

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL**

JEFERSON CAMARGO DE LIMA

**BLOQUEIO NEUROMUSCULAR INDUZIDO PELA PEÇONHA DE *Bothriurus
bonariensis* SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO MÚSCULO DE *Phoetalia pallida***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

São Gabriel

2013

JEFERSON CAMARGO DE LIMA

BLOQUEIO NEUROMUSCULAR INDUZIDO PELA PEÇONHA DE *Bothriurus bonariensis* SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO MÚSCULO DE *Phoetalia pallida*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à comissão avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Paulo Marcos Pinto

Co-orientador: Douglas Silva dos Santos.

São Gabriel

2013

JEFERSON CAMARGO DE LIMA

BLOQUEIO NEUROMUSCULAR INDUZIDO PELA PEÇONHA DE *Bothriurus bonariensis* SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO MÚSCULO DE *Phoetalia pallida*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Proteômica

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 18 de Outubro do ano 2013.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos Pintos

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

UNIPAMPA

Prof.^a Dr.^a Lúcia do Canto Vinadé

UNIPAMPA

“Dedico este trabalho, a todos aqueles, que, assim como eu, veem a ciência não só como um meio, mas também como um fim em si.”

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de um esforço colaborativo. Não só do pessoal do LPA, mas de todos aqueles que de alguma maneira ajudaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste. É a estas pessoas que eu quero agradecer.

Entre estes, tem pessoas quais eu não posso deixar de citar, como: A minha mãe, (Maria do Carmo), que apesar de até hoje não entender exatamente o que é Biotecnologia sempre me incentivou. Ao meu pai, (Claudecir de Lima) que me ensinou que o trabalho dignifica o homem. A minha irmã, Vanusa que sempre acreditou em mim. Ao meu irmão Biko (Claudecir) pelas longas conversas e devaneios sobre as mais diversas besteiras, ao meu irmão mais novo, Everton por treinar comigo e assim me ajudar a (des)organizar a mente. Ao Bruno Strieder, que não é meu irmão de sangue, mas isto é mero detalhe.

Aos meus amigos: Pablo Echeverria Macedo, Anna Carolina Boeck, Mauro Medina Nunes e Gianfrancis Dias Ugalde, pela amizade e boas risadas e as muitas cocas que tomamos no Cine.

Ao prof. Paulo, pela oportunidade e conhecimento. Ao Douglas pela ajuda e dicas na elaboração do trabalho, e a todo o pessoal do LPA.

Parafreseando Carl Sagan, em O mundo assombrado pelos demônios “Que a ciência seja vista como uma vela no escuro”.

RESUMO

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 da fração proteica do veneno torna-se interessante não só do ponto de vista biotecnológico, mas também ecológico, pois assim podemos melhor compreender este escorpião. Os escorpiões foram coletados através de armadilhas de interceptação e queda (*Pitfall-Traps*) espalhadas no campus da universidade e na localidade no Cerro do Batovi, São Gabriel, RS. O veneno foi extraído a partir de vários indivíduos por estimulação elétrica diretamente no derradeiro segmento abdominal e imediatamente transferido para solução salina 0,9 %. Os animais foram previamente anestesiados por congelamento a -5°C , e afixados 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. Os registros isométricos foram feitos usando o software AQCAD durante 120 min. As análises foram feitas pelo software ANCAD. Os diferentes tratamentos com o veneno ($0,4\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0,8\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $1,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $3,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foram feitos por injeção na região da terceira porção abdominal com o auxílio de uma seringa de Hamilton. Com nossos resultados, foi possível observar um efeito dose-dependente sobre a força de contração muscular. Quando a dose de ($8\mu\text{g}/\text{g}$ de animal) foi ensaiada, houve uma inibição de 50% da resposta contrátil, em $60\pm 2\text{min}$, e 55% de inibição ao final de 120min de registro ($n=5$, $p<0.05$). Nenhuma das concentrações ensaiadas induziu aumento da resposta contrátil na presença do veneno. Os resultados sugerem que o veneno de *B. bonariensis* induz neurotoxicidade periférica quando administrado em baratas. Trabalhos posteriores se fazem necessário para melhor caracterizarmos esta peçonha e assim podermos responder qual fração do veneno que possui atividade e sobre qual o mecanismo de ação.

Palavras-chave: Venômica, *Bothriurus bonariensis*, Ensaio eletrofisiológico.

ABSTRACT

The species *Bothriurus bonariensis*, popularly known as the black scorpion, though not often induce severe clinical conditions is easily found in the urban environment. Venoms animal have been widely recognized as a major source of biologically active molecules. Given the broad spectrum of use of these active biomolecules found in venom scorpion, to characterize the protein fraction of the venom becomes interesting not only terms the standpoint of biotechnology, but also ecological, because then we can better understand this scorpion. The scorpions were collected using pitfall traps and falling scattered on campus and in the town of Cerro Batovi, São Gabriel, RS. The venom was extracted from individuals by various electrical stimulation directly to the last abdominal segment and immediately transferred to 0.9% saline solution. The animals were anesthetized by freezing at -5°C , and posted on the dissection plate. After dissection of the cuticle, the metathoracic region, the nerve was exposed and 5 electrodes Ag/AgCl inserted for electrical stimulation. The recordings were made using isometric software AQCAD for 120 min. The analyzes were performed by software ANCAD. The different treatments with the venom ($0,4\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0,8\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $1,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $3,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were made by injection in the abdominal portion of the third region with the aid of a Hamilton syringe. With our results, we observed a dose- dependent on the strength of muscle contraction. When the dose ($8\mu\text{g}/\text{g}$ animal) was tested, there was a 50% inhibition of the contractile response by 60 ± 2 minutes, and 55 % inhibition at the end of 120 minutes of recording ($n = 5$, $P < 0.05$). None of them concentrations tested to induced an increase in the contractile response in the presence of venom. The results suggest that the venom of *B. bonariensis* induced peripheral neurotoxicity when administered to cockroaches. Furthermore work is needed to make better characterize this venom and so we can answer what fraction of the venom that has activity and the mechanism of action.

