

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DOUGLAS SILVA DOS SANTOS

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO VENENO DE *BOTHRIURUS BONARIENSIS* SOBRE O
*SISTEMA NERVOSO DE INSETOS E MAMÍFEROS***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

2014

DOUGLAS SILVA DOS SANTOS

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO VENENO DE *BOTHRIURUS BONARIENSIS* SOBRE O
*SISTEMA NERVOSO DE INSETOS E MAMÍFEROS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

São Gabriel

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

SSA237a Santos, Douglas Silva dos
ATIVIDADE BIOLÓGICA DO VENENO DE BOTHRIURUS BONARIENSIS
SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE INSETOS E MAMÍFEROS / Douglas
Silva dos Santos.
53 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIENCIAS BIOLOGICAS, 2014.
"Orientação: Paulo Marcos Pinto".

1. Escorpião. 2. Neurofarmacologia. 3. Toxinologia. I.
Título.

DOUGLAS SILVA DOS SANTOS

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO VENENO DE *BOTHRIURUS BONARIENSIS* SOBRE O
SISTEMA NERVOSO DE INSETOS E MAMÍFEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em 21 de Março de 2014.
Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador - UNIPAMPA

Prof. Dr. André Passaglia
Membro Titular- UFSM

Prof. Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé
Membro Titular - UNIPAMPA

Prof. Dr. Gabriel da Luz Wallau
Membro Titular – UNIPAMPA

Dedico essa dissertação aos meus amados pais e ao meu eterno anjo
Tia / mãe Sônia Lizete Silva Somavilla.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus por todas as oportunidades e obstáculos concedidos e vencidos, senão fosse estes não estaria aqui. Agradecer também pela força, fé, coragem e determinação nos dias difíceis.

Agradeço aos meus amados pais, Angela e Ariovaldo e minha irmã Michele pelo amor, carinho e principalmente pelo incentivo em me fazer batalhar pelos meus objetivos e sonhos. Obrigado pela confiança depositada, obrigado por me proporcionarem todos os momentos bons que tenho vivido, obrigado pelo amor, carinho, colo, amparo, abraço e aquele EU TE AMO que me revigora cada vez que ouço vocês falarem. A vocês meu muito obrigado, amo muito vocês!

Agradecer ao meu anjo que sempre me incentivou a correr atrás das minhas metas, meu anjo/ tia/ chamado Sônia, que não está mais comigo fisicamente, mas sei que de onde está, esta torcendo e vibrando por mais uma conquista. Te amarei eternamente!

Ao meu orientador prof. Dr. Paulo Marcos Pinto por todos os conhecimentos, conversas e conselhos compartilhados ao longo desses dois anos. Gostaria de agradecer sua imensa paciência, compreensão e incentivo durante essa trajetória. Agradecer não só pelo profissionalismo, mas também pela amizade e companheirismo e principalmente por acreditar no meu potencial. Sou um cara de muita sorte por ter sido teu primeiro orientado de mestrado do PPGCB, gostaria de te dizer que pra mim você não é só um grande exemplo de homem e amigo, mas principalmente um grande exemplo de professor e pesquisador. Se um dia for 1/3 do profissional que você é serei um cara muito feliz. Muito obrigado por ter contribuído com meu crescimento profissional, espero que continue contribuindo por muito tempo ainda. A ti grande mestre, meu muito obrigado! “Que sejamos mundialmente famosos!”

Ao meu coorientador professor Dr. Cháriston André Dal Belo pela ajuda, atenção e por todos os conhecimentos proporcionados. Agradecer sua paciência e presteza, mas principalmente sua enorme participação no desenvolvimento desse trabalho. Obrigado por seu envolvimento, incentivo, amizade e por acreditar no meu potencial. A ti grande mestre, meu muito obrigado!

A minha prima irmã Diully Santos, pelo apoio, carinho e amor incondicional nas horas boas e difíceis durante essa jornada e toda vida. Obrigado pela força, companheirismo e por sempre me pôr para cima. A ti mana meu muito obrigado! Te amo!

A Jordana Nagel por me ajudar com as inúmeras dúvidas da seleção de mestrado e principalmente por torcer pela minha aprovação. A ti meu muito obrigado.

Ao Leonardo Neto, meu amigo, irmão e companheiro de todas as horas. Obrigado pelo carinho, amor, incentivo, apoio, força e principalmente por acreditar no meu potencial. A ti mano, meu muito obrigado! Te amo!

As minhas amigas, colegas de mestrado e vizinhas de prédio Rayssa Medina e Camila Lôbo por vários momentos de alegria e descontração durante esse ano, obrigado por dividirem os anseios, angústias e principalmente por dividirem a alegria de vários momentos únicos. A vocês meu muito obrigado!

Ao Carlos Gabriel Moreira de Almeida pela ajuda e atenção na extração de veneno dos escorpiões. A Raquel Soares pelas pequenas baratas muito bem cuidadas e cedidas ainda quando ninfas para alimentação dos escorpiões. A vocês, meu muito obrigado!

A Suélen Alves e ao professor Tiago Gomes por me ceder inúmeros dos escorpiões coletados das suas armadilhas. Muito obrigado, a ajuda na captura dos animais foi crucial para extração e realização dos experimentos. A vocês meu muito obrigado!

A Doutoranda Ana Paula Zemolin pela sua enorme atenção em me ajudar na quantificação de proteínas. A ti Ana, meu muito obrigado!

A minha amiga e colega Marines Heberle pela amizade, companheirismo e presteza de horas e horas no laboratório, muitas dessas nos finais de semana. Obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência e pela enorme contribuição no meu trabalho. A ti minha amiga, meu muito obrigado!

A minha colega e amiga de laboratório e pesquisa Evelise Leis pela amizade e companheirismo nas muitas horas de extração de veneno, como nas demais atividades realizadas. Obrigado por ouvir meus desabafos, anseios e principalmente por dividir comigo tudo isso, inclusive as alegrias. A ti minha amiga, meu muito obrigado.

A todos os colegas e amigos de pesquisa do Laboratório de Proteômica Aplicada (LPA) UNIPAMPA, Alexandre Freitas, Evelise Leis, Jeferson Camargo, Lais Ceschini, Linna Carmo, Luiz Fernando Duarte, Paola Bolzan, Matheus Ferreira e Kelvin Oliveira. Obrigado pelo companheirismo e todos os momentos vividos em grupo. A vocês, meu muito obrigado!

À comissão examinadora desta dissertação pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço à UNIPAMPA e ao PPGCB pela possibilidade de realização deste curso, a CAPES pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado.

”O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

Henry Poincaré

RESUMO

Os escorpiões são artrópodes quelicerados pertencentes ao Filo Arthropoda, classe Arachnida e ordem Scorpiones. A espécie *Bothriurus bonariensis*, popularmente conhecida como escorpião preto, apesar de não induzir frequentemente quadros clínicos graves é um escorpião facilmente encontrado no ambiente urbano. Venenos animais têm sido amplamente reconhecidos como uma das principais fontes de moléculas biologicamente ativas. Tendo em vista o amplo espectro de uso destas biomoléculas ativas encontradas em venenos de escorpiões, a caracterização do veneno torna-se interessante não só do ponto de vista biotecnológico, mas também ecológico. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade biológica do veneno de *B. bonariensis* sobre modelos de insetos e mamíferos. A extração do veneno do escorpião *B. bonariensis* foi realizada através da estimulação elétrica com voltagem de 35 V, diretamente do derradeiro segmento abdominal. A análise por SDS-PAGE foi realizada com duas amostras do estudo, onde a amostra A nas concentrações de 60 µg exibiu uma banda de 50 kDa e a amostra B de 30 µg, precipitada com TCA apresentou sete bandas, que variaram de 250 kDa a 25 kDa. Para análise do bloqueio da junção neuromuscular induzido pelo veneno *B. bonariensis in vivo*, foi utilizado o modelo experimental de barata, na qual baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* foram previamente anestesiadas por congelamento a -20°C, e afixadas na placa de dissecação. Após a dissecação da cutícula, na região metatorácica, o nervo 5 foi exposto e os eletrodos de Ag/AgCl inseridos para a estimulação elétrica. O veneno de *B. bonariensis* induziu uma paralisia neuromuscular nas preparações neuromusculares nervosas da barata. Para analisar o aumento do influxo de cálcio, foi utilizado o modelo experimental de mamíferos, no qual culturas primárias de hipocampo de ratos foram empregadas. Utilizando imagens de fluorescência para monitorar os níveis de cálcio intracelular, observou-se que o veneno de *B. bonariensis* induziu um aumento neuronal acentuado na concentração de cálcio intracelular. Como, os receptores de glutamato da junção neuromuscular de insetos são semelhantes ao mamífero subtipo AMPA/Cainato, é possível que o aumento no influxo de cálcio de células do hipocampo possa ser uma modulação direta da liberação de glutamato. Também, o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno em baratas, revelou a presença de toxinas inseticidas. Nesse trabalho, pioneiro com esta espécie de escorpião, é demonstrado o potencial biotecnológico do veneno de *B. bonariensis*

Palavras-chave: preparações biológicas, bloqueio neuromuscular, influxo de cálcio

ABSTRACT

Scorpions are chelicerae arthropods belonging the phylum Arthropoda, Arachnida class and Scorpiones order. The *Bothriurus bonariensis* species, commonly known as the black scorpion, though not often induce severe clinical conditions is easily found in the urban environment. Animal venoms have been widely recognized as a major source of biologically active molecules. Given the broad spectrum of use of these active biomolecules found in scorpion venoms, the characterization of venoms becomes interesting not only for biotechnological purposes, but also for ecological inferences. The aim of this work was to analyze the biological activity of *B. bonariensis* venom in insect and mammal models. The *B. bonariensis* scorpion venom extraction was performed by 35 V electrical stimuli directly in the last abdominal segment. The SDS-PAGE analysis was carried out with two different protein samples. Sample A (60 µg) showed a 50 kDa band and sample B (30 µg), previously precipitated with TCA/Acetone showed seven bands, that varied from 25 kDa to 250 kDa. To analyze the neuromuscular junction blockade induced by the *B. bonariensis* venom, *in vivo* experimental procedures using *Nauphoeta cinerea* cockroaches as model were conducted. Specimens were anesthetized by chilling at -5 °C, and placed onto the dissection plate. After cuticle dissection at the metathoracic region, the nerve was exposed and 5 Ag/AgCl electrodes were inserted for electrical stimuli. The *B. bonariensis* venom induced *in vivo* neuromuscular paralysis of cockroach nerve-muscle preparations. In order to analyze the increase of calcium influx in the mammalian model, primary cell cultures of rat hippocampus were used. Calcium images showed increasing intracellular calcium levels in neuronal cells induced by *B. bonariensis* venom. As, glutamate receptors of insect neuromuscular junction are similar to the mammalian AMPA/kainate subtype, thus, it is possible that the increase in calcium influx of hippocampal cells can be a direct modulation of glutamate release, leading to membrane depolarization by increasing Na⁺ influx and calcium concentration rise. In addition, the venom interaction with cockroach neuromuscular junction reveals the presence of insecticides toxins. In this work, pioneer for this scorpion species, we demonstrated the biotechnological potential of *B. bonariensis* venom.

