti-Escorpiônico, Anti-Aracnídeo, Anti-Elapídico, Anti-Ionômico e Anti-veneno Liofilizado Trivalente (anti-botrópico, anti-crotálico e anti-Laquétrico). A proporção usada para esse teste foi de 1:1( $\mu\text{L}$  de antiveneno: $\mu\text{g}$  de veneno).

#### 4.3.2 Avaliação da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio

O fibrinogênio é uma molécula de 340 kDa que possui 3 subunidades,  $\text{A}\alpha$  (66kDa),  $\text{B}\beta$  (55 kDa) e  $\text{C}\gamma$  (48 kDa), interligados por pontes dissulfeto, é o responsável pela coagulação sanguínea, e a sua baixa produção ou má clivagem podem resultar na ausência de formação do coágulo de fibrina causando hemorragia. O fibrinogênio humano e bovino são semelhantes, mas o fibrinogênio bovino tem 3 resíduos (subunidade  $\text{A}\alpha$ , região N-terminal) e 7 resíduos (subunidade  $\text{B}\beta$ , região N-terminal) a mais que o fibrinogênio humano (BROWN, 1999). Nesse experimento, avaliamos a atividade do veneno de *B. amazonicus* sobre o fibrinogênio bovino.

Na primeira fase do experimento, tubos de ensaio com 200  $\mu\text{L}$  da solução de fibrinogênio (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) em PBS pH 7,1 e 0,01M foram incubados com 50  $\mu\text{g}$  do veneno de *Brotheas amazonicus*, por 12 horas a 37°C.

Após o tempo de incubação, foi induzida coagulação do fibrinogênio bovino com o veneno de *Bothrops atrox*. No veneno de *B. atrox*, existem enzimas trombina-símile, que transformam fibrinogênio em fibrina, formando assim coágulos de fibrina. Assim, se não houver degradação de fibrinogênio pelo veneno de *Brotheas amazonicus*, haverá formação de coágulos de fibrina quando misturadas ao veneno de *B. atrox*. O controle do experimento foi feito com solução de fibrinogênio incubada por 24 horas a 37°C, e depois submetido à atividade coagulante do fibrinogênio com o veneno de *B. atrox*.

A eficiência neutralizante do soro anti-escorpiônico sobre a atividade proteolítica do veneno de *B. amazonicus* sobre o fibrinogênio bovino também foi avaliada. Doses do antiveneno foram incubadas, a 37°C por 30 minutos, com a dose desafio do veneno de *B. amazonicus*. O sistema antiveneno – veneno de *B. amazonicus* foi

aplicado a 200 µl de fibrinogênio bovino (2 µg/µl) e avaliou-se a degradação ou não do fibrinogênio bovino pela indução da formação de coágulo com o veneno de *B. atrox*.

#### **4.3.3 Degradação das subunidades do fibrinogênio**

Uma vez que se observou que o veneno de *Bothrops atrox* não foi capaz de induzir a coagulação de fibrinogênio bovino submetido previamente ao veneno de *B. amazonicus*, sugeriu-se que houve atividade do veneno de escorpião sobre o fibrinogênio bovino, sem a formação de coágulos de fibrina. A solução de fibrinogênio bovino, submetido somente à atividade do veneno de *B. amazonicus* foi comparado com a solução de fibrinogênio controle do experimento por SDS-PAGE em condições redutoras para separarem as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio bovino.

#### **4.3.4 Avaliação da atividade inflamatória**

O efeito inflamatório do veneno em patas de camundongos albinos (*Mus musculus*) não isogênicos foi observado. O veneno foi inoculado em cada animal, nos coxins das patas traseiras. Grupo de quatro camundongos foram injetados subcutaneamente na pata esquerda com 100 µg de veneno bruto e 100 µg de veneno com proteases inibidas inoculado na pata direita. O processo inflamatório foi monitorado medindo o diâmetro das patas com um paquímetro digital (Starret) durante seis horas. Assim, a porcentagem da inflamação induzida entre um tipo de veneno e o outro foi determinada.

#### **4.3.5 Avaliação da atividade Letal**

A ação do veneno em diferentes concentrações foi avaliada em camundongos pela via intra-cranial e pela via endovenosa. As concentrações do veneno de *B. amazonicus* avaliadas foram 10µg, 20 µg, 30 µg, 50 µg e 100µg pela via intra-cranial, e pela endovenosa foram 50 e 100 µg. Os camundongos foram observados durante 24 horas. Para o cálculo da dose letal 50% (DL 50) foi utilizado o método de Probitos (Finney, 1971).

#### **4.3.5.1 Avaliação das atividades do veneno sobre a hemostasia sangüínea**

Para avaliar a atividade do veneno de *Brotheas amazonicus* sobre a hemostasia sangüínea o animal foi previamente imobilizado por um sistema que deixa a sua cauda exposta, permitindo que a agulha da seringa seja inserida na veia caudal. A seringa utilizada foi BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine® calibre 0,33 mm e 100 µL de solução do veneno foi inoculada por animal. As doses avaliadas foram 50 µg e 100 µg do veneno de *B. amazonicus* e os animais foram deixados em gaiolas com água e comida *ad libitum*.

Após 30 minutos, os animais foram anestesiados com éter etílico, e seu sangue obtido do plexo braquial com o auxílio de uma pipeta e colocado em um tubo de ensaio, para avaliação da coagulação sangüínea. Também foi avaliada a presença ou não de hemorragia nas cavidades abdominal e torácica dos camundongos.

#### **4.3.5.2 Atividades do veneno inoculado no Sistema Nervoso Central**

A atividade do veneno (µg) de *B. amazonicus* inoculado na região intra-cranial de camundongos foi observada. Foram realizadas inoculações com uma seringa BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine® calibre de 0,33 mm. Com o protetor da agulha, foi feito um pequeno cilindro que permite a penetração de somente 3 mm da agulha para realizar a inoculação intra-cranial. O local da injeção correspondia à sutura cranial que liga o osso frontal ao parietal, na direção da região inter-parietal. O animal foi imobilizado com uma das mãos, e seu focinho foi inserido em um orifício de metal, de modo que imobilize seu crânio e permita a injeção intra-cranial.

Uma vez imobilizado a cabeça do animal, o veneno em solução salina fisiológica (SSF) ou somente SSF como controle foram injetadas com volume final de 20 µL por camundongo.

### **4.3.6 Avaliação da atividade analgésica**

Determinadas concentrações ( $\mu\text{g}$ ) do veneno foram inoculadas intra-cranialmente em camundongos para avaliar o efeito analgésico do veneno. Como comparação, utilizamos sulfato de morfina ( $\text{mol} = 285,34$ ) pela mesma via. O bloqueio pelo veneno dos sistemas de origem da dor de origem neurogênica, na qual há estimulação direta das terminações nervosas, e a dor de origem inflamatória, estimulada pela liberação de mediadores inflamatórios foram avaliados. Os testes consistem em dois procedimentos independentes um do outro, usando-se formalina e ácido acético.

#### **4.3.6.1 *Teste do ácido acético***

Teste que avalia somente a dor de origem inflamatória, consiste em injetar solução de ácido acético a 0,6% na região intraperitoneal, e quantificar o número das contrações abdominais do animal em 20 minutos. As contrações podem ser de extensão ou de flexão do abdômen, dos membros superiores e o número de contrações é anotada por animal (COLLIER apud MIRANDA, 2002).

#### **4.3.6.2 *Teste da formalina***

Teste capaz de avaliar a dor neurogênica e inflamatória, no mesmo animal. Consiste em aplicar a formalina (formaldeído a 2%) em uma das patas posteriores de camundongos, e com isso observar as manifestações da dor neurogênica de 1º fase, 5 minutos após aplicação da formalina, e da dor inflamatória (2º Fase, entre 15 e 30 min após aplicação da formalina). O tempo que se manifesta as dores foi utilizado como medida qualitativa de avaliação da dor. A dor neurogênica se manifesta quando os animais levantam as patas inoculadas, as lambem, as batem contra o chão repetidas vezes etc. A dor inflamatória tem as mesmas manifestações (HUNSKAAR apud MALVAR, 2004) .

#### **4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DO VENENO DE *Brotheas amazonicus*.**

##### **4.4.1 Eletroforese SDS-PAGE**

A obtenção do perfil eletroforético SDS-PAGE do veneno foi realizada segundo LAEMMLI (1970). As amostras de veneno (80 µg) foram previamente desnaturadas em tampão de amostra a 37°C por 30 min. e reduzidas ou não com beta-mercaptoetanol, e aplicadas no gel. O gel de concentração foi 4% de acrilamida e o gel de separação 12% de acrilamida. Os géis foram montados entre placas de vidro e cerâmica, com 0,75 mm de espessura.

O tempo de corrida foi de 1 hora e 30 min. a 2 horas, com corrente elétrica constante de 20 mA por gel, 200 Volts e sistema de refrigeração a 10°C. Após corrida eletroforética, o gel foi lavado com água destilada por 1 minuto, e corado com Comassie Blue R-250 0,02% ou Nitrato de Prata.

##### **4.4.2 Eletroforese gradiente SDS-PAGE**

Foi realizado com solução de acrilamida 20% com 0,1% de sacarose e misturada gradualmente com solução de acrilamida 4%, segundo López-Lozano (2002). Uma bomba peristáltica foi utilizada como formadora do gradiente do gel de separação. O gel de concentração foi 5% de acrilamida. Esta técnica de eletroforese objetiva detectar moléculas com massas moleculares com menos de 10 kDa. A concentração do veneno utilizada foi de 80 µg por poço, em condições redutoras ou não.

O tampão de corrida utilizado foi Tris 2,5 mM – Glicina 192 mM, SDS 0,1% pH 8,5 e o tempo de corrida foi de 4 horas: 1 hora e 30 minutos sob 200 Volts, 40 mili-Amperes e 100 Watts; 45 minutos a 400 Volts, 50 mili-Amperes e 100 Watts; 1 hora e 45 minutos a 550 Volts, 50 mili-Amperes e 100 Watts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com Comassie Blue R-250 0,02%.

#### 4.4.3 Zimograma da atividade proteolítica sobre fibrinogênio e gelatina

Teste usado para avaliar a atividade proteolítica do veneno. Baseia-se em copolimerização de um substrato específico (10 mg de fibrinogênio ou gelatina por gel) com a solução do gel de separação de acrilamida.

O veneno utilizado foi de 80 µg, e seguiu-se o protocolo de SDS-PAGE. Após a eletroforese, o gel foi lavado com água ultrapura por 1 min., e depois transferido para uma solução de Triton X-100 a 2,5% por 1 hora a temperatura ambiente. Após este processo, descarta-se a solução de Triton X-100, lava-se o gel com água ultrapura por 30 segundos e incubar o gel em tampão Glicina 0,1 M pH 8,3 ou tampão colagenase (Tris 50mM pH7,5) a 37°C por 24 horas. Após a incubação, o gel foi corado com Comassie Blue R-250 0,02%. As bandas transparentes indicam onde houve degradação proteolítica do substrato.