Keywords: Venômico, *Bothriurus bonariensis*, electrophysiological testing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Aspectos gerais.....	10
1.2	Características morfológicas dos escorpiões.....	14
1.3	Veneno.....	16
1.3.1	Toxinas.....	17
1.4	Canais iônicos e a junção neuromuscular em insetos.....	19
1.5	Aspectos biotecnológicos.....	21
2	JUSTIFICATIVA.....	23
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivos gerais.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Coleta e manutenção.....	24
4.2	Extração do veneno.....	26
4.3	Preparação do músculo coxal de baratas.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
9	REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Os escorpiões são artrópodes (filo Arthropoda, ordem Scorpiones), animais com esqueleto externo de quitina (polissacarídeo constituído por um polímero de cadeia longa de N-acetilglicosamina.) e proteína, apêndices articulados que, juntamente com aranhas, ácaros, carrapatos e outros animais menos conhecidos, formam o grupo dos aracnídeos (Classe Arachnida). O esqueleto proporciona sustentação, proteção contra abrasão e redução da perda de água para o meio terrestre porque é revestido por uma camada de cera, a epicutícula. São animais carnívoros, predadores de pequenos artrópodes como baratas, grilos, traças, cupins, aranhas e até mesmo de outros escorpiões. (DA SILVA *et al.*, 2005).

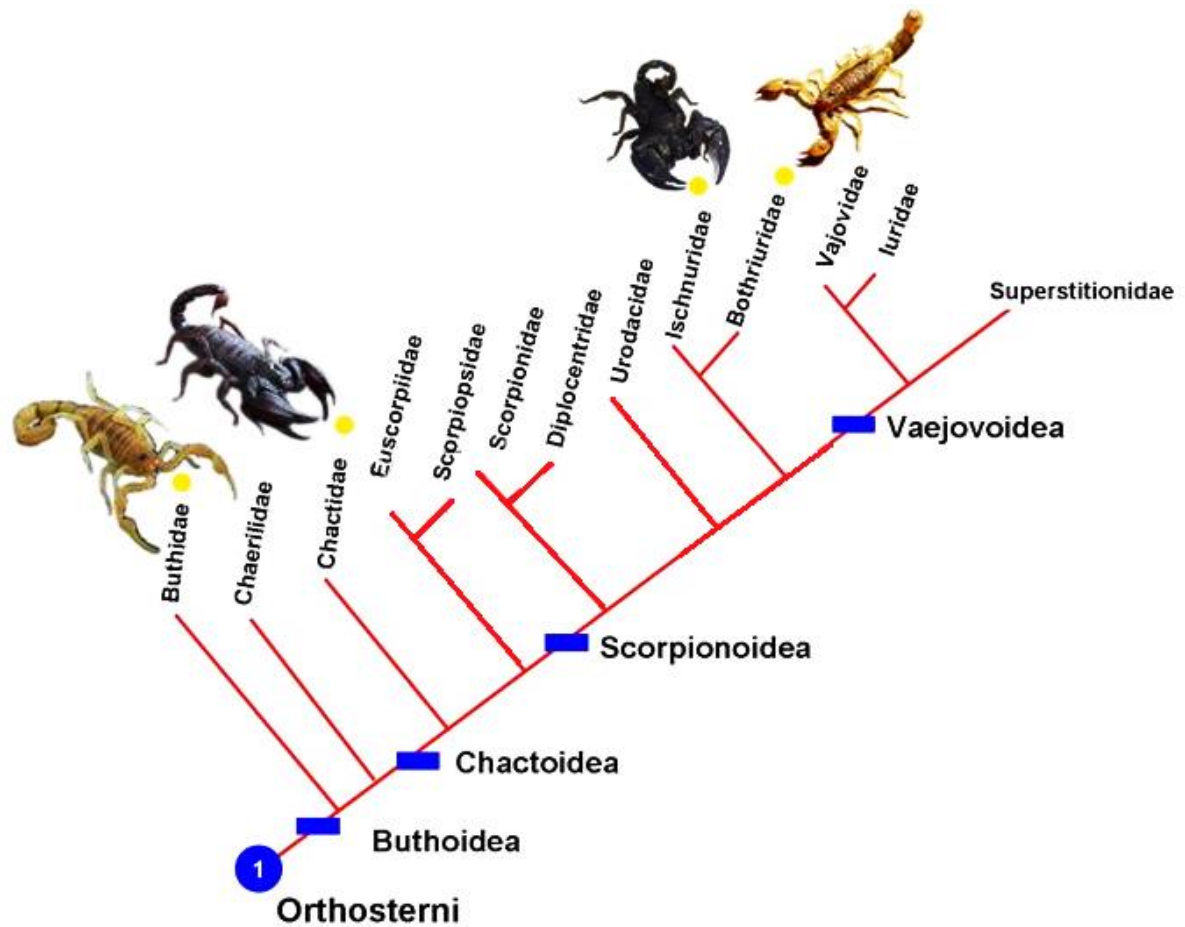
Os primeiros registros de escorpiões indicam vida aquática e datam do período Siluriano (há mais de 410 milhões de anos atrás), entretanto não há certeza se estes animais tiveram origem marinha ou em água doce. Nos sedimentos referentes ao período Devoniano foram encontrados os fósseis dos primeiros escorpiões que se dispersaram no ambiente terrestre (DA SILVA *et al.*, 2005; CARDOSO, *et al.*, 2009).