Key words: biological preparations, neuromuscular blockade, calcium influx.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - <i>Bothriurus bonariensis</i>	2
Figura 2 - Morfologia geral dos escorpiões.....	5
Figura 3 - Telson de <i>B. bonariensis</i>	5

MANUSCRITO

Figure 1 - Analyses of venom from <i>Bothriurus bonariensis</i> by 12% SDS-PAGE	28
Figure 2 - Neuromuscular blockade induced by <i>Bothriurus bonariensis</i> venom (BBV) at <i>in vivo</i> cockroach coxal-adductor methatoracic nerve-muscle preparation.....	29
Figure 3 - Analysis of different parameters related to the action of <i>Bothriurus bonariensis</i> venom (BBV) at <i>in vivo</i> cockroach coxal-adductor methatoracic nerve-muscle preparation..	30
Figure 4 - Increase of intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) in cultured hippocampal cells of neonate rats by <i>Bothriurus bonariensis</i> venom (BBV)	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

BBV - *Bothriurus bonariensis* Venon

BPS – Tampão Fosfato-salino

Ca²⁺ - íon de cálcio

Cl⁻ - íon de cloro

CEUA- Comitê de Ética para Uso de Animais

CONSEA - Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional

GLU - glutamato

K⁺ - íon de potássio

kDa - quilodaltons

NMDA - N-metil-d-aspartato

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida, dodecil-sulfato de sódio

TCA - Ácido Tricloroacético

APRESENTAÇÃO

No item INTRODUÇÃO, consta uma breve revisão da literatura sobre o tema abordado nesta dissertação.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item MANUSCRITO. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

O item CONCLUSÕES, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados dos manuscritos presentes neste trabalho.

As REFERÊNCIAS referem-se somente às citações que aparecem no item INTRODUÇÃO desta dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
APRESENTAÇÃO	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Escorpiões.....	1
1.2. Escorpionismo	3
1.3. Características morfofisiológicas dos escorpiões.....	4
1.4. Venenos animais.....	6
1.5. Aplicações Biotecnológicas.....	7
1.6. Neurotransmissão, canais iônicos e toxinas escorpiônicas.....	8
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MANUSCRITO	13
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
5. PERSPECTIVAS	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Escorpiões

Os escorpiões são predadores invertebrados terrestres pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida e ordem Scorpiones. Estão entre os animais mais antigos a habitarem a terra (ZHIJIAN *et al.*, 2006). Sua notória capacidade evolutiva e de adaptação permitiu que sobrevivessem na superfície terrestre por aproximadamente 400 milhões de anos e que conservassem sua morfologia praticamente inalterada (LOURENÇO, 1994). A ordem Scorpiones pode ser considerada bastante diversa, apresentando mais de 1.500 espécies conhecidas, distribuídas em 14 famílias e 163 gêneros (Fet *et al.*, 2000, Soleglad & Fet, 2003). Ainda segundo Soleglad & Fet (2003) a ordem Scorpiones apresenta ampla distribuição geográfica, estando representada em todos os continentes, com exceção da Antártica.

Por serem diversos, encontram-se em quase todas as latitudes, de temperadas a tropicais, vivendo em terra firme e em quase todos os ecossistemas terrestres, como desertos, savanas, florestas temperadas e tropicais (Cruz, 1994). Porém a capacidade de sobrevivência de algumas espécies a condições extremas não caracteriza os escorpiões como animais ecologicamente generalistas (BRAZIL & PORTO, 2010). Algumas espécies dos gêneros *Centruroides*, *Isometrus*, *Tityus*, *Euscorpius* e *Bothriurus* apresentam alta plasticidade ecológica e padrões irregulares de distribuição, podendo ocorrer inclusive em ambientes perturbados ou modificados pela ação do homem (LOURENÇO, 1994).

No Brasil, a escorpiofauna é representada por quatro famílias, Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Ischnuridae, abrangendo 17 gêneros e 94 espécies consideradas atualmente válidas (LOURENÇO, 2002).

A família Bothriuridae é predominante neotropical, possuindo representantes na África, Índia, Austrália e regiões temperadas e subtropicais da América do Sul (SCHMIDT, 2008). Inclui aproximadamente 140 espécies e 15 gêneros (BRAZIL; PORTO, 2010). São escorpiões de pequeno a médio porte (2,5 a 6 cm), com coloração variando do avermelhado ao preto. No Brasil são registradas 16 espécies pertencentes a cinco gêneros: *Bothriurus*, *Brachistosternus*, *Brazilobothriurus*, *Thelyus* e *Urophonius*.

O gênero *Bothriurus* é o mais especioso desta família, com 41 espécies sendo 10 espécies registradas para o Brasil. Apresenta uma ampla distribuição no continente, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai e no Brasil especialmente na região sul do

país (BRAZIL & PORTO, 2010). São registradas três espécies para região norte e nordeste, cinco para região centro-oeste e sudeste e sete para região sul (BRAZIL & PORTO, 2010).

O grupo ou a espécie *Bonariensis* pode ser identificado pelos seguintes caracteres (MAURY & ACOSTA, 1993):

- a) Hemispermatóforo com lamina distal grande e reta, com uma crista ondulada em sua borda anterior;
- b) Dedo móvel das quelíceras com um dente subdistal;
- c) Tricobotria *Esb1* da pinça situada entre *Eb*, com as quais forma um triângulo;
- d) As quilhas ventrais do segmento caudal V formam um semicírculo na articulação distal;
- e) A glândula dorsal do télson do macho é bem proeminente e situa-se numa depressão em forma de uma cratera (crateriforme);

Dessa maneira, o *Bothriurus bonariensis* (Figura 1), é uma espécie que apresenta 27 tricobotrias nos pedipalpos (pinça com 5 tricobotrias ventrais) e uma apófise espiniforme no lado medial do grampo do macho.

O escorpião *Bothriurus bonariensis* (C. L. Koch, 1842), popularmente conhecido como escorpião preto, apesar de não induzir frequentemente quadros clínicos graves é um escorpião facilmente encontrado no ambiente urbano, atraído principalmente pela oferta de comida (baratas, grilos e outros pequenos artrópodes) e abrigo (entulho, depósitos e similares).

Figura 1 – *Bothriurus bonariensis*



Fonte: Douglas Santos

1.2. Escorpionismo

Todos os escorpiões de importância médica existentes no Brasil pertencem ao gênero *Tityus*, representando 60% da fauna escorpiônica neotropical (LUCAS; JUNIOR, 1992). Porém, espécies de outras famílias também têm causado acidentes de menor gravidade, como algumas espécies das famílias Bothriuridae e Chactidae (BRAZIL & PORTO, 2010).

Segundo dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT-RS), no ano de 2012, o número de acidentes escorpiônicos foi de 495, sendo que 357 foram causados pelo escorpião *B. bonariensis* (NICOLELLA, 2012).

A gravidade dos acidentes escorpiônicos varia conforme a quantidade de veneno injetada, toxicidade, espécie e tamanho do escorpião, local da picada, idade e sensibilidade ao veneno, além de fatores relacionados ao tratamento, como diagnóstico precoce e tempo decorrido desde o acidente até a soroterapia (BRAZIL; PORTO, 2010). Para fins de orientação terapêutica e prognóstico, os acidentes escorpiônicos são classificados conforme o quadro abaixo.

A distribuição do escorpionismo ao longo do ano não ocorre de maneira uniforme, verificando-se um incremento no número de casos nas épocas de calor e chuvas, que coincidem com o período de maior atividade biológica dos escorpiões (BRAZIL; PORTO, 2010).

Quadro 1 - Manifestações clínicas dos quadros de escorpionismo.

Quadro Clínico	Manifestações Locais	Manifestações Sistêmicas
Leve	Dor local	Discreta taquicardia e vômitos ocasionais.
Moderado	Dor intensa	Náuseas, sudorese, vômitos, taquicardia, taquipnéia e hipertensão arterial.
Grave	Dor intensa	Vômitos profusos e frequentes, sudorese profusa, palidez, hipotermia, agitação alternada com sonolência, hipertensão arterial, edema pulmonar agudo, espasmos musculares, podendo haver evolução para insuficiência cardíaca, choque cardiocirculatório.

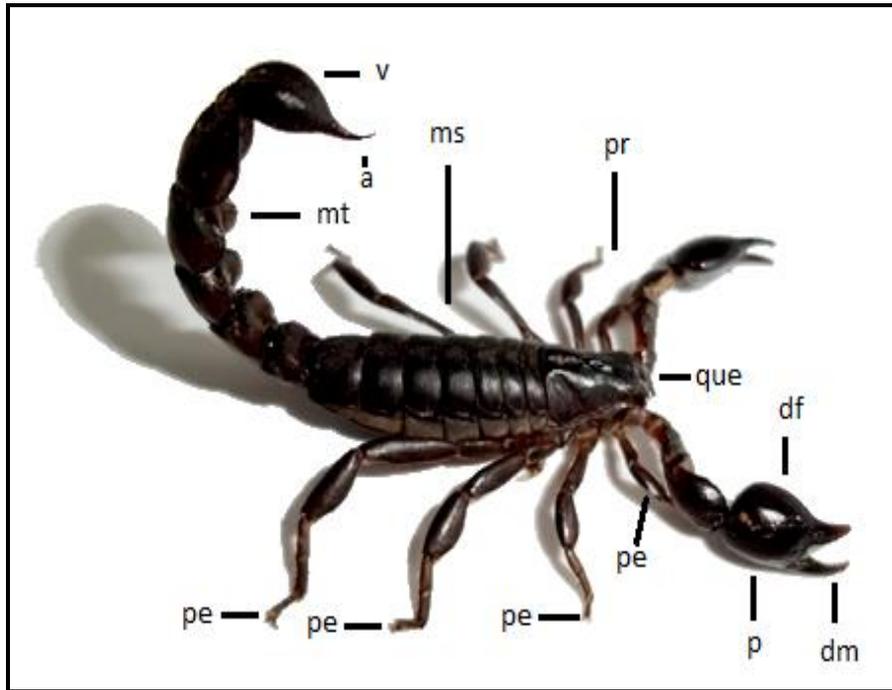
Fonte: adaptado de BRAZIL & PORTO, 2010.