#### 4.4.4 Eletroforese SDS-PAGE Tris-tricina

O método de eletroforese utilizado foi adaptado de SCHÄGGER (2006), e foi utilizado para detectar principalmente, as proteínas de massas moleculares até 1 kDa.

O gel de tris-tricina se compõe basicamente de três tipos de géis: o separador, espaçador e concentrador. O gel espaçador fica entre o gel concentrador (região do cátodo) e o gel separador (região do ânodo). A trama de polímeros existentes em cada tipo de gel vai ficando menor a medida que avança a corrida eletroforética para a região do ânodo.

A quantidade do veneno de *B. amazonicus* foi de 10 µg, e 5 µg do veneno de *B. atrox* como marcador molecular. O preparo das amostras seguiu conforme o protocolo de SDS-PAGE. A incubação das amostras nos tampões redutores e não-redutores foi de 30 minutos a 37°C. A eletroforese iniciou-se a 20 mA e 40 V.

Quando a amostra penetrar no gel espaçador, a corrente elétrica foi aumentada para 50 mA e 100V, e após 1 hora para 200 V, até o final da corrida. A temperatura

utilizada para eletroforese foi de 10°C. O gel foi lavado por 1 minuto com água destilada, e seguiu para a coloração com prata ou detecção da reação antígeno – anticorpo por “Western Blotting”.

#### **4.4.5 Eletroforese Bi-dimensional**

Semelhante ao processo de SDS-PAGE, com a diferença que antes de ocorrer a separação pelas massas moleculares das toxinas do veneno, há também a separação delas pelos pontos isoelétricos (pI). O gel de separação foi SDS-PAGE por gradiente, porém o gel de concentração foi substituído por azul de bromofenol 0,002% em agarose a 1%.

A amostra devidamente preparada em tampão amostra foi colocada em uma bandeja específica para a reidratação do “strip Immobilized pH Gel” (IPG pH strip) na qual ocorreu a inclusão da amostra no gel. Para este experimento, foram utilizados “strips” de 13 centímetros com gradientes não-lineares (NL) nas faixas pH 3,0 – 11,0, pH 4,0 – 7,0 e pH 7,0 – 10,0.

O veneno liofilizado foi solubilizado em solução de reidratação, previamente preparada. A solução de reidratação foi uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, IPG Buffer 2%. O 2-ditiotreitól (DTT) foi adicionado na solução momentos antes de aplicar a solução de reidratação no gel, na proporção de 7 mg para 2,5mL.

Para “strips” na faixa de pH 3,0 – pH 11,0 NL, foram utilizados 287,5 µL de solução de reidratação e 500 µg do veneno, e para “strips” na faixa de pH 4,0 – 7,0 NL ou pH 7,0 – 10,0 NL foram utilizados 750 µg do veneno na mesma quantidade da solução de reidratação. O processo de reidratação foi de 12 horas, com os “strips” cobertos por óleo mineral.

##### **4.4.5.1 Primeira dimensão: Focalização isoelétrica**

Os “strips” hidratados com as amostras foram colocadas em um sistema de focalização isoelétrica ETTAN IPG-PHOR III da GE Healthcare, que possui um programa integrado que permite acompanhar o processo de focalização isoelétrica

das proteínas. Esse processo foi realizado segundo o protocolo oferecido pelo sistema (vide apêndice). Os “strips”, após a focalização, foram equilibrados com tampão de equilíbrio com DTT a 1% por 30 minutos (redução), e logo após com tampão de equilíbrio com iodoacetamida a 2,5% por 30 minutos (Alquilação).

#### **4.4.5.2 Eletroforese gradiente SDS-PAGE**

O “strip” foi colocado sobre o gel SDS-PAGE gradiente 5 – 20 % previamente preparado, e uma vez posicionado, colocou-se a solução com azul de bromofenol 0,002% em agarose a 1% (Gel selador), aquecida a 45 °C. A corrida eletroforética foi realizada a 10°C, e foi interrompida quando o azul de bromofenol atingiu a base do gel. As condições de corrida foram conforme o item 4.5.2.

### **4.5 COLORAÇÕES PARA OS GÉIS DE POLIACRILAMIDA**

#### **4.5.1 Coloração por “coomassie blue”**

Após lavagem do gel, este foi imerso em solução contendo “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,025%, Metanol a 45% e Ácido Acético a 9%. O gel permanece nessa solução por 30 min ou “overnight” (12 horas ou mais).

A solução descorante foi composta por Metanol a 45% e Ácido Acético a 9%. Após retirar o gel da solução corante, deve-se colocá-lo em solução descorante, até que apareçam as bandas.

#### **4.5.2 Nitrato de Prata**

Uma vez que a amostra esteja em baixa concentração, ou as bandas eletroforéticas estejam pouco definidas ou não foram detectadas por “coomassie blue” 0,025%, utiliza-se a coloração por nitrato de prata. O gel é lavado por 5 min em água, e submetido a solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,1%) permanecendo “overnight”.

Logo, lavar o gel com etanol a 50% por 3 vezes, 20 minutos cada. Aplica-se solução de tiosulfato de sódio (0,06g/300 mL) por 1 hora. Após este processo, lavar o gel uma vez em H<sub>2</sub>O ultra-pura por 10 segundos, e depois, coloca-se a solução de Nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub> a 0,2%, formaldeído a 0,075%) por 30 minutos. Após este processo, o gel é lavado em H<sub>2</sub>O ultra-pura por 30 segundos e submetido à solução reveladora (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 6%, formaldeído a 0,05% e tiosulfato de sódio a 0,008%) até que apareçam as bandas ou spots. A reação é interrompida colocando-se o gel em solução de ácido acético a 5%.

## **4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES IMUNOQUÍMICAS**

### **4.6.1 Análise por “Western Blotting”**

Teste que foi utilizado para analisar as toxinas (antígenos) dos venenos que interagem com os anti-venenos (anticorpos). O antiveneno antiescorpiônico e o antiveneno anti-aracnídeo utilizados foram de origem eqüina, e são eficientes contra o veneno de escorpiões do gênero *Tityus*, ambos produzidos pelo Instituto Butantã.

Após eletroforese Tris-Tricina SDS-PAGE segundo o item 4.5.4, com 40 µg, 80 µg e 160 µg do veneno de *B. amazonicus*, as proteínas foram transferidas sob corrente constante para membrana de nitrocelulose, de acordo com a técnica descrita por TOWBIN *et al.* (1979). O gel foi colocado na seqüência: suporte de plástico perfurado, folha de espuma, 2 folhas de papel filtro cortadas no tamanho do suporte, o gel Tris-Tricina, a membrana de nitrocelulose, 2 folhas de papel filtro cortadas no tamanho do suporte, folha de espuma e suporte perfurado.

A transferência em “Western Blot” foi realizada com 260 mA, 100W e 550 V, por 3 horas em tampão de transferência Tris – Glicina – metanol. Após a transferência da região do ânodo para o cátodo (membrana de nitrocelulose), retirou-se a membrana de nitrocelulose e foi corada com “Ponceau S”, para avaliar a eficiência da transferência das proteínas, e a membrana foi lavada com água destilada até sair o “Ponceau – S”.

Logo, colocou-se solução bloqueadora Tris – Salina – Tween 20 (TBS-T) com leite desnatado em pó “Molico<sup>®</sup>” a 5% por 2 horas a temperatura ambiente e agitação constante. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T por 15 minutos cada, a seguir, as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente, com antiveneno anti-escorpiônico ou antiveneno anti-aracnídeo em Tris – Salina (TBS), na proporção de 1 : 1000.

Após a reação do anti-veneno com o veneno, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T por 5 minutos cada, e foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação constante em solução de TBS mais conjugado anti-IgG de cavalo e peroxidase (Sigma Co. <sup>®</sup>, USA) na diluição de 1 : 2000.

Após a reação do conjugado com o anticorpo, as membranas passaram por 3 lavagens com TBS-T por 5 minutos cada, e 2 lavagens com TBS por 5 minutos cada. A solução de TBS com 8,3% de 4-cloro 1 $\alpha$ -naftol (substrato cromógeno), 0,14% de peróxido de hidrogênio e 0,57% de metanol foi aplicada sobre as membranas sob agitação constante protegidas da luz do meio ambiente, permitindo que as bandas de proteínas que se ligaram ao anticorpo fossem reveladas.

O gel de Tris-Tricina feito anteriormente foi corado com Nitrato de Prata, e foi comparado com as bandas que apareceram na membrana de nitrocelulose após “Western-Blot”.

#### **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram analisados seguindo-se testes estatísticos (T student, ANOVA etc) usando-se o programa de computador “Biostat 3.0<sup>®</sup>” ( $R \leq 0,05$ ).

#### **4.8 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA**

A concentração protéica do veneno foi determinada pelo método de Bradford.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DE *Brotheas amazonicus*

#### 5.1.1 Detecção da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>

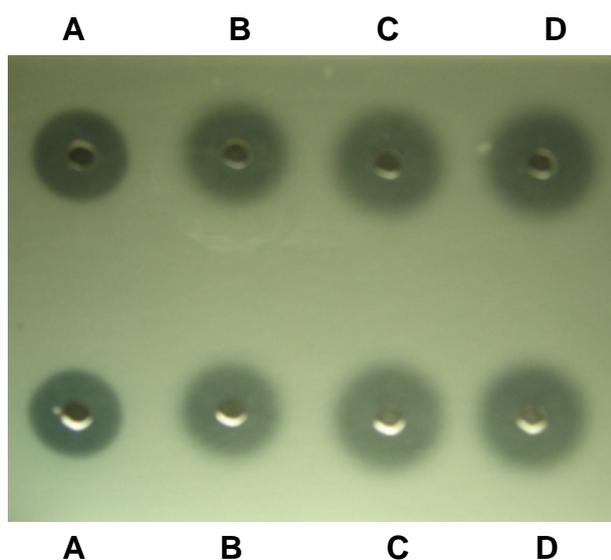
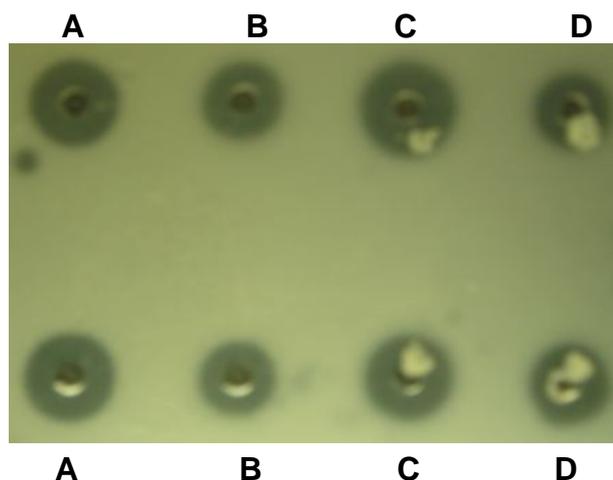


Figura 8: Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> do veneno de *Brotheas amazonicus*. A - *B. amazonicus* (30 µg); B - *Bothrops atrox* (10 µg); C - *B. amazonicus* (60 µg); D - *B. amazonicus* (90 µg).