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). Os escorpiões ocupam a maioria dos ambientes, habitats e microhabitats terrestres. São encontrados tanto em desertos (ambientes que colonizaram com grande sucesso) como em florestas tropicais de elevada umidade e também em todos os outros gradientes intermediários de vegetação. Já foram coletadas a 5.560 m de altitude, nos Andes peruanos, assim como no interior de grutas, em profundidades de até 800 m (CARDOSO, *et al.*, 2009). Por serem diversos, encontram-se em 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). São encontradas em todas as zonas tropicais do mundo e, recentemente, foram introduzidos na Nova Zelândia (CARDOSO *et al.*, 2009).

No Brasil, a escorpiofauna é representada por quatro famílias; (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Ischnuridae) como pode ser visto na Figura 1, abrangendo 17 gêneros e 94 espécies consideradas atualmente válidas (LOURENÇO, 2002). São conhecidas 14 famílias

de escorpiões. A família Buthidae é a mais importante pelo número de espécies, estando representada no Brasil pelo gênero *Tityus*. Todos os escorpiões de importância médica existentes no Brasil pertencem a este gênero, representando 60% da fauna escorpiônica neotropical (LUCAS; SILVA JUNIOR, 1992).

FIGURA 1 - Filogenia da ordem Scorpiones.



Os pontos em amarelo são as famílias que ocorrem no Brasil: Buthidae, Chactidae, Ischnuridae e Bothriuridae, mostrando os representantes de espécies brasileiras. Adaptada de STOCKWELL, 1989.

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).

B. bonariensis é uma espécie de escorpião pertencente ao “grupo” bonariensis e é a espécie-tipo do gênero (Figura 2). Esta espécie compreende animais de médio a grande porte, com adultos atingindo 60 mm de comprimento. A coloração geral varia de marrom-avermelhado a preto. É o escorpião mais comum em nosso meio, encontrado em todo o Rio Grande do Sul. O número de dentes nos pentes sensoriais varia entre 17 e 24 nos machos (geralmente mais de 20) e entre 16 e 20 nas fêmeas. *B. bonariensis* tem sua distribuição geográfica envolvendo Argentina, Uruguai e os estados sul brasileiros do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LOURENÇO, 2002).

FIGURA 2 – Fotografia de *Bothriuris bonariensis*.



Fonte: Douglas Santos

Os acidentes escorpiônicos (escorpionismo) ocorrem com frequência e são potencialmente graves em extremos de faixa etária. Aproximadamente 50% dos acidentes notificados provêm dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo e a maioria em meses quentes e chuvosos. Os escorpiões de importância médica pertencem ao gênero *Tityus* e são: *T. serrulatus*, *T. trivittatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus* (Portal da Saúde, 2013).

Na maioria dos casos, o reconhecimento das manifestações clínicas e a história epidemiológica do acidente permitem o diagnóstico do tipo de envenenamento. O diagnóstico etiológico, quando há identificação do animal, é pouco frequente (MACUSSI; ARANTES; SOARES, 2011).

Manifestações locais – a dor, de instalação imediata, é o principal sintoma, podendo se irradiar para o membro e ser acompanhada de parestesia, eritema e sudorese localizada ao redor do ponto de picada. Tem duração de até 24 horas, embora o quadro mais intenso ocorra nas primeiras horas após o acidente. Manifestações sistêmicas – após intervalo de minutos até poucas horas (duas a três), podem surgir, em crianças, manifestações sistêmicas como sudorese profusa, agitação psicomotora, tremores, náuseas, vômitos, sialorréia, hipertensão ou hipotensão arterial, arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar agudo e choque. A presença dessas manifestações impõe a suspeita do diagnóstico de escorpionismo, mesmo na ausência de história de picada ou identificação do animal (CARDOSO *et al.*, 2009).

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.

De caráter predominantemente urbano, sua ocorrência tem se elevado nos últimos anos (Tabela 1), particularmente nos estados do Nordeste, atingindo mais de 21.022 acidentes em 2003 e taxa de incidência de 12 casos por 100 mil habitantes.