1.3. Características morfológicas dos escorpiões

Os escorpiões são animais que exibem suas características morfofisiológicas praticamente inalteradas e que pouco mudaram ao longo dos milênios. Sua morfologia fundamental, cabeça (prossoma), abdômen (mesosoma) e a cauda (metasoma). Os principais apêndices incluem pedipalpos quelatos (pinças), quelíceras (morfologicamente relacionado com mandíbulas), pectinas (contato sensores químicos), oito pés (dispostos em quatro grupos de dois), e um télson (para entrega veneno em predação e defesa) no ápice da cauda (HELLE, 1990).

Os animais dessa Ordem possuem corpo dividido em duas porções: prossoma e opistossoma. O prossoma, parte anterior, é composto por segmentos fundidos e cobertos por uma carapaça, no qual estão presentes dois pedipalpos grandes com quelas e quatro pares de patas articuladas (Figura 2); geralmente um par de olhos, podendo ter pares adicionais laterais; e queliceras curtas com gnatobases, que servem para triturar o alimento (OLIVEIRA; SCHWARTZ; PIRES, 2012). O opistossoma se divide em mesossoma, com sete segmentos, e metassoma, com cinco segmentos. No mesossoma encontra-se o poro genital, um par de pentes (apêndices sensoriais) e do terceiro ao sexto segmento apresentam, cada um, um par de pulmões foliáceos. O metassoma não possui apêndices, apenas o ânus está localizado no último segmento verdadeiro e é seguido do aparelho picador chamado de télson (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Ao télson, último segmento, prende-se o ferrão na extremidade posterior, que consiste em uma base bulbosa e uma agulha afiada, oca e curva que injeta a peçonha (Figura 3). A peçonha é produzida por um par de glândulas dentro da base do aparelho. A peçonha líquida ejetada do ducto do aguilhão ocorre através de uma contração extremamente violenta na qual a camada muscular que envolve as glândulas forçam essa liberação (RUPPERT *et al.*, 2005).

Figura 2 - Morfologia geral do escorpião.



Legenda: pr = prossoma, ms = messosoma, mt = metassoma, v = vesícula ou télson, a = agulhão, p = pinça, dm =dedo móvel, df = dedo fixo, que = quelíceras, pe = pés. Fonte: LPA

Figura 3 - Télson de *B. bonariensis*



Fonte: Douglas Santos

1.4. Venenos animais

A produção de substâncias tóxicas representa um mecanismo de defesa adquirido ao longo da evolução por muitas espécies, como plantas, vertebrados e invertebrados, caracterizando assim, variabilidade e biodiversidade entre as espécies. O sucesso adaptativo dos escorpiões deve-se, em parte, à habilidade de produzir e inocular uma peçonha eficiente (INCEOGLU *et al.*, 2003). A função dessa peçonha, de paralisar as presas e causar injúria aos agressores, é exercida por uma mescla de componentes bioativos, que são capazes de induzir respostas fisiológicas e farmacológicas em insetos e mamíferos (LORET *et al.*, 1992; EITAN *et al.*, 1990).

O veneno do escorpião consiste em uma mistura complexa que contém neurotoxinas peptídicas, enzimas proteolíticas, mucopolissacarídeos, hialuronidases, fosfolipases, serotonina, inibidores de proteases e liberadores de histaminas, que exercem uma ação local como coadjuvantes no envenenamento, ajudando a aumentar a absorção e disseminação do veneno (COURAUD, *et al.*, 1984; PESSINI *et al.*, 2001; POSSANI *et al.*, 1999). A composição da peçonha de escorpiões pode variar dependendo da área habitada e dos hábitos alimentares (WATT & SIMARD, 1984).

Presume-se que cerca de 100.000 diferentes peptídeos existam em venenos de escorpiões (POSSANI, *et al.*, 2000). No entanto, apenas cerca de 400 peptídeos do veneno de cada espécie, 0,4% do total, foram caracterizadas até então, (ZHIJIAN *et al.*, 2006) e pouco se sabe a nível genômico destes organismos venenosos (MÉNEZ *et al.*, 2006).

As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, os quais ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Para avaliar a composição peptídica do veneno de escorpiões e outros animais peçonhentos faz-se uso de uma importante técnica, empregada principalmente na caracterização bioquímica de proteínas e peptídeos, denominada eletroforese (MARCUSSE *et al.*, 2011). A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) permite a visualização das proteínas presentes na peçonha do escorpião, possibilitando estimar o peso de cada proteína, por comparação com pesos moleculares conhecidos (MARCUSSE *et al.*, 2011).

Atualmente metodologias mais modernas são utilizadas para complementar as informações obtidas da técnica de eletroforese. Entre estas, inclui-se proteômica, que está

relacionada com o conjunto de tecnologias que tem por objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFOR, 2002).

1.5. Aplicações biotecnológicas

O estudo das toxinas de venenos animais vem contribuindo expressivamente ao longo dos anos para a ampliação de conhecimentos a cerca da ação destas toxinas em humanos, sejam estas fisiológica ou farmacologicamente. Estes estudos são importantes, uma vez que ao conhecermos a fundo o mecanismo de ação destas toxinas podemos inferir em uma abordagem científica de modo que esta possa prever e tratar estas intoxicações (MARCUSSEI *et al.*, 2011).

As toxinas presentes em venenos animais podem causar vários danos aos organismos, deixando inúmeras sequelas ou até mesmo a morte. Porém, estas podem ser significativamente importantes como: ferramentas farmacológicas para estudos de sistemas biológicos complexos, soro antiescorpiônico, inseticidas e medicamentos (MARCUSSEI *et al.*, 2011).

As toxinas de escorpiões apresentam uma seletividade rigorosa contra insetos, na qual foram reveladas por meio de testes eletrofisiológicos, toxicidade e ensaios de ligação, o que estimulou sua incorporação em tecnologia de controle de pragas, trazendo benefícios à agricultura (ZLOTKIN *et al.*, 2007)

Venenos animais têm sido amplamente reconhecidos como uma das principais fontes de moléculas biologicamente ativas (PIMENTA & LIMA, 2005). Devido ao seu elevado grau de especificidade alvo, as toxinas de veneno foram cada vez mais utilizadas como ferramentas farmacológicas e, como protótipos para o desenvolvimento de drogas (CALVETE, 2009). Venenos animais são *cocktails*, cada um compreendendo misturas únicas de peptídeos e proteínas naturalmente adaptadas pela seleção natural para atuar em sistemas vitais da presa ou vítima. Toxinas do veneno perturbam a atividade das enzimas críticas, receptores, ou canais de íons, assim atuam sobre os sistemas nervosos, central e periférico, o cardiovascular e os sistemas neuromusculares, coagulação sanguínea e homeostase (CALVETE, 2009). Tal riqueza pode ser útil para a biotecnologia de muitas maneiras, como a prospecção de novos fármacos ou novas entidades químicas - que podem ser usados como compostos terapêuticos - sendo as mais promissoras (PIMENTA & LIMA, 2005).

Vários componentes de venenos já foram utilizados com êxito para pesquisa biomédica e para o desenvolvimento de novos instrumentos de pesquisa, reagentes de diagnóstico e drogas terapêuticas (LEWIS & GARCIA, 2003). No ano de 1970, o captopril, droga anti-hipertensiva foi desenvolvida a partir de peptídeos isolados do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (CUSHMAN & ONDETTI, 1991). Mais recentemente a ω -conotoxina MVIIA (Prialt[®]) um peptídeo de 25 aminoácidos isolado do caracol aquático *Conus magnus*, foi a aprovado pela Agência Regulatória de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) como um analgésico para a tratamento da dor crônica (MILJANICH, 2004), enquanto a exenatida (Byetta[®]), fragmento de 39 aminoácidos agonista do GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon-1) derivado da saliva do lagarto *Heloderma suspectum* (monstro-de-gila) foi aprovado em 2005 para o tratamento da diabetes tipo 2 (MALONE *et al.*, 2009).

Do ponto de vista comercial, bilhões de dólares são gerados anualmente por indústrias que trabalham com proteínas, como as farmacêuticas e alimentícias (SOUSA *et al.*, 1999). O valor dos produtos naturais como fontes de novos medicamentos é realçado pelo fato de que 50% de todos os medicamentos em uso clínico são de origem de produtos naturais (PATERSON & ANDERSON, 2005). Também digno de nota, é o fato de que muitos dos *topselling* dos produtos farmacêuticos em todo o mundo são produtos naturais ou análogos sintéticos e semissintéticos de recursos naturais (MYLES, 2003). Peptídeos antimicrobianos podem ser considerados como a excitação atual da Toxinologia nos recentes anos. Isto é parcialmente o resultado de uma “corrida do ouro” para descobrir novas entidades químicas e suportes para lidar com a resistência bacteriana (BARRET & BARRET, 2003) e parcialmente porque está se tornando amplamente aceito que os peptídeos são uma parte essencial do sistema imunológico inato e, portanto, pode ser potencialmente usada como agente antimicrobiano (LIEN & LOWMAN, 2003).

1.6. Neurotransmissão, canais iônicos, toxinas escorpiônicas

A neurotransmissão é um processo que envolve vários estágios e é regulado por um grande número de moléculas ativas contidas em vesículas que são liberadas em função de resposta a estímulos específicos a partir de diferentes tipos de células neuronais ou afins.

A exocitose regulada é a base da neurotransmissão e inclui a secreção de neurotransmissores a partir de neurônios, o que promove a liberação de neurotransmissores

rápidos, tais como aminoácidos e acetilcolina a partir de sinapses centrais e periféricas, mas também a de polipeptídios relativamente lentos de ação de neurônios centrais e periféricas e células neuroendócrinas (LANGLEY & GRANT, 1997).