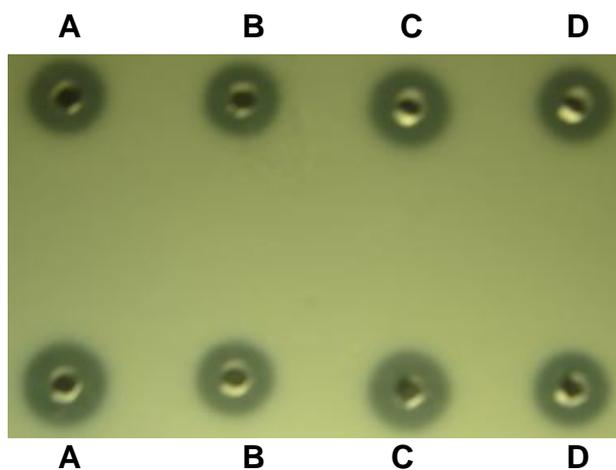
Tabela 1: Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> do veneno de *Brotheas amazonicus*.

	10 µg	30 µg	60 µg	90 µg
halos ( $\bar{x}$ ,mm)	11,71±0,44	12,42±0,42	13,75±0,06	13,95±0,09

Segundo a figura 8 e tabela 1, o veneno de *B. amazonicus* apresenta atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> segundo o método utilizado, e não observou-se correlação positiva significativa entre a concentração do veneno de escorpião utilizada e o tamanho do halo (mm) da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>.



**Figura 9: Avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos sobre a atividade fosfolipásica  $A_2$  do veneno de *B. amazonicus*. A – *B. atrox* (10  $\mu$ g); B – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g); C – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g) X Soro Anti-Aracnídico (10  $\mu$ l); D – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g) X Soro Anti-Escorpiônico (10  $\mu$ l).**



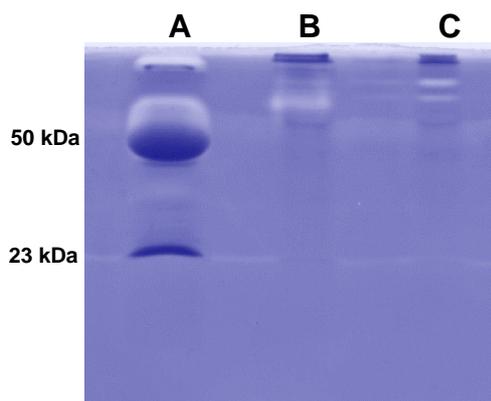
**Figura 10: Avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos sobre a atividade fosfolipásica  $A_2$  do veneno de *B. amazonicus*. A – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g); B – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g) X Soro Anti-Elapídico (10  $\mu$ l); C – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g) X Soro Anti-Lonômico (10  $\mu$ l); D – *B. amazonicus* (10  $\mu$ g) X Soro trivalente (10  $\mu$ g). Veneno : antiveneno = 1 : 1**

**Tabela 2: Avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos sobre a atividade fosfolipásica do veneno de *B. amazonicus*.**

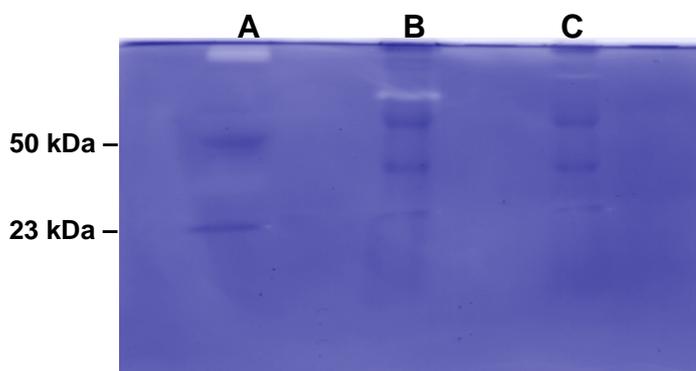
<i>Brotheas amazonicus</i> (10 $\mu$ g)	Veneno/Antiveneno (1:1)					
	Anti Aracnídico	Anti Escorpiônico	Anti Elapídico	Anti Lonômico	Soro Trivalente	
<b>Halos (<math>\bar{X}</math>,mm)</b>	11,8 $\pm$ 0,46	13,1 $\pm$ 0,87	11,82 $\pm$ 0,23	11,52 $\pm$ 0,30	12,25 $\pm$ 0,03	11,86 $\pm$ 0,18

Segundo as figuras 9 e 10, e a tabela 2, os antivenenos testados não apresentaram na proporção 1:1 eficiência neutralizante da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> do veneno de *B. amazonicus*.

### 5.1.2 Zimograma da atividade proteolítica sobre gelatina e fibrinogênio do veneno de *B. amazonicus*



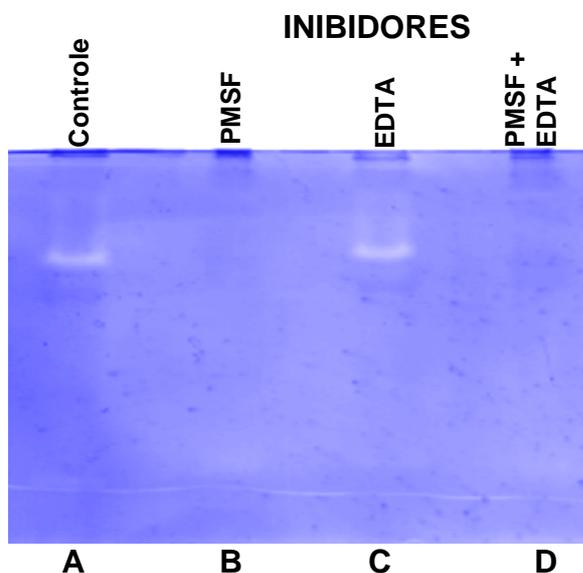
**Figura 11: Zimograma da atividade proteolítica sobre gelatina.** A – *Bothrops atrox* (30 µg); B – *B. amazonicus* (80 µg) em PBS pH7,1 (0,01M); C – *B. amazonicus* (80 µg) em H<sub>2</sub>O. O halo branco sobre o fundo azul sugere atividade proteolítica sobre a gelatina.



**Figura 12: Zimograma da atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino.** A – *Bothrops atrox* (30 µg); controle; B – *B. amazonicus* (80 µg) em PBS pH7,1 (0,01M); C – *B. amazonicus* (80 µg) em H<sub>2</sub>O. O halo branco sobre o fundo azul sugere atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino.

Os zimogramas da atividade proteolítica sobre gelatina e fibrinogênio bovino (figuras 11 e 12) sugerem a presença de proteases no veneno de *B. amazonicus* com massas moleculares de 70 a 80 kDa.

### 5.1.2.1 Zimograma da inibição da atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino



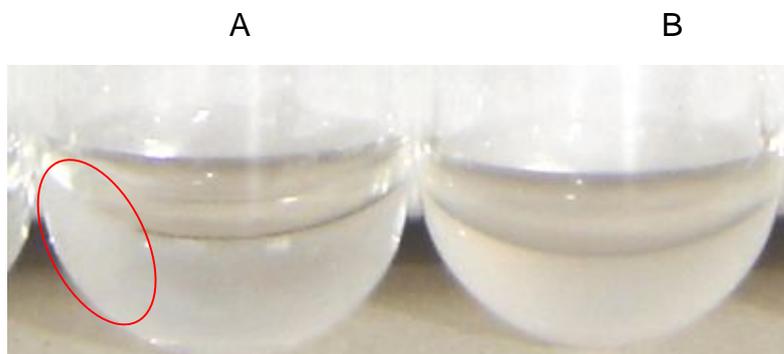
**Figura 13:** Zimograma de avaliação da inibição de atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino do veneno de *Brotheas amazonicus*.

**A** – *B. amazonicus* (80µg); **B** – *B. amazonicus* (80 µg)+ PMSF (20 mMol); **C** – *B. amazonicus* (80 µg) + EDTA (20 mMol); **D** – *B. amazonicus* (80 µg) + PMSF (20 mMol) + EDTA (20 mMol). O halo branco sobre o fundo azul sugere atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino

Segundo a figura 13, a atividade proteolítica do veneno de *B. amazonicus* sobre o fibrinogênio bovino foi inibida só por PMSF – Inibidor específico para serinoproteases.

Assim, nossos resultados sugerem que serinoproteases, com massas moleculares na faixa de 70 – 80 kDa, se encontram principalmente na forma de pró-enzimas, e sejam as responsáveis *in vitro* pela atividade proteolítica do veneno sobre o fibrinogênio bovino.

### 5.1.2.2 Avaliação da degradação proteolítica do fibrinogênio bovino pelo veneno de *B. amazonicus*



**Figura 14:** Tubos de ensaio contendo solução de fibrinogênio bovino incubados previamente com o veneno de *Brotheas amazonicus*, e em seguida aplicado 2 µg do veneno de *Bothrops atrox*. **A** - Solução de fibrinogênio bovino somente com veneno de *B. atrox*. Observa-se o coágulo de fibrina na parte inferior a esquerda do tubo, dentro do círculo vermelho; **B** – Solução de fibrinogênio bovino previamente incubado a 37°C por 6 horas com o veneno de *B. amazonicus* (100µg), e em seguida aplicado o veneno de *B. atrox*. Observa-se que, mesmo a solução ficando turva, não houve a formação do coágulo de fibrina.

Segundo a figura 14, o veneno de *B. amazonicus* degrada o fibrinogênio bovino, que foi confirmado pela ausência de formação do coágulo de fibrina quando o veneno de *B. atrox* foi adicionado ao sistema (figura 14-B).

No fibrinogênio bovino incubado sem o veneno de *B. amazonicus*, o veneno de *B. atrox* formou coágulos de fibrina (figura 14-A). Esses resultados sugeriram que o veneno de *B. amazonicus* degrada o fibrinogênio bovino por um mecanismo molecular diferente à serino protease (trombina-like) do veneno botrópico.