Tabela 1 - Casos de acidentes por escorpiões. Brasil, Regiões.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	TOTAL
Norte	1.893	2.034	2.005	2.301	2.741	2.449	2.844	3.298	19.565
Nordeste	15.917	18.743	19.508	19.076	23.547	25.083	30.612	29.490	181.976
Sul	673	740	967	1.000	1.005	1.133	1.273	1.415	8.206
Sudeste	15.579	14.135	13.771	16.431	20.984	20.962	22.749	26.069	150.680
Centro-Oeste	1.333	1.313	1.119	1.477	1.957	2.109	2.437	3.589	15.334

Brasil	35.395	36.965	37.370	40.285	50.234	51.736	59.918	63.871	375.771
---------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------

Fonte: SINAN/SVS/MS – atualizado em 08/05/2013

A maioria dos acidentes é classificada como leve e não requer soroterapia, podendo ser tratada na unidade de saúde mais próxima do local de ocorrência. A maioria dos acidentes é de baixa letalidade (0,2%), crianças abaixo de 14 anos têm risco mais elevado de evoluir para óbito (3,2%). Em 2003, foram registrados 48 óbitos, a quase totalidade em menores de 14 anos. (CARDOSO *et al.*, 2009; MACUSSI; ARANTES; SOARES, 2011).

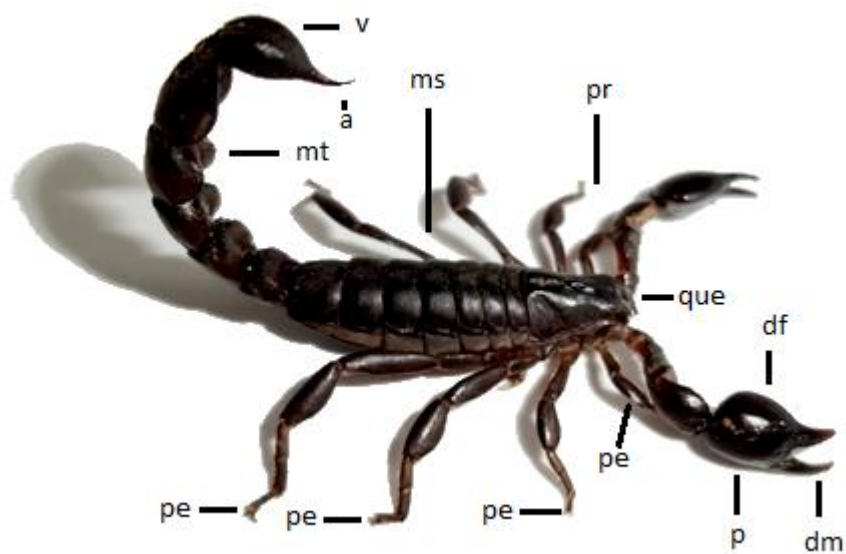
1.2 Características morfológicas dos escorpiões

Fisiologicamente, escorpiões exibem características marcantes e pouco mudaram ao longo dos milênios. Aparecendo no registro fóssil cerca de 450 milhões de anos atrás, durante o período Siluriano médio os escorpiões são animais segmentados. 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 (HJELLE, 1990).

Os animais dessa Ordem possuem corpo dividido em duas porções: prossoma e opistossoma. O prossoma, parte anterior, e 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 3); 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. A peçonha é produzida por um par de glândulas dentro da base do aparelho. Por meio de uma contração violenta da camada muscular que envolve as glândulas, a peçonha líquida é ejetada no ducto do aguilhão (RUPPERT *et al.*, 2005).

FIGURA 3 – Morfologia geral do escorpião.



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

1.3 Veneno

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 injuria aos agressores, é exercida por uma complexa mistura de componentes bioativos, que são capazes de induzir respostas fisiológicas e farmacológicas em insetos e/ou mamíferos (LORET *et al.*, 1992; EITAN *et al.*, 1990). 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). A complexidade em termos de peptídeos e proteínas no veneno, somada ao conjunto com o número de espécies venenosas, indicam que apenas uma pequena proporção (menos de 1%) das moléculas bioativas foi identificada e caracterizada até então, e pouco se sabe a nível genômico destes organismos venenosos (MÉNEZ; STOCKLIN; MEBS, 2006).

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

As toxinas escorpiônicas podem ser usadas como ferramentas nos estudos de estrutura e função de canais iônicos sensíveis à voltagem e também no estudo de liberação e captação de neurotransmissores (COLOGNA; ARANTES, 2010).

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). 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 desta origem (PATERSON; ANDERSON, 2005). Também digno de nota 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 o alvo atual da Toxinologia nos anos recentes. Isto é parcialmente um 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).