Os sinais elétricos são responsáveis por controlar a contração muscular, secreção de hormônios, sensações provenientes do ambiente, processamento de informações no cérebro e sua saída do cérebro para os tecidos periféricos. Os sinais elétricos presentes nas células excitáveis apresentam uma importante influência sobre o metabolismo intracelular, transdução de sinal, expressão gênica, síntese e degradação de proteínas. Em todos estes contextos, os sinais elétricos são transportados por canais iônicos (YU & CATTERALL, 2004).

Uma das propriedades mais características e importantes dos neurônios é a excitabilidade elétrica, pois estas conseguem manter os gradientes iônicos através da membrana superficial. Dessa forma, o fluido intracelular contém uma alta concentração de íons de potássio e uma baixa concentração de íons sódio e cálcio, comparado ao fluido extracelular. As células nervosas e musculares são eletricamente excitáveis devido à presença de canais iônicos sensíveis à voltagem em sua membrana superficial, sendo estes seletivos para Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} . Devido à voltagem da membrana, esses canais podem se abrir ou fechar, possibilitando assim um movimento rápido de íons apropriados em função de seus gradientes de concentração, de forma que correntes iônicas possam passar para dentro ou para fora da célula despolarizando ou hiperpolarizando a membrana. Os canais para sódio, potássio e cálcio são responsáveis pelos sinais elétricos, necessários para a geração e condução do potencial de ação (MARCUSSE *et al.*, 2011).

Os potenciais de ação são conduzidos pelo axônio até o terminal nervoso causando despolarização da terminação pré-sináptica que, por sua vez, induz a abertura transitória de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem. O Ca^{2+} do fluido intersticial flui a favor do gradiente de potencial eletroquímico, para dentro da terminação do axônio. O aumento da concentração interna de Ca^{2+} causa a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática e a liberação de neurotransmissor na fenda sináptica por exocitose. Com isso, o neurotransmissor se difunde através da fenda sináptica e se liga aos receptores específicos, na superfície externa do neurônio seguinte ou de células efetoras tais como as de músculo esquelético (MARCUSSE *et al.*, 2011).

O processo de transmissão de sinais elétricos em células excitáveis só é possível graças à ao envolvimento e a colaboração dos canais para Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} . Devido à sua

importância em muitos aspectos da regulação celular e na transdução de sinal, os canais iônicos dependentes da voltagem são os alvos moleculares para uma vasta gama de toxinas biológicas potentes, incluindo as toxinas modificadoras que alteram a cinética e a dependência de voltagem da sua ativação e inativação (CATTERALL *et al.*, 2007).

O estudo das toxinas naturais tem recebido grande ênfase nos últimos anos, devido à ampla capacidade biotecnológica que estas toxinas podem apresentar. O avanço científico-tecnológico tem contribuído substancialmente, uma vez que estas podem auxiliar farmacologistas, bioquímicos e fisiologistas a compreenderem desde o entendimento molecular da excitabilidade elétrica, até sua interação com canais iônicos específicos. Estudos realizados com toxinas de escorpiões tem demonstrado que os efeitos induzidos pela peçonha são devidos a ações das toxinas em sítios específicos dos canais para sódio, com subsequente despolarização das células excitáveis do organismo (MARCUSSE *et al.*, 2011).

Canais iônicos são proteínas responsáveis pela formação de poros na membrana, sendo estas reguladas por ligantes ou por alterações no potencial de ação através da membrana. Animais e plantas de muitos filos têm como alvo esses canais com neurotoxinas potentes, que paralisam a presa, alterando sinalização elétrica (CATTERALL *et al.*, 2007).

As proteínas de toxinas escorpiônicas mais estudadas são aquelas cuja função reconhece canais iônicos específicos em membranas excitáveis. Na literatura são descritas quatro diferentes famílias que interagem com canais iônicos específicos, são elas: canais para Na^+ , canais para K^+ , canais para Cl^- e canais para Ca^{2+} (BECERRIL *et al.*; 1997).

O Glutamato é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), sendo o mais comum em mamíferos. Ao longo dos anos foram realizados inúmeros estudos para avaliar a evidência de que o glutamato age como um neurotransmissor em junção neuromuscular de insetos. Essa evidência foi convincente uma vez que ao avaliar a identidade do glutamato, foi demonstrado que este incide naturalmente como receptor neuromuscular, sendo liberado a partir dos terminais nervosos, o que relaciona sua semelhança com a acetilcolina na junção neuromuscular de mamíferos em relação à farmacologia pré-sináptica.(FONNUN, 1984). Desde então, a junção neuromuscular de insetos tem sido extensivamente estudada em termos de natureza dos receptores e canais iônicos envolvidos, assim como na modulação das respostas contrácteis dos músculos básicos ativados. (OSBORNE, 1996).

O GABA (ácido γ -aminobutírico) é um neurotransmissor inibitório predominante no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (DELOREY *et al.*; 1993), atuando como

inibidor neurossináptico, por ligar-se a receptores específicos. Estudos realizados com o motoneurônio coxal de baratas demonstrou que o GABA ativa canais de Cloreto (OSBORNE, 1996), e essa ação pode ocorrer em nível pré ou pós-sináptico, determinando efeitos inibitórios.

Preparações sinápticas em insetos oferecem excelentes modelos experimentais para estudos de múltiplos transmissores e suas ações conjuntas nos cruzamentos nervo-musculares identificadas de forma exclusiva (O'SHEA *et al.* 1985). Em nosso desenho experimental, optamos pelo uso da barata (*Nauphoeta cinerea*). Estes organismos oferecem as vantagens de neurônios acessíveis e prontamente identificáveis (O'SHEA *et al.*, 1985).

Preparações de culturas primárias de hipocampo de ratos oferecem um ótimo modelo para o estudo de drogas e compostos de origem animal e vegetal sobre o sistema nervoso central de mamíferos (Karangwa *et al.*, 2007). Essas preparações são extremamente sensíveis a pequenas alterações na composição do meio fisiológico, facilitando o estudo do mecanismo de ação de venenos animais sobre as regiões pré e pós-sinápticas dos neurônios (Karangwa *et al.*, 2007).

B. bonariensis é um aracnídeo pouco estudado e de certa forma negligenciado por não apresentar acidentes com quadros clínicos graves do ponto de vista de interesse médico. Nesse trabalho, pioneiro com esta espécie de escorpião, buscou caracterizar o efeito do veneno de *B. bonariensis* em preparações neuromusculares de *Nauphoeta cinerea in vivo* e em culturas primárias de hipocampo de rato *in vitro*, bem como a caracterização da fração peptídeo proteica do veneno. Desse modo, o uso desses modelos experimentais é de suma importância, uma vez que por meio deles poderemos descobrir diferentes aspectos do veneno que possam ser importantes tanto do ponto de vista biológico, como biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o efeito biológico do veneno do escorpião *Bothriurus bonariensis* em preparações neurobiológicas de inseto e mamífero.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar a extração do veneno total por eletroestimulação;
- Caracterizar por meio de teste eletrofisiológico o efeito do veneno de *B. bonariensis* em preparação neuromusculares de baratas (*Nauphoeta cinerea*) *in vivo*.
- Caracterizar o influxo de cálcio na presença do veneno de *B. bonariensis* em preparações de cultura primária de hipocampo de rato *in vitro*.

3. MANUSCRITO

Todos os resultados, bem como os itens Materiais e Métodos, Discussão e parte das Referências Bibliográficas que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Este manuscrito está disposto na forma na qual deverá ser submetido para o periódico **Toxicon** (ISSN: 0041-0101) e será intitulado como “The biological activity of *Bothriurus bonariensis* venom at insect and mammal nervous system”.

The biological activity of *Bothriurus bonariensis* venom at insect and mammal nervous system

Douglas Silva dos Santos¹, Evelise Leis Carvalho¹, Jeferson Carmargo de Lima¹, Marines de Avila Heberle², Simone Denise Salamoni³, Ricardo Vaz Breda³, Michele Domingues³, Denis Reis de Assis³, Juliano Tomazzoni Boldo¹, Jaderson Costa da Costa³, Cháriston André Dal Belo², Paulo Marcos Pinto^{1,*}.

¹LPA, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Av. Antônio Trilha 1847, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil.

²LANETOX, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Av. Antônio Trilha 1847, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil.

³INSCER, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Animal venoms have been widely recognized as a major source of biologically active molecules. *Bothriurus bonariensis*, popularly known in southern Brazil as black scorpion, is an animal involved in a great number of accidents, in which biological activity lacks of scientific survey. Here we reported the first attempt to investigate the toxinological profile of *B. bonariensis* venom (BBV). Crude and TCA/Acetone precipitated venom samples were analyzed by SDS-PAGE in order to assess the venom protein profile. Insect and mammal neurobiological models were used to characterize the venom activity. In *in vivo* cockroach nerve-muscle preparations, BBV induced neuromuscular blockade, with the increase of the rise time of muscle twitches. In rat hippocampal primary cultures, BBV induced a massive increase of Ca⁺⁺ influx. The neuromuscular activity in insects and the disturbance of calcium homeostasis in central nervous system of mammals revealed the presence of bioactive compounds in BBV. Despite the absence of lethality in humans, the biological activity survey of *Bothriurus bonariensis* venom unveiled the insecticidal and therapeutical potential of this poison.

Key words: bioactive molecular, poison, neuromuscular blockade, calcium influx.

1. Introduction

The arthropods of the order Scorpiones (scorpions) are well distributed in all of the continents, except the poles (Soleglad and Fet, 2003). The remarkable distribution of these animals is, at least in part, a result of the development of their chemical defense mechanisms (Palma, 2006). The development of venoms and the corresponding injection apparatus among the scorpions represent evolutionary attributes that contributed to adaptation of these animals to the many different terrestrial environments (Palma, 2006). Although the primary purpose of arthropod venoms is to paralyze their natural prey (insects), scorpions are one of the animals most commonly implicated in human envenomation through America, Asia and Africa (de Roodt et al., 2003). However, the sting of few species can produce severe envenomation: only about 25 out of the almost 1,500 species described around the world are dangerous to humans. Generally, they do not cause lethal effects, inducing only inflammatory and/or immunological reactions in the victims of their stings (de Roodt et al., 2003).

Scorpion venoms are complex chemical mixtures containing a variety of biologically active components, such as proteic and non-proteic toxins, enzymes, nucleotides, lipids, biogenic amines and other unknown substances (de Lima et al., 2007). Thus, despite their obvious clinical interest, the specificity of certain toxins present in the venom to excitable tissues (e.g. nerves and muscles), renders these poisons a wealth source of compounds with biotechnological interest (Gurevitz et al., 2007).