### 5.1.2.3 Imuno-neutralização pelo soro anti-escorpiônico da atividade proteolítica do veneno de *B. amazonicus* sobre o fibrinogênio bovino

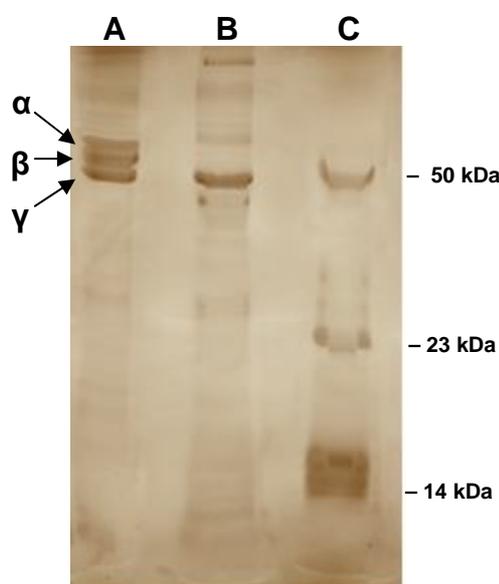
**Tabela 3:** Neutralização pelo soro anti-escorpiônico da atividade proteolítica do veneno de *B. amazonicus* sobre o fibrinogênio bovino.

	Controle	I	II	III	IV	V
Veneno (µg):anti-veneno (µl)	1:0	1:0,25	1:0,5	1:1	1:2	1:4
Formação induzida de coágulo	-	-	-	+	+	+

A indução da formação do coágulo de fibrina foi com 2 µg do veneno de *B. atrox*, e a dose desafio de *B. amazonicus* foi de 10 µg.

Segundo a tabela 3, o soro antiescorpiônico produzido contra o veneno do gênero *Tityus* sp., apresenta eficiência neutralizante da atividade proteolítica do veneno de *B. amazonicus* a partir da proporção 1:1, sugerindo que as toxinas de *B. amazonicus* apresentam propriedades antigênicas similares às serinoproteases do veneno de escorpiões do gênero *Tityus*.

#### 5.1.2.4 Perfil eletroforético da degradação proteolítica do fibrinogênio bovino pelo veneno de *B. amazonicus*



**Figura 15: Perfil molecular SDS-PAGE da degradação proteolítica do fibrinogênio bovino pelo veneno de *B. amazonicus*.** O gel SDS-PAGE 12,5% foi corado com nitrato de prata. As bandas eletroforéticas que correspondem às subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio reduzido, e as bandas de 50 kDa, 23 kDa e 14 kDa de *B. atrox* estão discriminadas como marcadores moleculares. **A** – Fibrinogênio bovino reduzido (50  $\mu$ g); **B** – Veneno de *Brotheas amazonicus* reduzido (16  $\mu$ g); **C** – Veneno de *Bothrops atrox* reduzido (30  $\mu$ g).

Na figura 15 observa-se, pela eletroforese SDS-PAGE, que a serino protease do veneno de *B. amazonicus* realiza atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino degradando as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  dessa molécula.

### 5.1.3 Avaliação da atividade letal e do efeito de hemostasia sangüínea do veneno de *B. amazonicus*

As concentrações do veneno de *B. amazonicus* usadas na avaliação da atividade letal e o efeito sobre a hemostasia sangüínea não apresentaram efeito tóxico com respeito a essas atividades avaliadas. Não foram observados efeitos sistêmicos nas 48 horas após inoculação do veneno pela via endovenosa. A inoculação intra-cranial também não apresentou atividade letal, mesmo aplicando-se concentrações de 100 µg do veneno de *B. amazonicus*. O sangue dos camundongos preservou a sua capacidade de coagulação quando foi submetido às doses testadas e visualmente não foi observada atividade hemorrágica nas cavidades torácica e abdominal. Tais resultados sugerem que *B. amazonicus* possui um veneno com baixa toxicidade em mamíferos, mesmo aplicado por vias diferentes.

### 5.1.4 Avaliação da atividade inflamatória

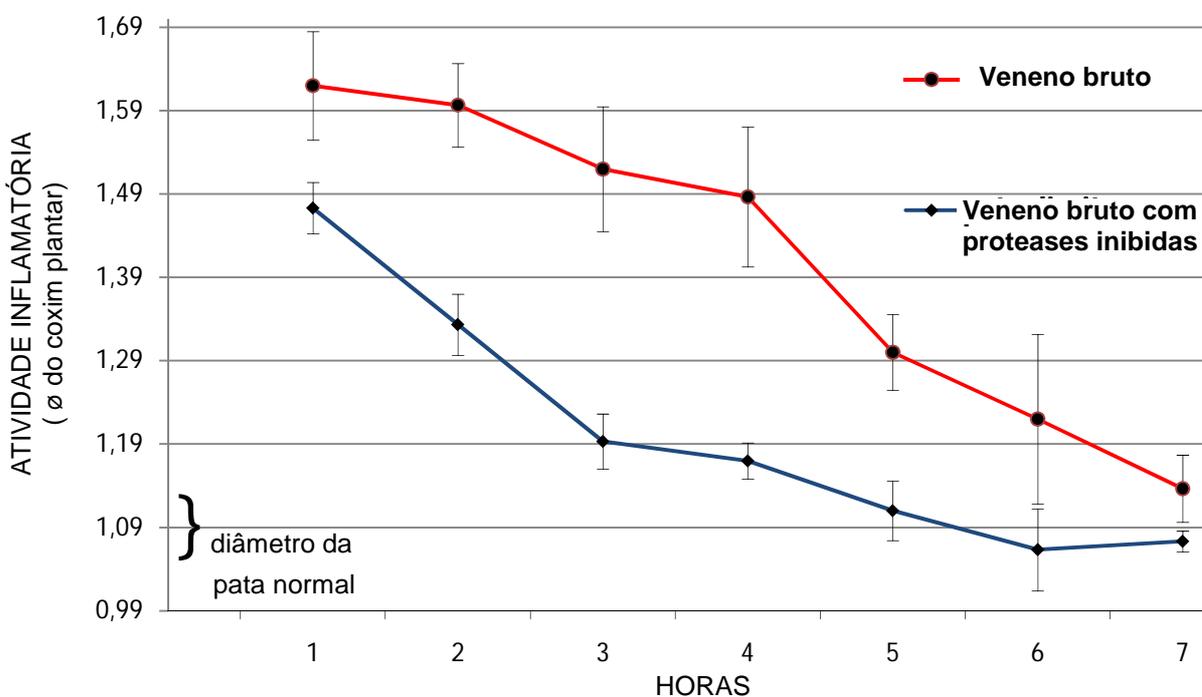


Gráfico 1: Atividade inflamatória do veneno bruto (Vermelho) e veneno bruto com proteases inibidas (Azul) de *Brotheas amazonicus*, nos coxins das patas esquerdas (Vermelho) e direitas (Azul) de camundongos após injeção, em um intervalo de 6 horas.

Segundo o gráfico 1, o veneno de *B. amazonicus* apresentou atividade de indução da inflamação, provavelmente pela presença de serino-protease associada ou não a outras moléculas pró-inflamatórias.

### 5.1.5 Avaliação por injeção intracranial do efeito analgésico do veneno e da morfina

**Tabela 4: Efeito analgésico do veneno de *B. amazonicus* avaliado pela quantificação das contorções abdominais em camundongos induzidos por ácido acético glacial 0,6%.**

Controle (SSF)	30 µg	Veneno 50 µg	100 µg	Morfina 0,52 mM
47,5±0,5	20	17,5±1,5	-	-
-	57,89	63,19	100	100

Os camundongos foram submetidos a injeção intra-cranial, com 20 µL por animal na respectiva dose discriminada. O controle foi inoculado com Solução Salina Fisiológica (SSF). Após 5 minutos da injeção intra-cranial, os animais dos grupos experimentais foram inoculados na região intra-peritoneal com 10 mL/kg da solução de ácido acético 0,6% em solução salina fisiológica.

Segundo a tabela 4, o veneno de *B. amazonicus* apresentou potente efeito analgésico, bloqueando 100% da indução de dor a nível de sistema nervoso central (SNC) com 100 µg do veneno.

**Tabela 5: Efeito analgésico do veneno de *B. amazonicus* avaliado pela quantificação do tempo de duração da dor nas patas de camundongos induzidos por formalina 2%.**

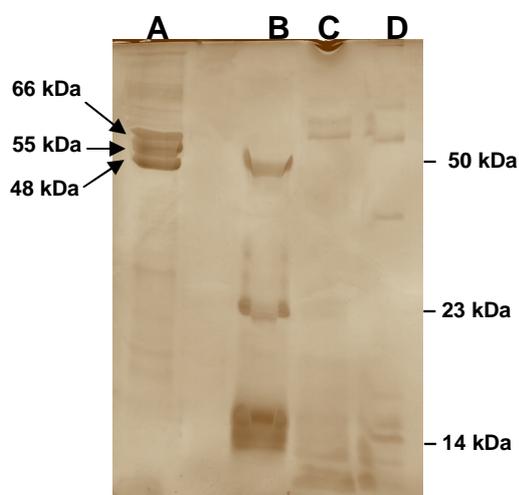
FORMALINA	Dor neurogênica (Tempo de duração, em segundos)	% de inibição	Dor inflamatória (Tempo de duração, em segundos)	% de inibição
Controle	179,5±4,5	-	257±8	-
30 µg	182	-	0	100
50 µg	125±8,5	30,46	0	100
100 µg	124,5±0,5	30,64	0	100
Morfina 0,7 µM	0	100	0	100

A injeção de 40 µL da formalina a 2% foi feita em uma das patas traseiras. O teste de formalina foi realizado logo após os 5 minutos da injeção intra-cranial do veneno de *Brotheas amazonicus* ou de morfina, na concentração discriminada acima.