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

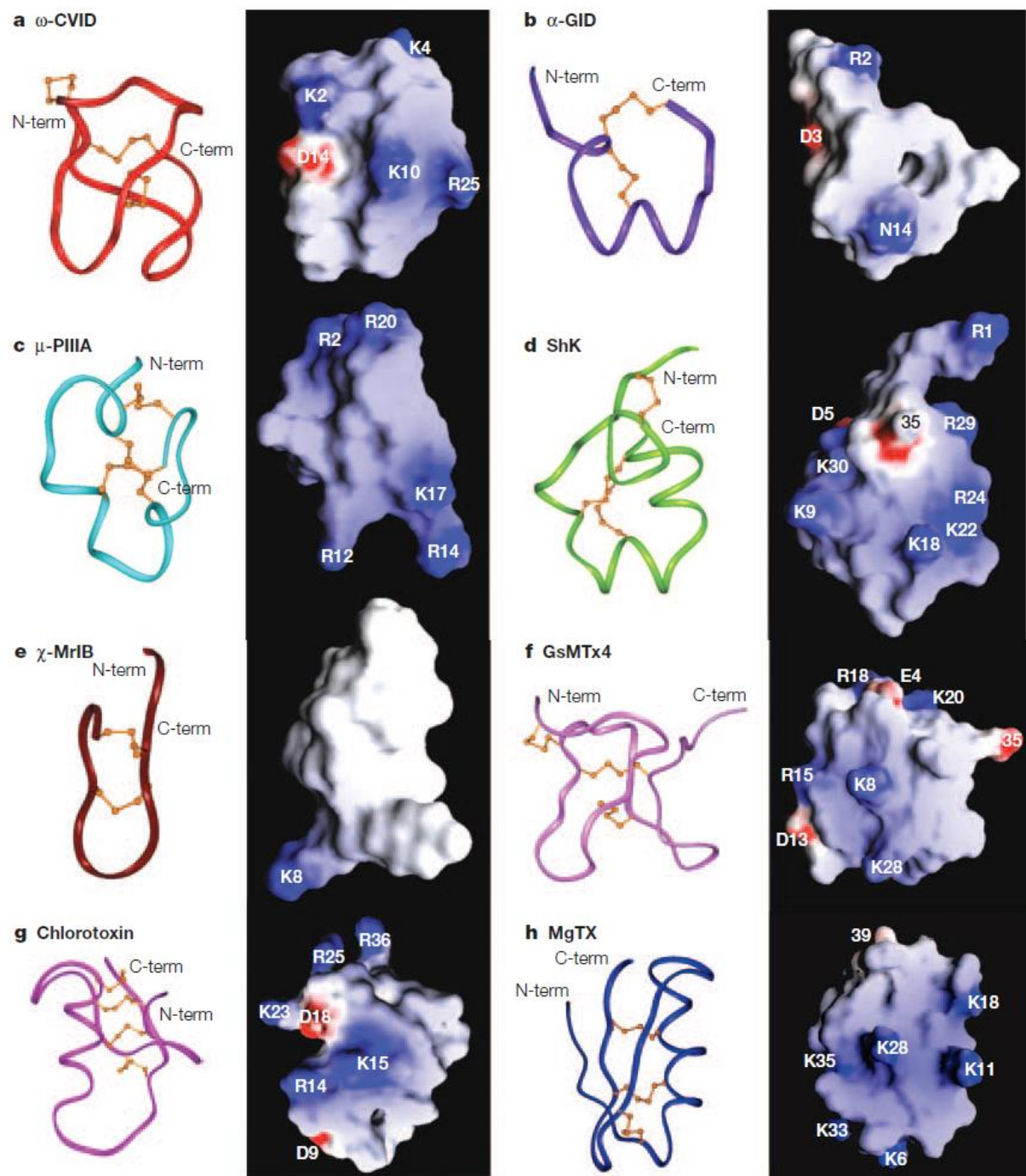
ou vítima. Toxinas do veneno perturbam a atividade das enzimas críticas, receptores, ou canais de íons, assim prejudicam os sistemas nervosos, central e periférico, o cardiovascular e os sistemas neuromusculares, coagulação sanguínea e homeostase (CALVETE, 2009). Tal riqueza pode ser útil para a biotecnologia de muitas maneiras, com a prospecção de novos fármacos ou novas entidades químicas, que podem ser usados como compostos terapêuticos; sendo os mais promissores (PIMENTA; LIMA, 2005).

1.3.1 Toxinas

A peçonha de escorpiões é uma mistura complexa de moléculas bioativas como peptídeos, enzimas (hialuronidase e lisozima), nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas dentre outros (BATISTA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007). Porém, os componentes mais importantes são os peptídeos que agem em canais iônicos de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, pois são considerados os responsáveis pelos sintomas neurotóxicos de envenenamento (LIMA *et al.*, 2007), também conhecidos como peptídeo toxinas.

Toxinas que interagem seletivamente com canais para Na⁺, K⁺, Cl⁻, ou Ca²⁺ têm sido utilizadas como ferramenta para o estudo das propriedades biofísicas e estruturais destes canais iônicos, além de permitir a identificação dos vários tipos de canais existentes e o papel fisiológico dos mesmos em diferentes células (HILLE, 1992). Na figura 4 temos alguns exemplos de toxinas que agem seletivamente em determinados canais iônicos.

FIGURA 4- Estruturas moleculares de toxinas.



a | ω -CVID. b | α -GID (1MTQ). c | μ -PIIIA. d | ShK (1ROO). e | χ -MrIB (1IEO). f | GsMTx4 (1LQR). g | Chlorotoxin (1CHL). h | margatoxina (1MTX). Fonte: Adaptada de LEWIS; GARCIA, 2003.

Na figura 4, para cada estrutura da fita (esquerda), onde podemos observar a localização da porção N-terminal e C-terminal, assim como a localização das ligações dissulfeto, temos uma representação mostrando a superfície eletrostática (à direita): áreas em vermelho, negativa; azul positiva; cinza hidrofóbica. Observe as semelhanças estruturais, mas diferentes superfícies eletrostáticas, indicadas por uma toxina-canal de cloreto (g) e uma de

canal de K⁺ (h). Por outro lado, as estruturas dos dois canais de K⁺ ilustradas (d e h) apresentam divergência estrutural considerável.