The scorpion *Bothriurus bonariensis* (C. L. Koch, 1842), popularly known as “black scorpion” is commonly found in southern Brazil (Brazil and Porto, 2010). Despite patients empoisoned by *B. bonariensis* rarely suffer severe symptoms, there is a great number of accidents reported every year (Nicolella, 2012). However, as far as of our knowledge, there is no previous work demonstrating the biological activity of *B. bonariensis* venom at laboratory conditions. Hence, the aim of this work was to carry out a preliminary investigation of the

biochemistry and bioactivity of *B. bonariensis* venom in insect and mammal nerve preparations.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

All chemicals and reagents used were of the high purity and were obtained from Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen and BioRad.

2.2. Experimental Animals

Adult male *Nauphoeta cinerea* cockroaches (3-4 month after adult molt) were reared at laboratory conditions of controlled temperature (22-25°C) on a 12 h:12 h L:D cycle. To estimate the actual doses of different compounds to be assayed *in vivo*, two hundred animals were previously weighted, yielding a final body weight of 0.5 ± 0.03 g. All cockroaches were provided with water and dog chow *ad libitum*.

2.3. Scorpions collection, venom extraction and SDS-PAGE

B. bonariensis specimens of both sex were collected in the region of São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil. Venom was obtained by electrical stimuli of the scorpions' telson with an electrical pulse of 35 V for 1-ms at a frequency of 10 Hz. After collection, venom was stored at -20°C. Venoms samples were precipitated in Trichloroacetic acid 20% diluted in acetone (TCA/Acetone). After TCA/Acetone precipitation, proteins samples were quantified using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) and then mixed with SDS loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.2 M Tris, pH 6.8, dithiothreitol (DTT) ou β -mercaptoethanol (BME) and loaded onto denaturant sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (12% SDS-PAGE) as described by Laemmli (1970). Protein molecular

mass markers of 20-250 kDa were included in all runs. After electrophoresis, gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R250.

2.4. Primary hippocampal culture

All animal care and experimental procedures were in accordance with the guidelines of the National Counselor to Animal Experimentation-CONSEA/PUCRS-CEUA under number 13/00340. Primary hippocampal cultures were prepared as described previously (Gan et al., 2011). Briefly, 1- to 2-day-old Wistar rats were killed by cervical dislocation and decapitated. The hippocampi were removed and triturated, and the resulting cells were plated at a density of 3×10^5 cells.mL⁻¹ onto 13 mm poly-L-lysine coated coverslips. Cultures were incubated in culture medium consisting of Neurobasal-A Medium (Invitrogen, UK) supplemented with 2% (v/v) B-27 (Invitrogen, UK) and 2 mM L-glutamine and maintained in a humidified atmosphere at 37°C/5% CO₂ for 13–16 days *in vitro* (DIV). After 5 DIV, cytosine-D-arabinofuranoside (10 mM) was added to inhibit glial cell proliferation. Both electrophysiology and Ca²⁺ imaging experiments were performed on cells taken from at least three separate cultures obtained from different rats.

2.5. Biological assays

2.5.1. Ca²⁺ imaging of hippocampal cells

All imaging experiments were performed on a digital epifluorescence imaging system (WinFluor, J. Dempster, University of Strathclyde) mounted on a Nikon TE300 microscope using a 20X objective. Hippocampal cultures (DIV 10–14) were loaded with Fluo-4 AM (5 mM, 45–60 min, room temperature) prior to experiments. Ratiometric images (340/380 nm) were obtained from the neurons every 115 ms. Experiments were performed on cultures continually perfused (1–2 mL.min⁻¹) with PBS at room temperature. All compounds

investigated were added via the perfusate. Astrocytes were identified based on their morphological characteristics and their lack of response to high extracellular potassium (25 mM). Data were calculated as changes in fluorescence ratio and expressed as the $\Delta F/F_0$.

2.5.2. *In vivo* cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation

To analyze peripheral neurotoxicity, were used the *in vivo* cockroach metathoracic-coxal adductor muscle preparation (Martinelli et al., 2013). Animals were immobilized by chilling and mounted, ventral side up, in elucite holder covered with 1cm soft rubber that restrained the body and provided a platform to which the metathoracic coxae could be firmly attached using entomologic needles. The left leg was then tied in the medial joint with a dentistry suture line connected to a 1g force transducer (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil). The transducer was mounted in a manipulator which allowed adjustment of muscle length. The exoskeleton was removed from over the appropriate thoracic ganglion. Nerve 5, which includes the motor axon to the muscle, was exposed and a bipolar electrode inserted to provide electrical stimuli. The nerve was stimulated at 0.5Hz/5ms, with twice the threshold during 120min. The nerve was covered with mineral oil to prevent dryness. Twitch tension was recorded, digitalized and retrieved using a computer based software AQCAD (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil). Data were further analyzed using the software ANCAD (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil).

2.6. *Statistical analysis*

All data are expressed as mean \pm SEM. Data were compared by paired or unpaired ANOVA, or Student's t-tests as appropriate. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. SDS-PAGE of *Bothriurus bonariensis* venom

In order to identify the protein fraction of *Bothriurus bonariensis* venom (BBV), SDS-PAGE was carried out (Fig. 1). Crude BBV shows one single protein band close to 50 kDa (Fig. 1A), probably due to presence of non-proteic molecules in BBV. To improve gel resolution and to remove non-proteic molecules, venom samples were subjected to TCA/Acetone precipitation, as showed in Fig. 1B. SDS-PAGE of the precipitated samples showed at least 7 proteins bands, of which three proteins ranged between 25-37 kDa and four proteins ranged between 75-250 kDa.

3.2. Neuromuscular blockade induced by BBV at *in vivo* cockroach nerve-muscle preparation

In order to analyze the effect of *B. bonariensis* venom (BBV) on cockroach peripheral nervous system, we used the *in vivo* metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation. The administration of insect saline alone did not interfere with neuromuscular responses during 120min recordings (n=6) (Fig. 2). The injection of BBV (32, 64 and 128 μ g/g of animal weight) induced a dose and time-dependent neuromuscular blockade during 120min recordings. When the lowest dose (32 μ g/g animal weight) of BBV was assayed, there was 50 \pm 9% blockade of twitch tension in 70min (n=6, p <0.05, ANOVA/MANOVA) and 70 \pm 2% in 120min recordings (Fig 2). The injection of the 64 μ g/g of animal weight concentration of BBV induced 50 \pm 5% blockade in 70min and 70 \pm 11% inhibition of the twitches in 120min recordings (n=6, p <0.05, ANOVA) (Fig.2). However, when the highest dose (128 μ g/g of animal weight) was assayed, there was only 40 \pm 3% inhibition of the twitches in 120 min recordings. All concentrations assayed caused spontaneous twitches after 60min recordings (Fig. 2).

The measurement of time to peak and fall time of the twitches revealed a tendency of increase in the rise time in all concentrations assayed that was significant to BBV (128 μ g/g) (n=6, p<0.05)/ Fig. 3B. The total area of each twitch is calculated by taking the integral of the trace, given an absolute number. Thus, when the area of twitches was analyzed the control value was (81407). The analysis of the area of venom-treated showed a tendency of decrease for the dose of (32 μ g/g, 80156, p>0.05) and an increase for the other doses that was maximum to (64 μ g/g, p>0.05).

3.3. Increase of calcium influx by BBV in hippocampal cells

Using calcium images to monitor intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$), BBV (4 μ g/ml) induced a pronounced rise in neuronal $[Ca^{2+}]$ (250 \pm 9% peak increase, n=3, P<0.001, Fig. 4 B and C). The application of high potassium (15mM) did not change significantly the increase of fluorescence induced by the previous venom input (Fig. 4C). After continuous washing of the venom, a reversal effect was observed, returning fluorescence to the basal level after 10min (Fig. 4C).

4. Discussion

The aim of the present work was to investigate the biological activity induced by *Bothriurus bonariensis* venom (BBV) in insect and mammal models. The results showed that BBV interacted with the cockroach neuromuscular junction to produce muscle paralysis and increased calcium influx in rat hippocampal cells. Several proteins of different molecular weight are present in the venom, as demonstrated by SDS-PAGE analysis. The aspects related to the biological activity and its relationship regarding the venom composition is discussed herein.

It is generally known that scorpion venom is a complex mixture composed of a wide array of substances. It contains mucopolysaccharides, hyaluronidase, phospholipase, low relative molecular mass molecules like serotonin and histamine, protease inhibitors, histamine releasers and polypeptidyl compounds. Scorpion venoms are a particularly rich source of small, mainly neurotoxic proteins or peptides interacting specifically with various ionic channels in excitable membranes (Goudet, et al., 2002). Several neurotoxic peptides have been isolated and characterized from the venom of different species of scorpions (Shwartz et al., 2012). Their molecular weight varies from 4 kDa as in the venom of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* (Martin et al., 2004) to approximately 45 kDa in *Tityus stigmurus* venom (Batista et al., 2007) and up to 200 kDa in the Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom (Çalışkan et al., 2009). In the BBV it was found proteins ranging from 25 to 37 kDa as well as high molecular weight representatives ranging from 75 to 250 kDa. Scorpion venom peptides of varied molecular weight (e.g. 36-46 kDa) showed strong proteolytic activity (Haldar et al., 2010). In our experimental conditions, the proteolytic activity was not evaluated. Scorpion insecticidal neurotoxins generally are up to 9 kDa peptides (Shwartz et al., 2012). These toxins present high content of disulfide bonds, which increase their *in vivo* stability and resistance to proteases (Shwartz et al., 2012). Since scorpion venom proteases are also able to modulate calcium homeostasis in the nervous system (Sabatier et al., 1996), it is possible that, at least in part, the biological activity of BBV relies on these proteins subtypes (Shwartz et al., 2012). Notwithstanding, the venom of the Indian scorpion *Heterometrus bengalensis* presents a high molecular weight neurotoxin (72 kDa) that was named Bengalin (Haldar et al., 2010). Bengalin, induces neuromuscular paralysis in rat diaphragm preparations. In experimental condition, several marked bands were observed above 75 kDa, also suggesting the presence of neurotoxic active peptides in these set

of bands. A further bioguided isolation and identification of BBV proteins will test this hypothesis.