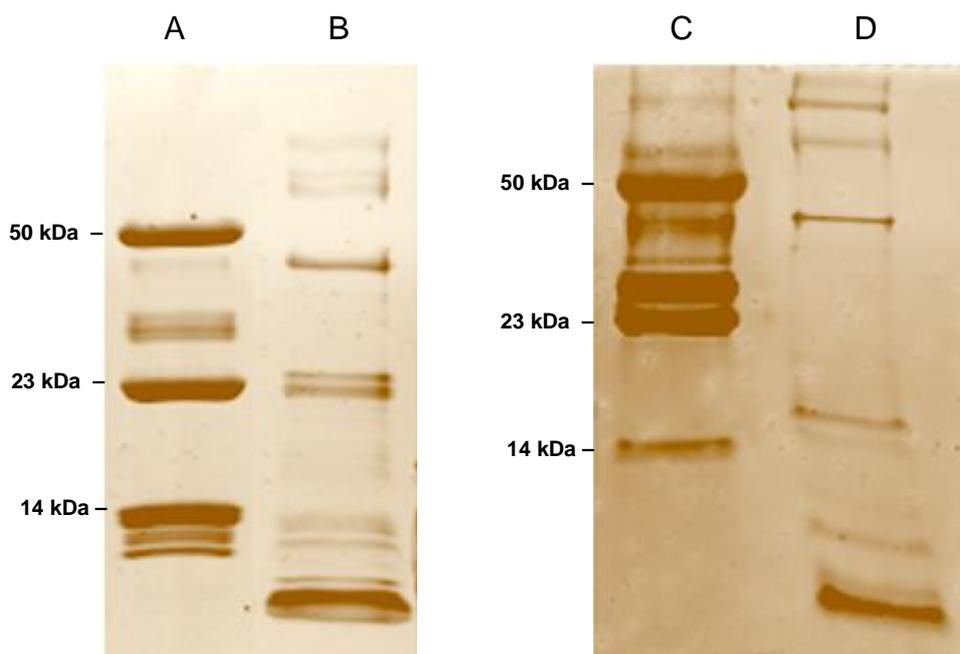
Segundo a tabela 5, o veneno de *B. amazonicus* apresenta constituintes com potente atividade analgésica, uma vez que atuam no SNC principalmente bloqueando a indução de dor de origem inflamatória.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS TOXINAS DO VENENO DE *Brotheas amazonicus*

### 5.2.1 Perfil molecular por eletroforese unidimensional SDS-PAGE



**Figura 16: Eletroforese SDS-PAGE a 12,5%, corado com prata. A – Fibrinogênio (50 µg) reduzido; B – *Bothrops atrox* (30 µg) reduzido; C – *Brotheas amazonicus* (16 µg) não reduzido; D – *B. amazonicus* (16 µg) reduzido.**



**Figura 17: Eletroforese tris-tricina do veneno de *B. amazonicus*, corado com nitrato de prata. A – *Bothrops atrox* (2  $\mu$ g) reduzido; B – *Brotheas amazonicus* (10  $\mu$ g) reduzido; C – *Bothrops atrox* (5  $\mu$ g) não reduzido; D - *Brotheas amazonicus* (10  $\mu$ g) não reduzido.**

A eletroforese unidimensional, segundo as figuras 16 e 17, sugere que os principais constituintes do veneno de *B. amazonicus* apresentam massas moleculares > 50 kDa, e massas moleculares próximas a 7, 14, 23 e 40 kDa.

### 5.2.2 Perfil molecular por eletroforese bidimensional

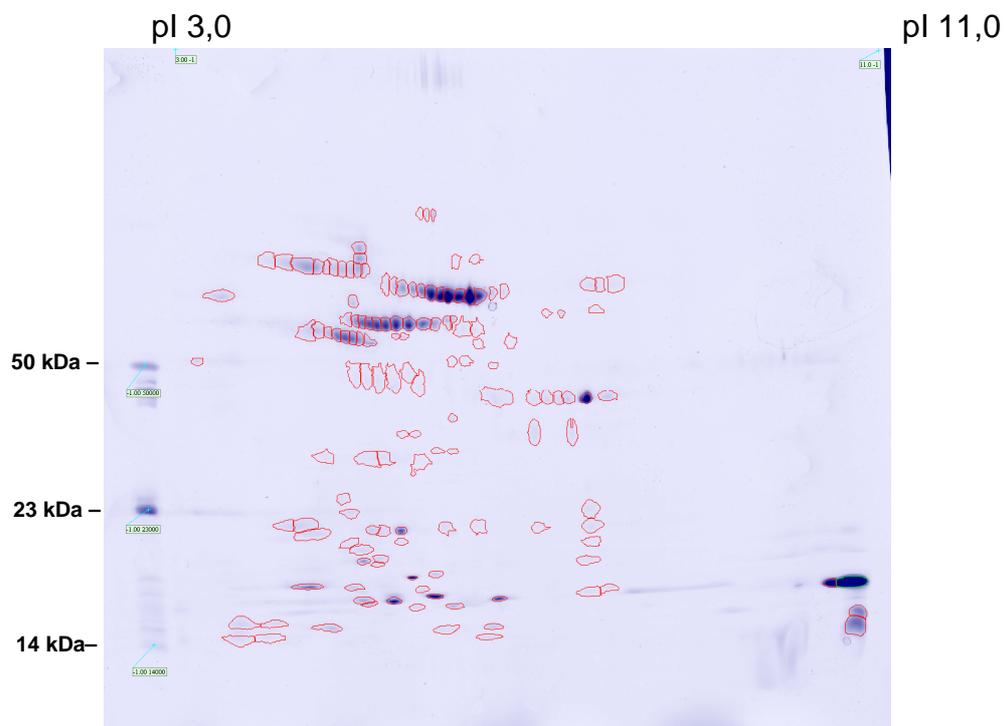
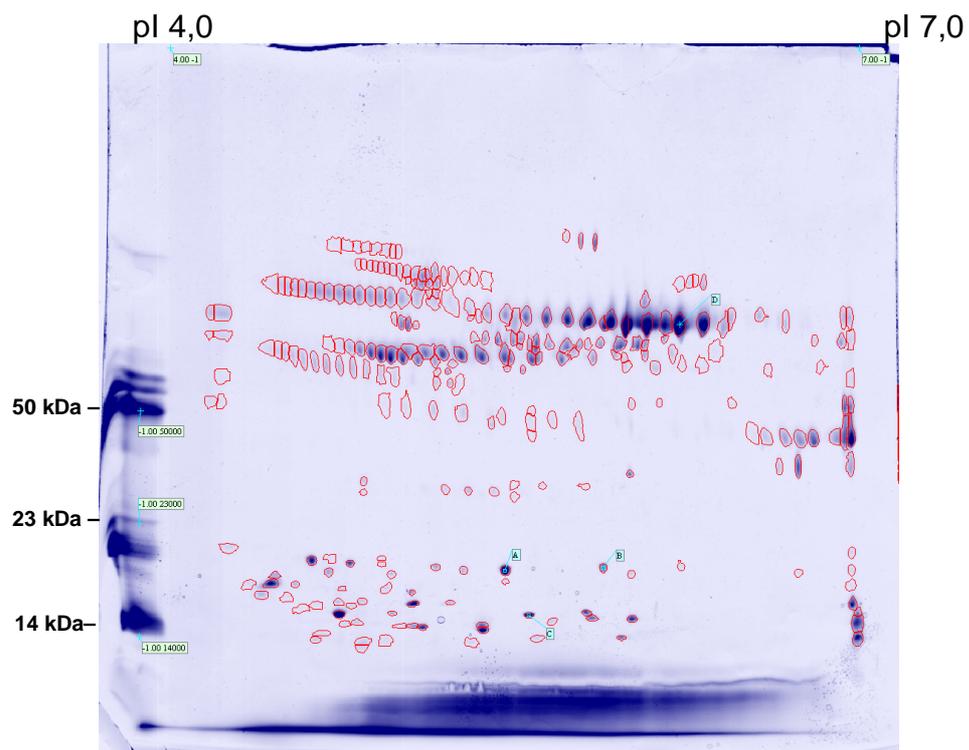
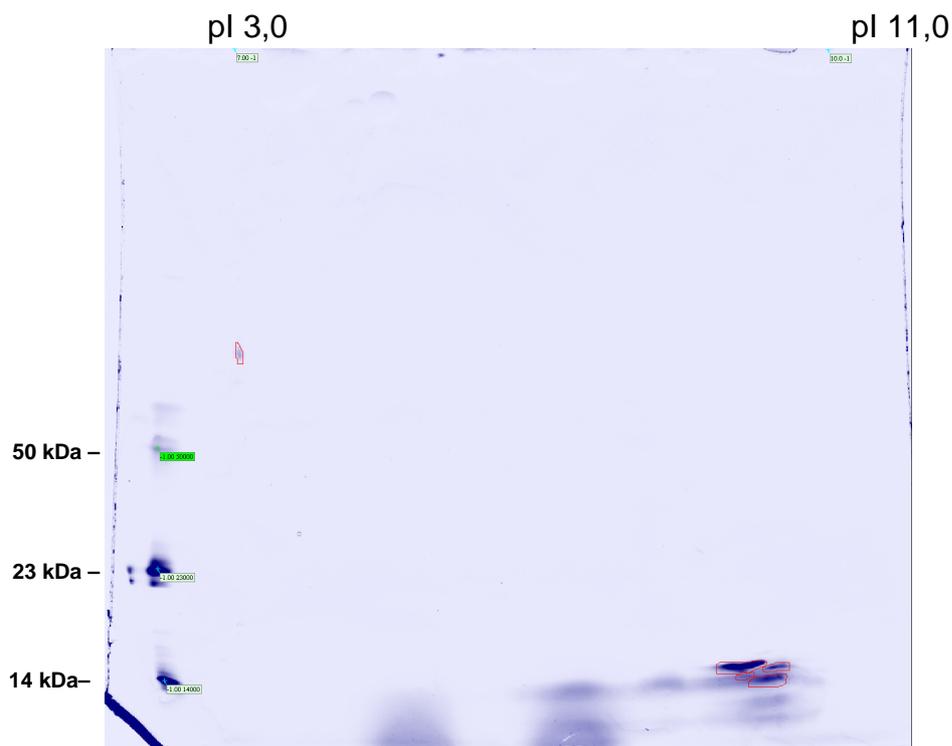


Figura 18: Eletroforese bidimensional do veneno de *Brotheas amazonicus* (500 µg), pH 3,0 – 11,0 NL gel gradiente SDS-PAGE 4 % a 20% de acrilamida, “strips” 13 cm. O gel foi corado com “coomassie blue” R-250, analisado em “software” “Image Master Platinum 6.0<sup>®</sup>”. Um total de 139 “spots” foram detectados.



**Figura 19:** Eletroforese bidimensional do veneno de *Brotheas amazonicus* (750 µg), pH 4,0 – 7,0 NL gel gradiente SDS-PAGE 4% a 20% de acrilamida, e “strips” de 13 cm. Gel corado com “coomassie blue” R-250, analisado em “software” “Image Master Platinum 6.0<sup>®</sup>”. Um total de 279 spots foram detectados.

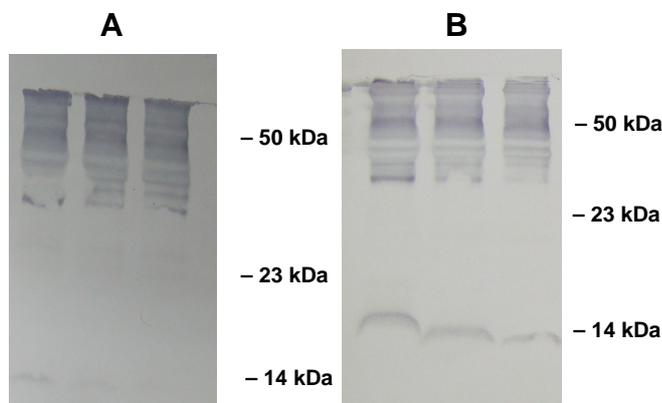


**Figura 20:** Eletroforese bidimensional do veneno de *Brotheas amazonicus* (750 µg), pH 7,0 – 10,0 NL gel gradiente SDS-PAGE 4% a 20% de acrilamida, e “strips” de 13 cm. Gel corado com “coomassie blue” R-250, analisado em “software” “Image Master Platinum 6.0<sup>®</sup>”. Um total de 5 “spots” foram detectados.