As toxinas específicas para canais para potássio (KTx) são geralmente peptídeos pequenos e de caráter básico, formados por 23-43 aminoácidos estabilizados por 3-4 pontes dissulfeto (COLOGNA; ARANTES, 2010). Toxinas proteicas de animais são conhecidas por perturbar os processos fisiológicos ao se ligarem a elementos-chaves como a um receptor, canal iônico ou uma enzima (TREMEAU, *et al.*, 1995 apud DONATO; ARAUJO, 2008).

1.4 Canais iônicos e a junção neuromuscular em insetos

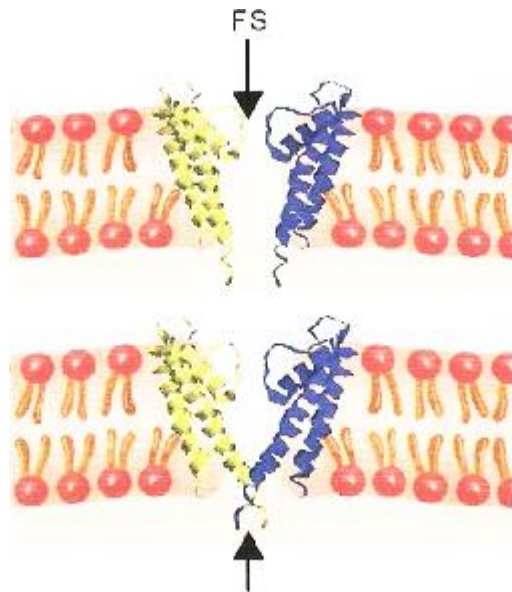
Canais iônicos são formados por proteínas integrais e estão presentes nas membranas plasmáticas das células. Formam canais responsáveis pelas trocas entre o meio extracelular e intracelular. Íons, água e pequenas moléculas podem atravessar a bicamada lipídica das membranas celulares graças a estes poros formados por proteínas transmembranares (AIRES, 2007).

Possuem a função de permitir que íons, principalmente Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻, difundam-se rapidamente através da bicamada lipídica a favor dos seus gradientes eletroquímicos. Esses canais possuem portas que se abrem e se fecham rapidamente em resposta a um estímulo específico. Os principais estímulos são: uma mudança na voltagem através da membrana; uma tensão mecânica; ou a ligação de um ligante (ALBERTS *et al.*, 1997).

Os canais iônicos podem apresentar comportas que abrem e fecham de acordo com estímulos, físicos, químicos, eletromagnéticos, mecânicos, entre outros (Figura 5). Podemos citar os canais de sódio operados por voltagem como um exemplo clássico de canais de comporta ativados por voltagem, esse tipo de canal apresenta duas comportas; uma externa e outra interna, quando estão no seu estado de repouso (-90 mV nos neurônios) a comporta externa permanece fechada, diferentemente do canal de potássio, que apresenta apenas uma

comporta e conseqüentemente apenas dois estados distintos (repouso e ativado) (AIRES, 2007).

FIGURA 5 - Representação bidimensional de um canal imerso na bicamada lipídica.



As imagens representam, com boa fidelidade, um canal para K do tipo Kir. No painel superior o canal está aberto, e no inferior está fechado. Fonte: AIRES, 2007.

Uma maneira de estudar os canais iônicos e suas atividades, e conseqüentemente uma maneira de avaliar as propriedades farmacodinâmicas de determinado veneno, é através de preparações sinápticas em insetos.

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 (*Phoetalia pallida*). Estes organismos oferecem as vantagens de neurônios acessíveis e prontamente identificáveis (O'SHEA *et al.*, 1985).

1.5 Aspectos Biotecnológicos

Vários estudos têm desenvolvido sintéticos de toxinas isoladas da peçonha de vários animais, tornando-se medicamentos utilizados na terapia de muitas enfermidades como diabetes, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares, o que confirma a importância dos estudos dos componentes destas peçonhas para o homem (LEWIS; GARCIA, 2003). Como exemplo desses sintéticos de toxinas, tem-se o peptídeo SNX-111, análogo do peptídeo ω -conotoxina MVIIA, isolado da peçonha do caracol marinho *Conus magnus*, que é utilizado como potente analgésico (cerca de mil vezes mais potente que a morfina) em pacientes com câncer e AIDS e em espasmos severos decorrentes de lesões medulares (MILJANICH, 1997; PENN; PAICE, 2000; RIDGEWAY *et. al.*, 2000). Este novo princípio ativo foi aprovado em julho de 2000 pelo FDA (EUA) com o nome comercial de Ziconotide®. O fármaco captopril (Capoten®) da indústria Bristol-Myers Squibb, sintetizado a partir de um peptídeo isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* nos anos sessenta, é um dos medicamentos mais utilizados em todo o mundo para o tratamento de hipertensão arterial e pós-infarto do miocárdio. Outro fármaco utilizado, no tratamento de casos de trombose, é o eptifibatide (Integrilin®), sintetizado a partir da barbourina, isolada da peçonha da serpente *Sistrurus miliariusbarbouri* (SCARBOROUGH *et al.*, 1991).