The venom of *B. bonariensis* also induced *in vivo* neuromuscular paralysis of cockroach nerve muscle preparations. The neuromuscular paralysis induced by scorpion venoms is generally a result of the interaction of neurotoxic peptides with ion channels and/or receptors in the neuromuscular system (Nicholson, 2007). The analysis of the rise time of the twitches in presence of BBV revealed a significant increase in the time of rising. At nerve-muscle preparations, the opening of sodium channels directly influence rise time (Davies et al., 2007). During a depolarization the permeability for Na^+ rises rapidly and then decays as the channel converts to inactivated, non-conducting states in which it remains until the membrane is repolarized and the channel deactivates (Catterall, 2000). A number of arthropod neurotoxins targeting insect Na^+ channels can block the sodium conductance or slow channel inactivation, depending of the main binding area, validating them as potential insecticide targets (Rodrigues de La Vega and Possani, 2005). Do date, the scorpion sodium channel modulators (NaScTxs) are long-chain peptides with 55–76 amino acid residues and cross-linked by three or four disulfide bridges. The NaScTxs can be classified in two families, α and β , according to the mode of action on Na^+ channels. The α -NaScTxs bind to site 3 of domain IV, slowing the inactivation of the channel. According to structural reasons and the specificity of interaction with mammal or insect Na^+ channels, they were divided into three subgroups: (a) classical α -toxins are highly toxic to mammals, such as AaHII, from *Androctonus australis* Hector and LqhII from *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; (b) anti-insect α -toxins, which are highly toxic to insects; (c) α -like toxins, which act on both mammal and insect Na^+ channels (Shwartz et al., 2012). According to our data, there was no significant influence of BBV on decay time of twitches in the cockroach nerve-muscle preparations. In our experimental conditions, the increase of the time to rise and the decrease

in the amplitude of the muscle twitches suggest a direct interference of BBV on sodium conductance at cockroach neuromuscular junctions. A further site direct pharmacology of venom will test this hypothesis.

It was also observed that BBV induce a massive rise of Ca^{2+} at neuronal cells from hippocampus. At hippocampal neurons, calcium modulation is organized by the activation of n-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors by the release of the neurotransmitter glutamate (GLU) (Andrade and Rossi, 2010). The physiological process indeed starts with the membrane depolarization induced by the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors that are activated by GLU, increasing the sodium influx (Davies et al., 2007). In mammals, reptiles, insects, and other animal taxa, the depolarization of the external membrane of cardiac and skeletal muscle cells activates voltage-dependent Ca^{2+} channels, which in turn activate Ca^{2+} release channel/ryanodine receptors (RyRs) of the sarcoplasmic reticulum (SR) to elevate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and initiate myofilament contraction. The release of Ca^{2+} by RyRs is so abrupt and massive that an intrinsic inactivation process is safely placed to avoid saturating cytosolic compartments with Ca^{2+} and subsequent contractile paralysis (Shwartz et al., 2012).

After its action, GLU is removed from the synaptic cleft by high-affinity transporters that are embedded in the membrane of neuronal and glial cells and are typically dependent on the Na^+ gradient (Shwartz et al., 2012). There are no Ca^{2+} channel insect-selective toxins described to scorpions to date. Therefore, GLU receptors of insect neuromuscular junction are similar to the mammalian AMPA/kainate subtype. Thus, it is possible that the increase in calcium influx of hippocampal cells can be a direct modulation of glutamate release, leading to membrane depolarization by increasing Na^+ influx and calcium concentration rise (Nencioni et al., 2004). Recently, several studies have demonstrated the effect of some α - and β - Na^+ channel scorpion toxins on the glutamate release. Some neurotoxins from *Tityus*

serrulatus scorpion has been shown to evoke glutamate release in an incremental, dose - dependent manner at mammal central nervous system (Massenssini et al., 1998).

5. Conclusions

In this study, we described the biological activity of *B. bonariensis* venom in insect and mammal models. The SDS-PAGE of venom showed peptides of different molecular weights, which resembled the protein profile of other neurotoxic scorpion toxins. The neuromuscular blockade induced by the venom in cockroaches revealed the presence of insecticidal toxins. The prolonging of rise time of twitches in cockroaches and the massive influx of calcium at rat hippocampal cells, suggests a direct influence of the venom neuropeptides at Na⁺/Ca⁺⁺ ionic channels. This first attempt for *Bothriurus bonariensis* venom activity also unveils its inherent biotechnological potential. Further characterization concerning the neurotoxicological potential of the *B. bonariensis* venom is needed. Future efforts include the identification of the molecules responsible for the effects described in this work, as well as investigating the venom pharmacology, with emphasis in the active sites description. In addition, proteomic and/or peptidomic approaches will be used to deeply characterize the bioactive molecules present in the protein fraction of the *B. bonariensis* venom.

6. Acknowledgements

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Edital Toxinologia 063/2010, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support. D. S. dos Santos was granted by CAPES fellowship. We also would like to thank Dr. Tiago Gomes dos Santos, MSc Suelen da Silva Alves and Leonan

Guerra by technical assistance with the scorpions capture and MSc Ana Paula Zemolin for assistance in the biochemical analysis. A special thank to Dr. Célia Regina Carlini, for donation of reagents and the sharing of equipments used in this work.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests related to this work.

7. References

- Andrade, A.L and Rossi, D.J., 2010. Simulated ischaemia induces Ca²⁺-independent glutamatergic vesicle release through actin filament depolymerization in area CA1 of the hippocampus. *Journal of Physiology* 588, 1449-1514.
- Brazil, T.K., Porto, T.J., 2010. Os escorpiões. Salvador: Editora da Universidade Federal da Bahia.
- Çalışkan, F., Sivas, H., Şahin, Y. A preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkish black scorpion) venom. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2009, Vol.34, 148-153.
- Catterall, W. A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13- 25.
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59, 151-162.
- De Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Pimenta, A.M., Santos, D.M., Borges, M.H., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Oliveira, L.C., Stankiewicz, M., Pelhate, M., 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol* 146, 264-279.
- De Roodt A.R., Garcia SI., Salomon O.D., Segre, L., Dolab, J.A., Funes, R.F., Titto, H.E., 2003. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon* 41, 971-977.
- Gan, J., Greenwood, S.M., Cobb, S.R., Bushell, T.J., 2011. Indirect modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus by activation of proteinase-activated receptor-2. *British Journal of Pharmacology* 163, 984-994.

- Goudet, C., Chi, C.W., Tytgat, J., 2002. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239-1258.
- Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, M.T., Atankiewicz, M., Stuhner, W., Dong, K.E., Gordon D., 2007. The insecticidal potential of scorpion β -toxins. *Toxicon* 49, 473-489.
- Haldar, S., Das Gupta, S., Gomes, A., Giri, B., Das Gupta, S.C., Biswas, A., Mishra, R., Gomes, A., 2009. A High Molecular Weight Protein Bengalin from the Indian Black Scorpion (*Heterometrus bengalensis* C.L. Koch) Venom Having Antiosteoporosis Activity in Female Albino Rats. *Toxicon* 55, 455-461.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Martin BM, Ramirez AN, Gurrola GB, Nobile M, Prestipino G, Possani LD. (2004) Novel K(+)-channel-blocking toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Biochem J.* 378, 745-52.
- Martinelli, A.H., Kappaun, K., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M.S., Piovesan, A.R., Staniscuaski, F., Demartin, D.R., Verli, H., Dal Belo, C.A., Almeida, C.G., Follmer, C., Carlini, C.R., Pasquali, G., 2013. Structure-function studies on Jaburetox, a recombinant insecticidal and antifungal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects* 1840, 935-944.
- Massensini, A.R., Moraes-Santos, T., Gomez, M.V., Romano-Silva, M.A., 1998. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. *Neuropharmacology* 37, 289-297.
- Nencioni, A.L.A., Lebrun, I., Dorce, V.A.C. 2004. Dantrolene protects hippocampal cells from damage induced by TsTX, an α -scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 44 179–183.
- Nicholson, G.M., 2007. Fighting the global pest problem: Preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49, 413-422.
- Nicolella, A., Mitidieri, E.F., Lessa, C.A.S., 2014. Relatório anual 2011, Dados de atendimento. Available in: <<http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/completo2012>>. Accessed on: February 4, 2014.
- Palma, M.S., 2006. Insect venom peptides. In: Abba J. Kastin (Ed.). *The Handbook of Biologically Active Peptides*. United States of America: Elsevier, 409-416.

- Rodríguez De La Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion peptides specific for Na⁺ channels: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 46, 831-844.
- Schwartz, E.F., Mourão, C.B.F., Moreira, K.G., Camargos, T.S., Mortari, M.R., 2012. Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides. *Peptide Science* 98, 385-405.
- Soleglad, M.E. and Fet, V., 2003. High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). *Escorpius* 11, 1-175.

Figure legends

Figure 1. Analysis of venom extracted from *Bothriurus bonariensis* by 12% SDS-PAGE. (A) crude venom sample (60 µg) and (B) precipitated venom sample (30 µg). Protein molecular mass markers were included (M).

Figure 2. Neuromuscular blockade induced by *Bothriurus bonariensis* venom (BBV) at *in vivo* cockroach coxal-adductor methatoracic nerve-muscle preparation. Panel (A) shows the time-dependent effect induced by BBV (32, 64 and 128µg/g of animal weight). On (B), the representative recordings of the effect of BBV. Note the time-dependent inhibition of *in vivo* cockroach nerve-muscle twitches (*p<0.05 related to saline control).

Figure 3. Analysis of different parameters related to the action of *Bothriurus bonariensis* venom (BBV) at *in vivo* cockroach coxal-adductor methatoracic nerve-muscle preparation. Panel (A) shows the time to 50% blockage. Panel (B) the graph of rise and decay time. Panel (C) shows the kinetic of time of BBV (64 µg/g of animal weight) action on amplitude of muscle twitches. On (A) note that only the doses of 32 and 64 µg/g of animal weight of BBV induced 50% blockage. On (B), the rise time was significantly increased at 128µg/g of animal weight of BBV. *p<0.05 related to saline control. (●) Saline Control ; (■) BBV after 60min; (▼) BBV after 120min.

Figure 4. Increase of intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) in cultured hippocampal cells of neonate rats by *Bothriurus bonariensis* venom (BBV). (A) and (B) ratiometric images (350nm/390nm excitation, 515 nm emission) of Fluo-4/AM-loaded cultured rat neurons during base-line and 4µg/ml BBV application, respectively. On (C), the graph of $\Delta F/F_0$ showing the increase in Fluo-4 fluorescence induced by application of BBV (4µg/ml). Note the reversal of BBV venom activity by washout during 10min. High K^+ (15mM) application did not increase fluorescence significantly.