Os resultados da eletroforese bidimensional segundo as figuras 19, 20 e 21 sugerem que as toxinas com massa molecular entre 50 e 80 kDa são as mais abundantes com diferentes pontos isoelétricos (pIs) na faixa de 4 a 7.

Também foram detectadas toxinas com pIs ácidos e com massas moleculares entre 14 e 23 kDa. Já na faixa de pI 7,0 a 10,0 só foram detectados 3 proteínas em pI 8,5. As toxinas com massas moleculares de aproximadamente 7 kDa não foram detectadas por eletroforese bidimensional, devido ao fato que a porcentagem de acrilamida usada não permita a retenção de proteínas com massas moleculares menores que 10 kDa.

### 5.2.3 Análise imunoquímica por “western blotting”



**Figura 21: Perfil imunoquímico por western blotting do veneno de *B. amazonicus* em condições não redutoras. A – Veneno + soro anti-aracnídico; B – Veneno + soro Anti-escorpiônico.**

Os resultados imunoquímicos obtidos por “western blotting” segundo a figura 22, sugere que os anticorpos presentes nos antivenenos utilizados apresentaram maior reatividade com as toxinas de *B. amazonicus* maiores ou iguais a 14 kDa.

Dos antivenenos usados, só os anticorpos do antiveneno escorpiônico reagiu consideravelmente com as toxinas de 14 kDa do veneno de *B. amazonicus*. Os anticorpos de nenhum dos antivenenos utilizados reconheceram toxinas no veneno *B. amazonicus* com massas moleculares com menos de 14 kDa e na faixa de 23 kDa – 30 kDa.

Assim, nossos resultados sugerem que algumas toxinas nos venenos de *B. amazonicus* apresentaram na sua estrutura epítomos imunogênicos que não formam complexos com as IgG dos antivenenos testados.

## 6 DISCUSSÃO

As toxinas de escorpiões são misturas complexas, contendo mucopolissacarídeos, lipídeos, sais inorgânicos, moléculas de alta massa molecular com ou sem atividade catalítica, além de outras moléculas de baixa massa molecular, principalmente as fosfolipases A<sub>2</sub> e os neuropeptídeos (PLESSIS, 2007; POSSANI *apud* EL-ALFY, 2007).

A eletroforese bidimensional revelou um total de 279 proteínas com pI 4,0 a 7,0 e mais 5 proteínas com pI 7,0 a 10,0. Apesar de não ter detectado as toxinas com 7 kDa detectadas em SDS-PAGE tris-tricina, a eletroforese bidimensional revelou que *Brotheas amazonicus* possui um veneno com toxinas majoritariamente ácidas. Entretanto, a proteína com maior intensidade tem pI 9,8 e massa molecular de aproximadamente 14 kDa. Supõe-se que pela massa molecular, pode se tratar de uma fosfolipase. Estudos envolvendo espectrometria de massas e degradação de Edmann poderiam caracterizar tal molécula.

A forte intensidade das proteínas de  $\leq 7$  kDa em SDS-PAGE tris-tricina, sugere que elas sejam os principais constituintes do veneno de *B. amazonicus*.

As fosfolipases A<sub>2</sub> dos venenos de escorpiões são responsáveis pela clivagem da região Sn<sub>2</sub> do ácido graxo de fosfolipídeos, e como exemplo dessas toxinas temos a “Phaiodactylipin” de *Anuroctonus phaiodactylus*, com massa molecular de 19,179 kDa, (VALDEZ-CRUZ, 2004) e a “Phospholipin” de *Pandinus imperator*, com massa molecular de 14,8 kDa (CONDE, 1999). O veneno de ambas as espécies não são tóxicas para humanos.

Fosfolipases A<sub>2</sub> de escorpiões estão agrupadas no grupo III de fosfolipases, e se caracterizam por possuírem 10 cisteínas e são compostas por uma ou duas subunidades. Algumas fosfolipases A<sub>2</sub>, entretanto, apresentam-se com duas subunidades heterodiméricas, ou seja, com uma subunidade diferente da outra e estão ligadas por pontes dissulfeto (VALDEZ-CRUZ, 2007).

No veneno de *B. amazonicus*, foram detectadas proteínas com massas moleculares variando entre 14 e 20 kDa, semelhantes às massas moleculares das fosfolipases A<sub>2</sub> acima descritas, e também houve atividade fosfolipásica sobre fosfatidilcolina, sugerindo a presença de fosfolipases A<sub>2</sub> nesse veneno. A purificação e caracterização estrutural dessas toxinas faz-se necessária para elucidar a relação estrutura-função.

O processo de neutralização dos antivenenos utilizados, nas doses testadas, não foi capaz de inibir a degradação da fosfatidilcolina pela fosfolipase A<sub>2</sub> de *B. amazonicus*, entretanto, houve ligação dos anticorpos específicos para toxinas de escorpiões do gênero *Tityus*, detectadas no teste de “western blotting”. Sugere-se uma interação dos anticorpos com epítomos que não inibem a atividade catalítica da enzima em relação ao substrato fosfatidilcolina.

A eficácia do antiveneno antiescorpiônico inibiu a atividade catalítica da serinoprotease de *B. amazonicus*, sugerindo a presença de epítomos comuns nas proteases dos venenos de *B. amazonicus* e do gênero *Tityus*. A purificação e estudos estruturais das proteases de *B. amazonicus* podem esclarecer a relação estrutura-função.

Frações do veneno de *Tityus serrulatus* são capazes de degradar as subunidades A $\alpha$  e B $\beta$  de fibrinogênio, e essa atividade proteolítica foi inibida por EDTA, sugerindo que as enzimas proteolíticas são metaloproteases (MOURA, 2008). No veneno de *B. amazonicus*, as proteases que degradam as subunidades A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio bovino foram inibidas por PMSF, um inibidor específico de serinoproteases.

O veneno de *B. amazonicus* com proteases inibidas foi capaz de aumentar a taxa de inflamação quando injetado na região do coxim plantar de camundongos, em relação ao veneno bruto, o que pode significar a participação das proteases como potentes indutoras de processos inflamatórios.

Almeida *et al.* (2002) também cita a possibilidade das proteases nos venenos de escorpiões atuarem como fatores de dispersão das toxinas, aumentando a

permeabilidade dos tecidos. O veneno da espécie *Hemiscorpius lepturus* (RADMANESH, 1998; PIPELZADEH, 2007) é letal à espécie humana, possuindo além do efeito neurotóxico, efeito necrosante, edema e comprometimento dos rins. Ainda não se sabe qual o mecanismo ou as toxinas atuantes nesse veneno por trás desses efeitos miotóxicos.

Embora o veneno de *B. amazonicus* apresente atividade fosfolipásica e proteolítica, acidentes humanos causados por esta espécie não manifestaram efeitos necrosantes, hemorrágicos ou inflamatórios (Fonte: Centro de Ofidismo Prof. Paulo Friedrich Bührnheim).

Segundo Nishikawa (1994) a DL50 do veneno de *B. amazonicus* pela via endovenosa em camundongos é de 90,909 mg/kg. Em nossos experimentos, observamos que mesmo aplicadas em altas doses, o veneno de *B. amazonicus* não tornou o sangue incoagulável, e quando aplicado pela via endovenosa ou via intracranial não foi letal para camundongos.

Esses dados sugerem que devido à baixa toxicidade do veneno de *B. amazonicus* em camundongos, este pode ser utilizado como fonte de drogas e/ou protótipos de drogas para o tratamento de doenças que acometem o homem.

Determinadas toxinas do veneno de *Androctonus australis*, um escorpião altamente perigoso para humanos, apresentam afinidade por anticorpos de antivenenos antiofídicos contra o veneno de *Crotalus atrox* (Crotalidae) (LIPPS, 2000), sugerindo assim uma certa similaridade dos epítomos existentes nas toxinas ofídicas e de escorpiões.

Nishikawa *et al.* (1994) obtiveram o perfil eletroforético e antigênico do veneno de *B. amazonicus*, utilizando o antiveneno anti-escorpiônico. Seus resultados demonstram um veneno com toxinas que reagem ao antiveneno anti-escorpiônico.

O teste de “Western Blotting” demonstrou que as toxinas com mais de 30 kDa de *B. amazonicus* interagem com os anticorpos dos antivenenos antiescorpiônico e antiaracnídico. Observa-se uma maior interação com o antiveneno antiaracnídico, o

que sugere um maior número de epítomos reconhecidos pelo antiveneno. Entretanto, somente o antiveneno antiescorpiônico apresentou uma maior interação com as toxinas de 14 kDa, sugerindo epítomos reconhecidos pelos anticorpos deste antiveneno.

O grupo dos constituintes mais estudados no veneno de escorpiões são os neuropeptídeos, que atuam a nível de canais iônicos, e testes *in vitro* também demonstraram atividade contra insetos, bactérias e contra o plasmódio causador da malária (CONDE, 2000), também atividades antitumorais e analgésicas (LIU, 2002).

Há outros grupos de neuropeptídeos com massas moleculares de 3 kDa, e em muitos casos não possuem cisteína, o que favorece a sua síntese *in vitro*, pois não há a formação de ligações dissulfeto, e podem atuar como potencializadores de bradicinina, antimicrobianos, ou com atividade biológica ainda por ser descoberta (PLESSIS, 2006).

Em nosso trabalho, mediante eletroforeses SDS-PAGE tris tricina e SDS-PAGE gradiente foi possível detectar peptídeos entre 14 kDa e 7 kDa no veneno de *B. amazonicus*. Entretanto, peptídeos de menor massa molecular e com atividade biológica desconhecida podem existir, já que durante o processo de ativação de zimogênio, muitos peptídeos podem ser liberados durante a ativação proteolítica das toxinas de maior massa molecular.

Usado pela medicina chinesa, escorpiões da espécie *Buthus martensii* desidratados possuem atividades terapêuticas contra reumatismo, convulsões e dores em geral. Certas toxinas com massas moleculares de 7 kDa isoladas do veneno de *B. martensii* também apresentam capacidade inibitória a dor 4 vezes maior que a do ópio. (WANG, 2001; LI, 2006). Peptídeos com atividade analgésica dos venenos de escorpiões já foram descritos, e um peptídeo antitumoral e analgésico em mamíferos, o AGAP, foi isolado de *B. martensii* (LIU, 2002).