Outros exemplos da aplicação biotecnológica de produtos derivados de peçonhas animais podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Exemplos de peptídeos ou derivados de peptídeos de origem de venenos em desenvolvimento, em uso ou em fase de testes.

Animal	Peptídeo/proteína	Farmacologia	Indicação	Estágio
Cobra	Captopril (Teprotide)	Inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA)	Hipertensão	Aprovado FDA (1982)
Cobra	Eptifibatide (Integrilin™)	Inibe a ligação do fibrinogênio à glicoproteína	Estabilizador de anginina	Aprovado FDA

		IIb/IIIa das plaquetas		(1998)
Caracol cone	ω -Conotoxina MVIIA (Ziconotide, Prialt®)	Bloqueia $Ca_v2.2$ canais de cálcio voltagem-dependentes	Dor crônica	Aprovado FDA (2004)
Lagarto	Exenatida (Byetta®)	Secretagogo de insulina (incretina mimética)	Diabetes mellitus tipo 2	Aprovado FDA (2005)
Cobra	Ancrod	Anticoagulante	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico	Fase III
Caracol cone	χ -Conotoxina MrIA (Xen2174)	Inibe Transporte de Noradrenalina	Dor crônica	Fase II
Escorpião	Chlorotoxina (TM-601)	Encobre MNP2 na superfície de células de glioma, prejudicando a capacidade de invasão	Glioma	Fase II
Aranha	Psalmotoxina-1	Bloqueio de ácidos sensíveis a íons canal 1a (ASIC1a)	Dor inflamatória	Pré-clínico
Aranha	Tx2-6	Liberação de óxido nítrico	Disfunção erétil	Pré-clínico
Anêmona-do-mar	Shk	Bloqueia $K_v1.3$ canais voltagem-dependentes de potássio	Doença auto-imune, incluindo MS	Pré-clínico

Fonte: Adaptada de Vetter *et al.*, 2010.

Como pode ser observado na tabela 2, temos fármacos já aprovados e outros em diferentes fases de testes. As fases de testes consistem de procedimentos pelos quais todos os medicamentos devem passar antes de serem liberados para a comercialização. Este processo é dividido primeiramente em testes Pré-clínicos e testes Clínicos, sendo os testes clínicos dividido em quatro fases (I, II, III, IV). Os testes pré-clínicos são realizados em animais de experimentação, para sabermos como o medicamento se comporta em um organismo. Nos testes clínicos os ensaios são feitos com seres humanos. Somente depois que o medicamento passar por todas estas fases, a autoridade regulatória, no nosso caso a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), nos Estados Unidos o órgão responsável é a *Food and Drug Administration* (FDA), avaliam os resultados e se estes forem satisfatórios este será registrado e assim poderá ser comercializado.

2 JUSTIFICATIVA

B. bonariensis é um aracnídeo pouco estudado e de certa forma negligenciado, pois esta espécie não costuma induzir quadros clínicos graves. Por ser comum e abundante na região do Bioma Pampa, o mesmo se torna fonte de interesse, principalmente no que diz respeito à composição do veneno, devido ao potencial biotecnológico que a porção peptídeo proteica deste representa. Tendo em vista todas essas ações que as diversas toxinas escorpionicas podem realizar no organismo, sendo por interações com canais para potássio, ou canais para sódio, ou mesmo interações com outros tipos de receptores e alvos, a purificação e a caracterização de novos componentes da peçonha mostra-se de fundamental interesse, tanto para as ciências básicas quanto para o conhecimento aplicado. A maioria dos estudos existentes sobre os venenos de escorpião limitam-se a um número pequeno de espécies, correspondendo, em geral, àquelas que causam acidentes de comprovada gravidade. Desse modo, o estudo da caracterização da fração peptídeo proteica do veneno visa suprir a falta de dados sobre a peçonha dessa espécie, bem como contribuir para estudos futuros mais aprofundados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do veneno de *B. bonariensis* em preparações neuromusculares de baratas (*Phoetalia pallida*) *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a coleta e manutenção dos escorpiões *B. bonariensis*;
- 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 (*Phoetalia pallida*) *in vivo*.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e manutenção

Escorpiões da espécie *B. bonariensis* foram capturados nas proximidades do *campus* da Universidade Federal do Pampa (área 1) e no Cerro do Batovi (área 2), ambos localizados no município de São Gabriel, Rio Grande do Sul (Figura 6), no período entre dezembro a março de 2013. A captura foi realizada por meio de armadilhas, que consistem em cortes médios de papelão com dimensões de 40 cm de largura x 40 cm de comprimento (Figura 7) distribuídas na área 1. As armadilhas de interceptação e queda foram inseridas na área 2. Consistem em recipientes enterrados até sua superfície superior ficar nivelada com o solo, como ilustrado na Figura 8. As armadilhas foram alocadas próximas a árvores e troncos em decomposição, visto que são o habitat da espécie. Os animais capturados foram coletados manualmente com auxílio de pinças entomológicas e depositados em recipiente adequado até o momento da extração do veneno.

Treze dos exemplares coletados escolhidos aleatoriamente foram mantidos em cativeiro, que consiste em um aquário de vidro, forrado com areia e pedras. Pedacos pequenos de madeira, cascas e folhas de árvores também foram depositados, na tentativa de mimetizar o habitat da espécie. Os escorpiões foram alimentados quinzenalmente com baratas de ambos os sexos da espécie *Phoetalia pallida*, oriundas do biotério de insetos da Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel e algodão embebido em água foi oferecido diariamente.