Figure 1

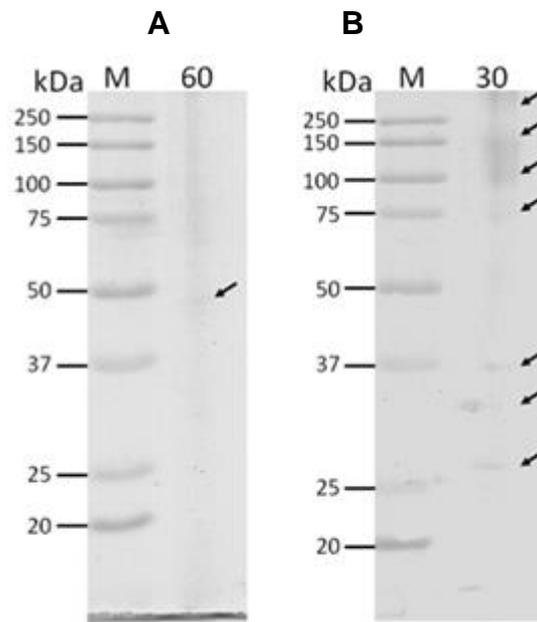


Figure 2

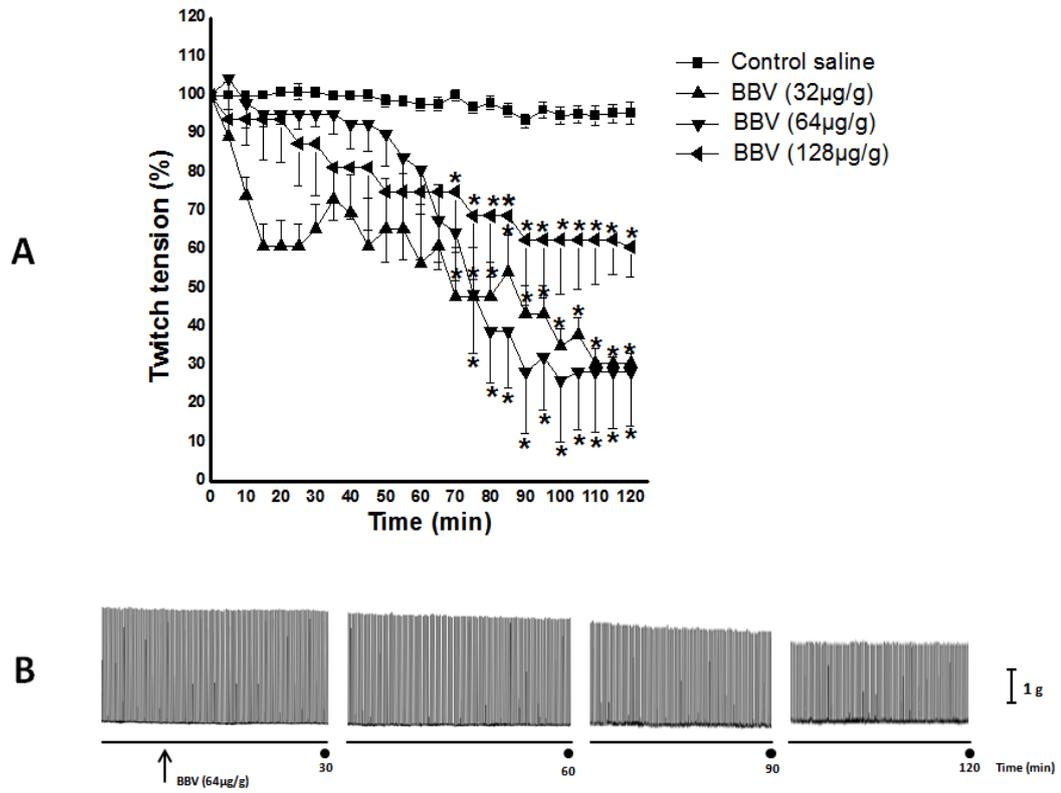


Figure 3

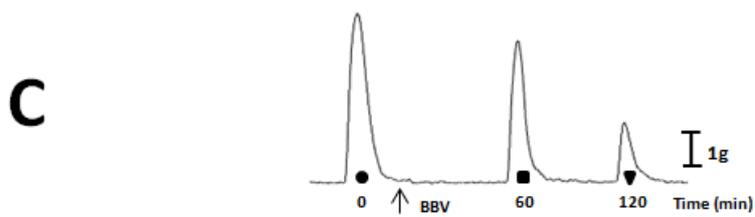
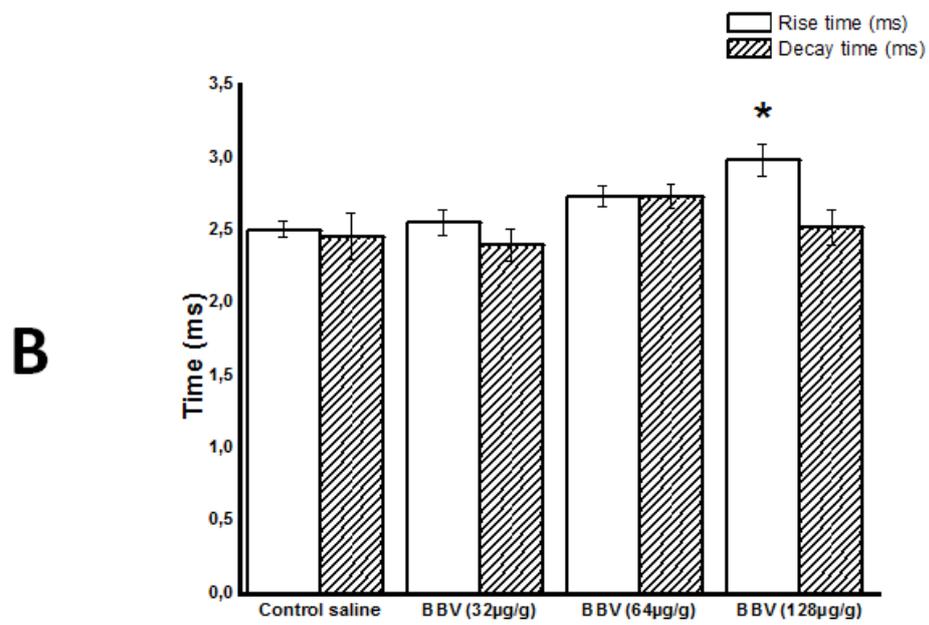
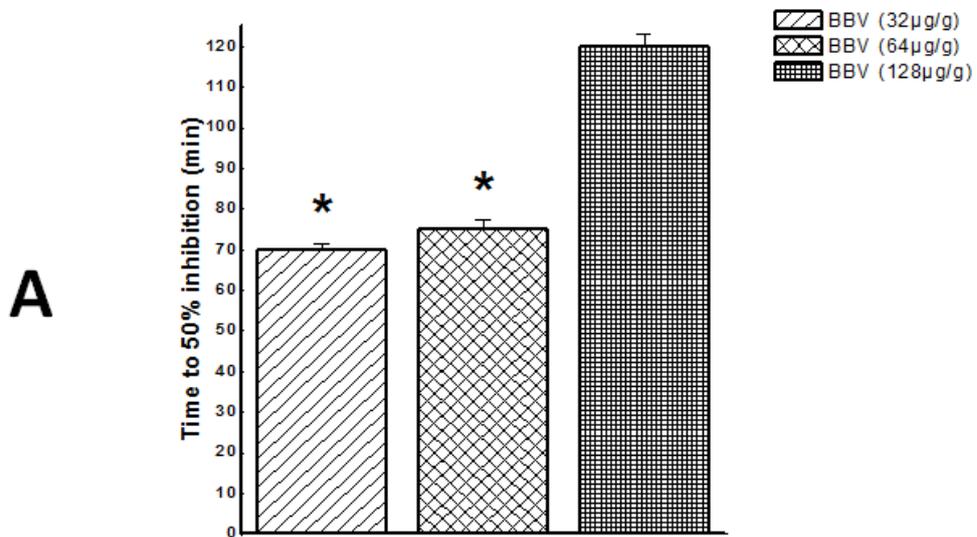
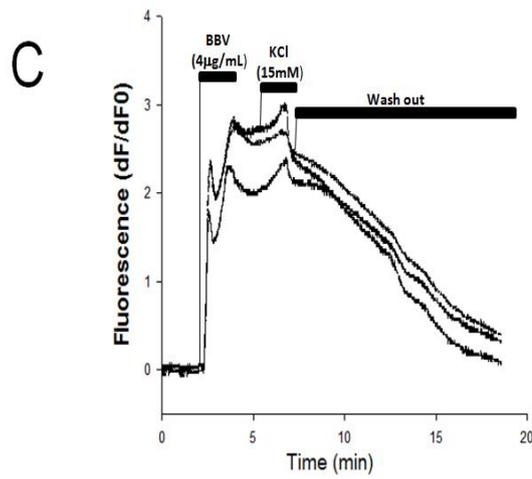
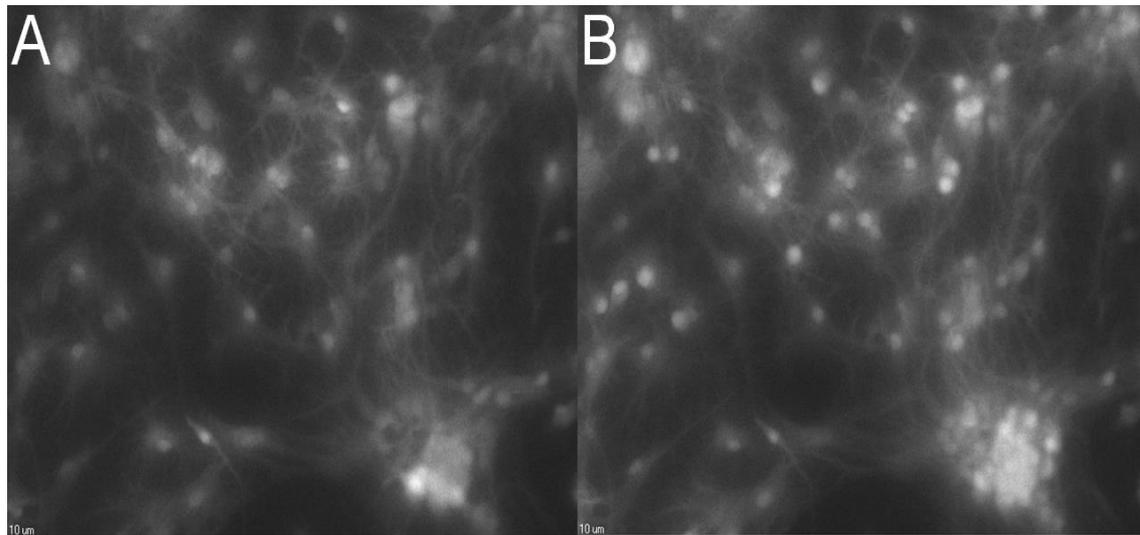