Experimentalmente é possível induzir, através do teste de formalina, a dor de origem neurogênica e a de origem inflamatória em camundongos (ABOTT, 1994), e

usando-se ácido acético glacial pode-se induzir só a dor de origem inflamatória (MALVAR, 2004; MIRANDA, 2002).

Usando-se ambas as metodologias, foi observado que o veneno de *B. amazonicus* injetado no sistema nervoso central (SNC), apresenta atividade analgésica contra a dor de origem inflamatória e em menor grau contra a dor de origem neurogênica. Assim, contrastando com os dados da literatura, sugere-se que no veneno de *B. amazonicus* também sejam os peptídeos os responsáveis dessa potente atividade analgésica observada.

A atividade analgésica contra a dor inflamatória em camundongos do veneno de *B. amazonicus* lembra muito os efeitos dos opióides kappa (RIVIÈRE, 2004), porém, sem os efeitos colaterais de sedação e disforia presentes nesses opióides, sinais possivelmente não observados no experimento.

Há um analgésico em potencial no veneno de *B. amazonicus*, que pode agir a nível sistêmico e sem acarretar efeitos colaterais visíveis. Como o veneno foi aplicado pela via intracranial, a área maior de contato foi com a projeção nociceptiva descendente, o que explica a inibição total da dor inflamatória (BALDO *apud* AIRES, 1999).

Um outro meio de inoculação que atingisse as projeções nociceptivas ascendentes poderia esclarecer se o veneno de *B. amazonicus* poderia inibir a dor local. Kolesnikov *et al.* (1996) observou que a morfina aplicada no meio cerebroespinhal tem efeitos sistêmicos mais elevados do que se aplicado localmente. O veneno de *B. amazonicus* a 50 µg pela via intracranial foi capaz de inibir 30,46% da dor neurogênica, e mesmo duplicando-se a dose para 100 µg, não houve diferenças significativas em relação à dose de 50 µg contra a inibição da dor. Talvez, se a via de aplicação for intra-espinhal ou endovenosa, a ação antinociceptiva da dor neurogênica fosse inibida.

Assim, os dados experimentais sugerem que no veneno de *B. amazonicus* encontram-se toxinas de grande importância para o desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica. O isolamento e caracterização estrutural são

necessários para que esse potencial biotecnológico seja transformado em riqueza econômica contribuindo ao desenvolvimento da Amazônia.

## 7 CONCLUSÕES

Segundo nossos resultados sobre as propriedades do veneno de *Brotheas amazonicus* avaliadas, podemos concluir:

- 1- As toxinas protéicas do veneno apresentam massas moleculares entre 7 a 80 kDa, sendo majoritariamente de caráter ácido (pI 4 a 7);
- 2- Enzimas das classes das fosfolipases A<sub>2</sub> e serinoproteases (70 a 80 kDa) se encontram na composição do veneno. Delas, só as serinoproteases foram inibidas pelos soros antiescorpiônicos;
- 3- As serinoproteases degradam as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio bovino, sem formação do coágulo de fibrina;
- 4- O veneno induz processos inflamatórios, e os dados sugerem que as serinoproteases potencializam essa atividade;
- 5- As doses testadas, via intracranial e endovenosa, não induziram letalidade em camundongos, sugerindo baixa toxicidade do veneno para mamíferos;
- 6- As toxinas do veneno, quando inoculados intra-cranialmente, apresentam potente atividade analgésica da dor de origem inflamatória principalmente, mas em menor grau da dor de origem neurogênica;
- 7- A técnica de “Western Blotting” sugere a presença de epítomos comuns nas toxinas de aranhas e de escorpiões do gênero *Tityus*;
- 8- O veneno de *B. amazonicus* apresenta toxinas com grande potencial biotecnológico.

## 8 PERSPECTIVAS

1- Purificação e análise estrutural da função de fosfolipases  $A_2$ , serinoproteases e neurotoxinas.

2- Purificação e estrutura da toxina responsável do potente efeito analgésico do veneno.

3- Desenvolvimento de novos analgésicos mais potentes e com menos efeitos colaterais.

## 9. BIBLIOGRAFIA

ABBOT, Frances V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, n. 60, p. 91-102, 1995.

AIRES, M. de M.; BALDO, M. V. et al. *Fisiologia*. Pag. 224-225. Guanabara Koogan, 1999.

ALMEIDA, F. M.; PIMENTA, A. M.; 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, n. 7, p. 199-203, 2002.

ARAÚJO, T. F.; HIGA, A.M.; NORONHA, M. D. N.; MARTINS, M. J. P.; MUNIZ, E. G.; MEDEIROS, B. M.; AGUIAR, N. O.; LÓPEZ-LOZANO, J. L. Proteolytic activity of amazonian scorpion *Tityus metuendus* venom (Scorpiones: Buthidae) *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, V. 13, n. 1, p. 254, 2007.

BARNES, R. D.; RUPPERT, Edward E. *Zoologia dos Invertebrados*. 6° Ed., 1029 p., 1996.

BÜCHERL, W. Scorpionism in the old world. In: Bücher, W. & Buckley, E E (eds), *Venomous animal and their venoms* Vol. 111. Academic Press, pp 317-369, 1971.

CALDERON-ARANDA, Emma Soraida; OLAMENDI-PORTUGAL, Timoteo; POSSANI, Lourival Domingos. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine*, v. 13, n. 13, p. 1198-1206, 1995.

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

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

CONDE, R.; ZAMUDIO, F. Z.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase  $A_2$  from *Pandinus imperator* scorpion venom. *Eur. Biochem. Soc.*, v. 460, n. 3, p. 447-450, 1999.

CUI, Meng; SHEN, Jianhua; BRIGGS, James M.; LUO, Xiaomin; TAN, Xiaojian; JIANG, Hualiang; CHEN, Kaixian; JI, Ruyun. Brownian dynamics simulations of interaction between scorpion toxin Lq2 and potassium ion channel. *Biophysical Journal*, v. 80, n. 4, p. 1659-1669, 2001.

DE LIMA, M. E; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello) venom. *J. Toxicol. Toxin Reviews*, v. 14, p. 457-481, 1995.

DEBIN, J. A.; STRICHARTZ, G. R. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, v. 29, n. 11, p. 1403-1408, 1991.

DESHANE, J.; GARNER, C. C.; SONTHEIMER, H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.*, n. 278, p. 4135-4144, 2003.

DORCE, Valquiria A. C.; SANDOVAL, Maria Regina L. Brazilian Scorpion venoms: Pharmacological aspects. *Instituto Butantan*, v. 53, n. 2, p. 191-195, 1992.

EL-ALFY, Abir T.; AHMED, A. E.; FATANI, Amal F.; KADER, Farida. Amelioration of the cardiovascular manifestations of the the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* envenomation in rats by red grape seeds proanthocyanidins. *Toxicon*, v. 51, n. 3, p. 321-333, 2007.

FINNEY, D. J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge university Press, n. 31, 256 p., 1971.

FU, Wei; CUI, M.; BRIGGS, M.; HUANG, X.; CHEN, Kaixian. Brownian Dynamics simulation of the recognition of the scorpion toxin Maurotoxin with the voltage-gated potassium ion channels. *Biophysical Journal*, v. 83, n. 5, p. 2370-2385, 2002.

FUKUHARA, Y. D. M.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F. Q. C.; REIS, M. L.; DONADI, E. A. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicology and Applied Pharmacology* v. 196, p. 390–395, 2004.

FUKUHARA, Y. D. M.; REISB, M. L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R. ; CUNHA, F. Q. C.; REIS, M. L.; DONADI, E. A. Increased plasma levels of IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-a in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, v. 41, p. 49-45, 2003.

FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, DF. 2001.

GAO, Rong; ZHANG, Yong; GOPALAKRISHNAKONE, Ponnampalam. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese Scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon*, v. 52 p. 348-353, 2008.

GAZARIAN, Karlen G.; GAZARIAN, Tatiana; HERNÁNDEZ, Ricardo; POSSANI, Lourival D. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*, v. 23, p. 3357-3368, 2005.

GOLDSTEIN, S. A.; PHEASANT, D. J.; MILLER, C. The charybdotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Biophys. J.*, v. 65, n. 4, p. 1613-1619, 1994.

GORDON, D.; KARBAT, I.; COHEN, L.; KAHN, R.; GILLES, N.; DONG, K.; STÜMER, W.; TYTGAT, J. GUREVITZ, M. The differential preference of scorpion  $\alpha$ -

toxins for insects or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. *Toxicon*, v. 49, n.4, p. 452-472, 2007.

GOUDET, Cyril; TYTGAT, Jan et al. An overview of toxins and genes from the venom of the asian scorpion *Buthus martensi* Karsh. *Toxicon*, v. 40, n. 9, p. 12-39, 2002.

GUERON, M.; ILIA, R.; SHAHAK, E.; SOFER, S. Renin and aldosterone levels and hypertension following envenomation in humans by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, v. 30, n. 7, p. 765-767, 1992.

GUREVITZ, M.; FROY, O.; ZILBEBERG, N.; TURKOV, M.; STRUGATSKY, D.; CHEJANOVSKY, N. et al. Sodium channel modifiers from scorpion venom: Structure-activity relationship, mode of action and application. *Toxicon*, v. 36, n. 11, p. 1671-1682, 1998.

GUREVITZ, M.; KARBAT, I.; ILAN, N.; COHEN, L.; KAHN, R.;TURKOV, M.; STANKIEWICZ, M.; STÜMER, W.; DONG, K.; GORDON, D. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon*, v. 49, n. 4, p. 473-489, 2007.

HARGREAVES, K. M.; KEISER, K. Development of new pain management strategies. *Journal of dental education*, v. 66, n. 1, p. 113-121, 2001.

HARVEY, B. J. Cross-Talk between sodium and potassium channels in tight epithelia. *Kidney Int.*, v. 48, p. 1191-1199, 1995.

HEUSSEN, C; DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, v. 102, p. 196-202, 1980.

HÖFFER, Hubert.; WOLLSCHIED, Evi.; GASNIER, Thierry. The relative abundance of *Brotheas amazonicus* (Chactidae, Scorpiones) in different habitat types of a central amazon rainforest. *The Journal of Arachnology*, v. 24, p. 34-38, 1996.

HOWSE, P. E. Brain structure and behavior in insects. *Annual Review of Entomology*. Vol. 20, p. 359-379, 1975.

HUANG, C.C.; STRICHER, F.; MARTIN, L. KWONG, P. D. et al. Scorpion-toxin mimics of CD4 in complex with human immunodeficiency virus gp120 crystal structures, molecular mimicry, and neutralization breadth. *Structure*, v. 5, p. 755-758, PDB: 1yy1-1yym, 2005.