Figure 4



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados obtidos no presente estudo podem-se delinear as seguintes considerações:

- Sobre a extração do veneno por eletroestimulação, a voltagem no qual foi induzida a secreção do veneno, foi padronizada para 35 V.
- Na análise da fração proteica por SDS-PAGE foram detectadas sete bandas proteicas e a precipitação das proteínas por TCA se mostra essencial para um gel com resolução de boa qualidade.
- Os dados gerados no presente trabalho não nos permitem estimar os números de proteínas, visto que a análise ficou restrita a SDS-PAGE. Contudo etapas futuras com estudos mais aprofundados, como análise em eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, incluindo outras técnicas proteômicas, serão realizadas.
- O aumento do tônus muscular, caracterizado por uma contratura, sugere que o veneno possa estar atuando em canais iônicos presentes na região de placa motora do inseto.
- O veneno induziu um aumento massivo de Ca^{2+} em células neuronais do hipocampo. É possível que o aumento no influxo de cálcio de células do hipocampo possa ser uma modulação direta da liberação de glutamato, conduzindo à despolarização da membrana por influxo de Na^+ crescente e aumento da concentração de cálcio. Portanto, o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno em baratas, revelou a presença de toxinas inseticidas.
- Este trabalho, pioneiro com a espécie *B. bonariensis*, contribui para caracterizar o efeito do veneno de *B. bonariensis* em preparações neuromusculares de *Nauphoeta cinerea in vivo* e em culturas primárias de hipocampo de rato *in vitro*, bem como a caracterização da fração peptídeo proteica do veneno.

5. PERSPECTIVAS

Com base na etapa atual do trabalho e com o claro potencial de aumento do conhecimento acerca das características do veneno de *B. bonariensis* temos como perspectivas:

- Realizar análise proteômica e peptidômica da fração proteica do veneno do escorpião *B. bonariensis*, como eletroforese bidimensional e MALDI-TOF MS/MS, bem como, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI MS/MS), em busca de expandir os dados sobre a peçonha desta espécie.
- Este trabalho apresenta resultados preliminares sobre o efeito do veneno de *B. bonariensis*. Estudos aprofundados sobre a caracterização do potencial neurotoxicológico se faz necessário para podermos identificar as toxinas responsáveis pelas atividades descritas, bem como, investigar a farmacologia do veneno com ênfase na identificação dos sítios ativos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** 402, p. 198-207, 2003.
- BARRET, C.T., BARRET, J.F. Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems. **Current Opinion in Biotechnology** 6, p. 621-626, 2003.
- BRAZIL, T.K., PORTO, T.J. Os escorpiões. Salvador: **Editora da Universidade Federal da Bahia**, 2010.
- BECERRIL, B., MARANGONI, S., POSSANI, L.D. Toxins and genes isolated from Scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon** 35, p. 821-835, 1997.
- BRUSCA, R. C., BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2ª ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2007.
- CALVETE, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of Proteomics** 72, p. 121-126, 2009.
- CATTERAL, W. A., CESTELE, S., YAROVOY-Y, V., YU, F. H., KONOKI, K., SCHEUER, T. Voltage-gated íon channels and gating modifier toxins. **Toxicon** 49, p. 124-141, 2007.
- COURAUD, F., JOVER.E., DUBOIS, J.M., ROCHAT, H. Two types of toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. **Toxicon** 20, p. 9-16, 1984.
- CUSHMAN, D.W., ONDETTI, M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension** 17, p. 589-592, 1991.
- CRUZ, E. F. S. 1994. Biologia dos Escorpiões. Em: Barraviera, B. **Venenos Animais - Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas Ltda. p. 135-150.
- DELOREY, T. M.; KISSIN, I., BROWN, P., BROWN, G.B. Barbiturate-benzodiazepine interactions at the gamma-aminobutyric acid A receptor in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. **Anesth Analg**. 77(3), p.598-605, 1993.
- EITAN, M., FOWLER, E., HERRMANN R., DURVAL, A., PELHATE, M., ZLOTKIN, E. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation:

- purification, primary structure, and mode of action. **Biochemistry** 29, p. 5941-5947, 1990.
- FET, V., SISSOM, W.D., LOWE, G., BRAUNWALDER, M.E. 2000. **Catalog of the Scorpions of the World** (1758-1998). New York Entomological Society, New York p.690.
- FONNUM, F. Glutamate a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochem** 42, p.1-11, 1984.
- HELLE, J.T. **Anatomy and Morphology**. The Biology of Scorpions; Polis, G.A., Ed.; Stanford University Press: Palo Alto, CA, USA. 1990.
- INCEOGLU, B., LANGO, J., JING, J., CHEN, L., DOYMAZ, F., PESSAH, I.N., HAMMOCK, B.D. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. **PNAS** 100, p. 922-927, 2003.
- ISFOR, R.J. Proteomics analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** 771, p. 155-165, 2002.
- KARANGWA, C., ESTERS, V., TITS, M., MINET, A., BOLAND, A., SEUTIN, V., NOIRFALISE, A., ANGENOT, L., GRISAR, T., FOIDART, A. Characterization of the neurotoxicity induced by the extract of *Magnistipula butayei* (Chrysobalanaceae) in rat Effects of a new natural convulsive agent. **Toxicon** 49, p. 1109-1119, 2007.
- LANGLEY, K., GRANT, N.J. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? **Neurochem Int.**, Oxford 31, p. 739-57, 1997.
- LEWIS, R. J., GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery** 2, p. 790-802, 2003.
- LIEN, S., LOWMAN, H.B. Therapeutic peptides. **Trends Biotechnology** 12, p. 556-562, 2003.
- LORET, E., SAMPIERI, F., MIRANDA, F., GRANIER, C., ROCHAT, H. Scorpion toxins active on insects. **Methods in Neuroscience** 8, p. 381-395, 1992.
- LOURENÇO, W.R. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. **Biogeographica** 70, p. 155-160, 1994.

- LOURENÇO, W.R. **Scorpions of Brazil**. Paris/França. Les Editions de l'If., p. 307, 2002.
- LUCAS S.M., JUNIOR S.P.I. Plantas venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: **Sarvier**, 1992.
- MALONE, J., TRAUTMANN, M., WILHELM, K., TAYLOR, K., KENDAL, D.M. Exenatide once weekly for treatment of type 2 diabetes. **Expert Opinion on Investigational Drugs** 18, p. 359-367, 2009.
- MAURY, E.A., ACOSTA, L.E. Um nuevo *Bothriurus* del grupo *Bonariensis* (Scorpiones, Bothriuridae). **Boletín de la sociedad de biología de Concepcion** 64, p. 113-119, 1999.
- MARCUSSI, S.M., ARANTES, E.C., SOARES, A.M. Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação e suas toxinas. Ribeirão Preto: **FUNPEC Editora**, 2011.
- MÉNEZ, A., TOCKLIN, R., MEBS, D. The venomous system genome project. **Toxicon** 47, p. 255-259, 2006.
- MILJANICH, G.P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Current Medicinal Chemistry** 11, p. 3029-3040, 2004.
- MYLES, D.C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Current Opinion in Biotechnology** 14, p. 627-633, 2003.
- NICOLELLA, A., MITIDIERI, E.F., LESSA, C.A.S. Relatório anual 2011, Dados de atendimento. Disponível em: <<http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/completo2012.pdf>>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2014.
- OLIVEIRA N. B., SCHWARTZ C. A., PIRES O. R. Caracterização parcial de duas toxinas isoladas da Peçonha do escorpião *Tityus mattogrossensis* (borelli, 1901). Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, 2012.
- OSBORNE, R.H. Insect neurotransmission-neurotransmitters and their receptors. **Pharmacol. Therap**, 69, pp. 117–142, 1996.
- O'SHEA M., ADAMS M. E., BISHOP C., WITTEN J., WORDEN M. K. Model Peptidergic Systems at the Insect Neuromuscular Junction. **Peptides** 6, p. 417-424. 1985.

- PATERSON, I., ANDERSON E.A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science** 310, p. 451-453, 2005.
- PESSINI, A.C., TAKAO, T.T., CAVALHEIRO, E.C., VICHNEWSKI, W., SAMPAIO, S.V., GIGLIO, J.R., ARANTES, E.C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon** 39, p. 1495-1504, 2001.
- PIMENTA, A.M., LIMA, M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science** 11, p. 670-676, 2005.
- POSSANI, L.D., BECERRIL, B., DELEPIERRE, M., TYTGAT, J. Scorpion toxin specific for Na⁺ channels. **European Journal of Biochemistry** 264, p. 287-300, 1999.
- POSSANI, L.D., MERINO, E., CORONA, M., BOLIVAR, F., BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie** 82, p. 861-868, 2000.
- RUPPERT, E. E., FOX, R. S., BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo - SP: ROCA, 2005.
- SCHMIDT, G.O. Levantamento dos escorpiões na restinga da Praia da Pinheira, Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- SOLEGLAD, M. E. & FET, V. 2003. High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). *Escorpius* **11**, 1-175.
- SOUSA, M.V., FONTES, W., RICART, C.A.O. Análise de Proteomas. Disponível em: <<http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio07/analise.pdf>>. Acesso em: 31 de outubro de 2013.
- WATT, D.D., SIMARD, J.M. **Neurotoxic proteins in scorpion venom**. **J. Toxicol. (Toxin Rev.)** 3, p. 181-221. 1984.
- YU, F.H., CATTERALL, W.A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Sci STKE** 253, p. 15, 2004.
- ZHIJIAN, C., LUO, F., YINGLIANG, W., XIN, M., WENXIN L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon** 47, p. 348-355, 2006.

ZLOTKIN, E., DEVONSHIRE, A.L., WARMKE, J.W. The pharmacological flexibility of the insect voltage sodium channel: toxicity of AaIT to knockdown resistant (kdr) flies. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 29, p. 849-853, 1999.