ISMAIL, M.; FATANI, Amal J. Y.; DABES, T. T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of Kallikrein-kinin inhibitors. *Toxicon*, v. 30, p. 1257 – 1279, 1992.

KARBAT, Izhar; GUREVITZ, Michael et al. Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion  $\alpha$ -toxin. *The Journal of Biological Chemistry.*, v. 279, p. 31679 – 31686, 2004.

KOLESNIKOV, Y. A.; JAIN, S.; WILSON, R.; PASTERNAK, G. W. Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 279, p. 502-506, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, v. 27, p. 680-685, 1970.

LIPPENS, G.; NAJIB, J.; BIANCI, A.; DHALLUIN, C.; TARTAR, A. Solution structure of chlorotoxin and a three-dissulfide bridge analogue. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1079-1079, 1996.

LIPPS, Binie V.; KHAN, Abbas A. Antigenic cross reactivity among the venoms and toxins from unrelated diverse sources. *Toxicon*, v. 38, p. 973-980, 1999.

LIU, C. M.; PEI, G. Q. Analgesic effect of the venom of scorpion *Buthus martensi* Karsh. *J. Shen Yang Coll. Pharm.*, v. 6, p. 176-180, 1989.

LIU, Yan-Feng. WU, Chun-Fu et al. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Expression & Purification.*, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2002.

LORET, E. & HAMMOCK, B. Structure and neurotoxicity of venoms. *Scorpion biology and research*, Oxford University Press, New York, p. 204-233, 2001.

LÓPEZ-LOZANO, J. L.; DE SOUZA, M. V.; RICART, C. A.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FLORES SANCHEZ, E.; MUNIZ, E.; BÜHRNHEIM, P. F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon.*, p.40, n. 7, p. 997-1006, 2002.

LOURENÇO, W. R. *Scorpions of Brazil*. Ed. De l'If, Paris, 308 p., 2002.

LOURENÇO, W. R.; ADIS, Joachim. *Amazonian Arachnida and Myriapoda*. Cap. 4.9 (Scorpiones)., pag. 399-438, 2007.

MACKINNON, Roderick; COHEN, Steven L.; KUO, A.; LEE, A.; CHAIT, B. T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, v.280, n. 5360, p. 106-109, 1998.

MALVAR, David do Carmo; VANDERLINDE, Frederico Argollo. Influencia do pré-tratamento com o sumo de *Sedum dendroideum* sobre a nocicepção em camundongos. *Ver. Univ. Rural*, v. 24, n. 2, p. 135-140, 2004.

MILLER, C. The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides. *Neuron.*, v. 15, n. 1, p. 5 -10, 1995.

MIRANDA, Fábio Guilherme G.; ANTONIOLLI, Ângelo Roberto. Toxicidade aguda e atividade antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Tabebuia avellaneda*. *R. B. de Farmacognosia*, v. 12, p. 91-94, 2002.

MOUHAT, S.; JOUIROU, B.; MOSBAH, A.; DE WAARD, M.; SABATIER, J. M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. Journal*, v. 378, p. 717 – 726, 2004.

MOURA, A. D.; FONSECA, P. H. M.; SANCHEZ, E. F.; RICHARDSON, M.; CORDEIRO, M. N.; BORGES, M. H. Identification of high molecular mass proteins in the venom of scorpion *Tityus serrulatus*. *SBBq*, 2008.

NISHIKAWA, A. K.; DIAS DA SILVA, W. et al. Antigenic cross reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*, vol. 32, p. 989-998, 1994.

PAGE, Clive; CURTIS, Michael; SUTTER, Morley; WALKER, Michael; HOFFMAN, Brian. *Farmacologia Integrada*. 2 ed. Manole, São Paulo, SP. 2004.

PETERSON, Brianna; KNOTTS, Taylor; CUMMINGS, Brian S. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> isoforms in oxidant-induced neural cell death. *NeuroToxicology*, v. 28, p. 150–160, 2007.

PIMENTA, Adriano M. C.; MARTIN-EUCLAIRE, H.; ROCHAT, S. G.; FIGUEIREDO, E.; KALAPOTHAKIS, L. C. C. Afonso; DE LIMA, Maria Helena. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the south american scorpion *Tityus bahiensis*. *Toxicon*, v. 39, p. 1009-1019, 2001.

PIPELZADEH, Mohammad H.; JALALI, Amir; TARAZ, Mohammad; POURRABAS, Roya; ZAREMIRAKABADI, Abbas. An epidemiological and clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon*, v. 50, p. 984-992, 2007.

PLESSIS, L. H. du. ELGAR, D.; PLESSIS, J. L. du. Southern African scorpion toxins: An overview. *Toxicon*, v. 51, p. 1-9, 2007.

PRIEST, B. T.; KACZOROWSKI, G. J. Subtype-selective sodium channel blockers promise a new era of pain research. *PNAS*, v. 104, n. 20, p. 8205 – 8206, 2007.

POLIS, Gary A. *Biology of Scorpions*. Stanford University Press, 587 p., 1990.

POSSANI, L. D. Structure of scorpion venom. *Handbook of natural toxins*, Vol. II. Marcel Dekker, v. 2, p. 513-550, 1984.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. N.; FLETCHER, M. D.; FLETCHER Jr, P. L. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biomol. Chem.*, v. 266, p. 3178 – 3185, 1991.

POSSANI, L. D.; BECERRIL, 8.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na channels. *Eur. J. Biochem.*, v. 264, p. 287-300, 1999.

RADMANESH, Mohammed. Cutaneous manifestations of *Hemiscorpius lepturus* sting. International Journal of Dermatology, Blackwell Science, v. 37, p. 500-507, 1998.

RENNER, I. G.; PANTOJA, J. L.; ABRAMSON, S.B.; DOUGLAS, A. P.; RUSSEL, F. E.; KOCH, M. K. Effects of scorpion and rattlesnake venoms on the canine pancreas following pancreaticoduodenal arterial injections. Toxicon, v. 21, n. 3, p. 405 – 420, 1983.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup> -channels. Toxicon, v. 43, n. 8, p. 865 – 875, 2004.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. Toxicon, v. 46, n. 8, p. 831-844, 2005.

SCHÄGGGER, Hermann. Tricine-SDS-PAGE. Nature Protocols, v. 1, n. 1, p. 16 – 22, 2006.

SCHOLZ, Joachim.; WOOLF, Clifford J. Can we conquer pain? Nature Publishing group, v. 5, p. 1026 – 1067, 2002.

SHAHBAZZADEH, D.; SRAIRI-ABID, N.; FENG, W.; RAM, N.; BORCHANI, L.; RONJAT, M.; AKBARI, A.; PESSAH, I. N.; DE WAARD, M.; EL AYEB, M. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. Biochemistry Journal, v. 404, p. 89 – 96, 2007.

SHEN, S.; KHAZAELI, M. B.; GILLESPIE, G. Y.; ALVAREZ, V.L. Radiation dosimetry of 131 I-chlorotoxin for synergistic targeted radiotherapy for malignant glioma in mice. Int. J. Radiation Oncol. Bio. Physics, v. 57, n. 2, p. 254 – 255, 2005.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação; SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde; MS – Ministério da Saúde. Casos de acidentes por escorpião e Óbitos por acidentes por escorpiões. Brasil, 2008.

SOMJEN, G. G. Extracellular Potassium in the Mammalian Central Nervous System. Annu. Rev. Physiol., v. 41, p. 159-177, 1979.

SOROCEANU, L.; GILLESPIE, Y.; KHAZAELI, M. B.; SONTHEIMER, H. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. Cancer research, v. 58, n. 21, p. 4871 – 4879, 1998.

THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon, v. 41, p. 541–557, 2003.

TYTGAT, J.; CHANDY, K. G.; GARCIA, M. L.; GUTMAN, G. A.; MARTIN-EAUCCLAIRE, 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, n. 11, p. 444 – 447, 1999.

UEDA, Hiroshi. MIZUNO, Kiyonobu. New approaches to study the development of morphine tolerance and dependence. *Life sciences*, v. 74, n. 2, p 313-320, 2003.

VALDEZ-CRUZ, Norma A.; BATISTA, Cesar V. F.; POSSANI, Lourival D. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, p. 1453-1464, 2004.

VALDEZ-CRUZ, Norma A.; SEGOVIAL, L.; CORONA, M.; POSSANI, Lourival D. Sequence and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Gene*, v. 396, p. 149 – 158, 2007.

VANDERPOOL, Alyssa. Study Demonstrates Safety of Promising Investigational Treatment for Deadly Brain Cancer. TransMolecular Inc. 2006.

VITA, Claudio; DRAKOPOULOU, Eugenia; VIZZAVONA, Jean; ROCHETTE, Sandrine; MARTIN, Loïc; MÉNEZ, André; ROUMENSTAD, Christian; YANG, Yin-Shan, YLISASTIGUI, Loyda; BENJOUADI, Abdelaziz; GLUCKMANI, Jean Claude. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *PNAS*, v 23, n. 23, p. 13091 – 13096, 1999.

VOET, D.; VOET, J. *Bioquímica*. 6° Ed., 2006.

YU, K.; FU, W.; LIU, HONG; LUO, X.; CHEN, K. X.; DING, J.; SHEN, J.; JIANG, H. Computational simulations of interactions of scorpion toxins with the voltage-gated potassium ion channel. *Biophysical journal*, v. 86, n. 6, p. 3542 – 3555, 2004.

XIONG, Yu-Mei; CHI, Cheng-Wu et al. Molecular Characterization of a new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensi* Karsh. *Toxicon*, v. 37, n. 8, p. 1165 – 1180, 1999.

WOOD, John N.; PERL, Edward R. Pain. *Genetics of disease*, v. 9, n. 3, p. 328 – 332, 1999.

WOOLF, Clifford J.; MAX, Mitchell. Mechanism-based pain diagnosis. *A. S. of Anesthesiology*, v. 95, n. 1, p. 241 – 249, 2001.

WU, J.J.; DAI, L.; LAN, Z. D.; CHI, C. W. The gene cloning and sequencing of Bm-12, a chlorotoxin-like peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, v. 38, n. 5, p. 661 – 668, 2000.

ZHOU, X. H.; YANG, D.; ZHANG, J.H.; LIU, C. M.; LEI, K. J. Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of *Buthus martensi* Karsch. *Biochem. Journal*, v. 257, n. 2, p. 509 - 517, 1989.

ZLOTKIN, E. The interaction of insect selective neurotoxins from scorpion venoms with insect neuronal membranes. *Neuropharmacology and pesticides action*, Ellis Horwood, p. 352-383, 1986.

ZLOTKIN, E.; GORDON, D. Binding of an  $\alpha$  scorpion toxin to insect sodium channels is not dependent on membrane potential. FEBS, v. 315, p. 125 – 128, 1993.