Figura 6 – Locais de coleta de *B. bonariensis*



Área 1 localizada no *Campus* São Gabriel da Universidade Federal do Pampa. Área 2 localizada no Cerro do Batovi, São Gabriel, RS. Fonte: Google Maps.

Figura 7 – Armadilha de cortes de papelão.



Fonte: Douglas Santos

Figura 8 – Armadilha de interceptação e queda.



Fonte: Douglas Santos.

4.2 Extração do veneno

A extração do veneno do escorpião *B. bonariensis* foi realizada através da estimulação elétrica por corrente contínua (35 Volts), diretamente do derradeiro segmento abdominal. O pool dos venenos coletados foi diluído em solução salina 0,9% e armazenado à -20°C até o momento do uso.

4.3 Preparação músculo coxal de baratas

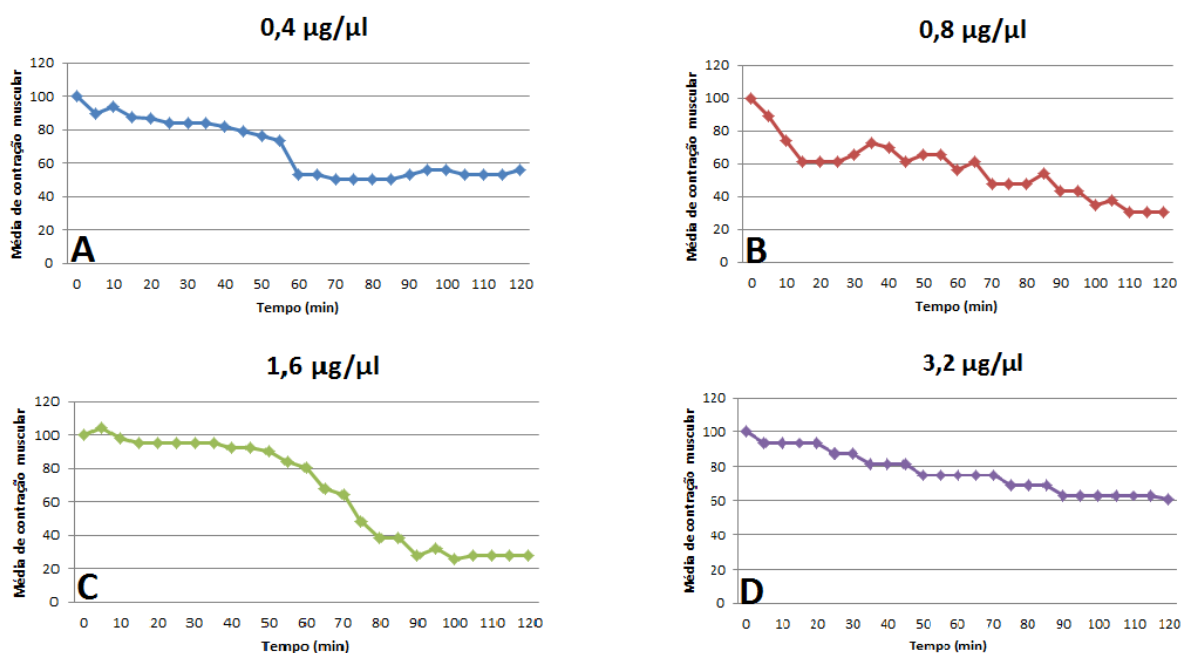
Nos experimentos com a preparação músculo coxal de baratas foi usada solução salina para insetos (NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, KCl 10 mM e Tris-HCl 10 mM, corrigida para pH 6.8 usando NaOH 2 N). A preparação músculo coxal de barata foi montada de acordo com O`Gara e Grews, (1990) adaptado para condições experimentais (Lucho *et al.*, 2010). Para a dissecação e montagem da preparação, os animais foram previamente anestesiados por congelamento a -5°C , e afixados em na placa de dissecação, com a face ventral para cima. Após a dissecação da cutícula, na região metatórácica, o nervo 5 foi exposto e os eletrodos de Ag/AgCl inseridos para a estimulação elétrica (0,5 Hs, 0,2 ms) (Estimulador A20104, AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). Os registros isométricos (Aparelho previamente calibrado com peso padrão de 1g) foram feitos usando-se o software AQCAD (AVS Projetos, São

Carlos, SP, Brasil) durante 120 min. As análises foram feitas pelo software ANCAD (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). Os diferentes tratamentos com o veneno (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 3,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foram feitos por injeção na região da terceira porção abdominal com o auxílio de uma seringa de Hamilton. O veneno (100 μg) foi coletado de 113 animais, por meio de estímulos elétricos aplicados à região do telson. Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão, e comparados pelo teste “t” de *Student*. O veneno de *B. bonariensis* foi ensaiado nas diferentes concentrações: 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser visto na Figura 9, em todas as doses testadas foi identificado um declínio da média de contração muscular. O que indica que a peçonha de *B. bonariensis* tem ação sobre o sistema nervoso. Mesmo a menor dose utilizada nos ensaios (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) já apresentou resultados interessantes, com um declínio contínuo na média de contração muscular (Figura 9A).

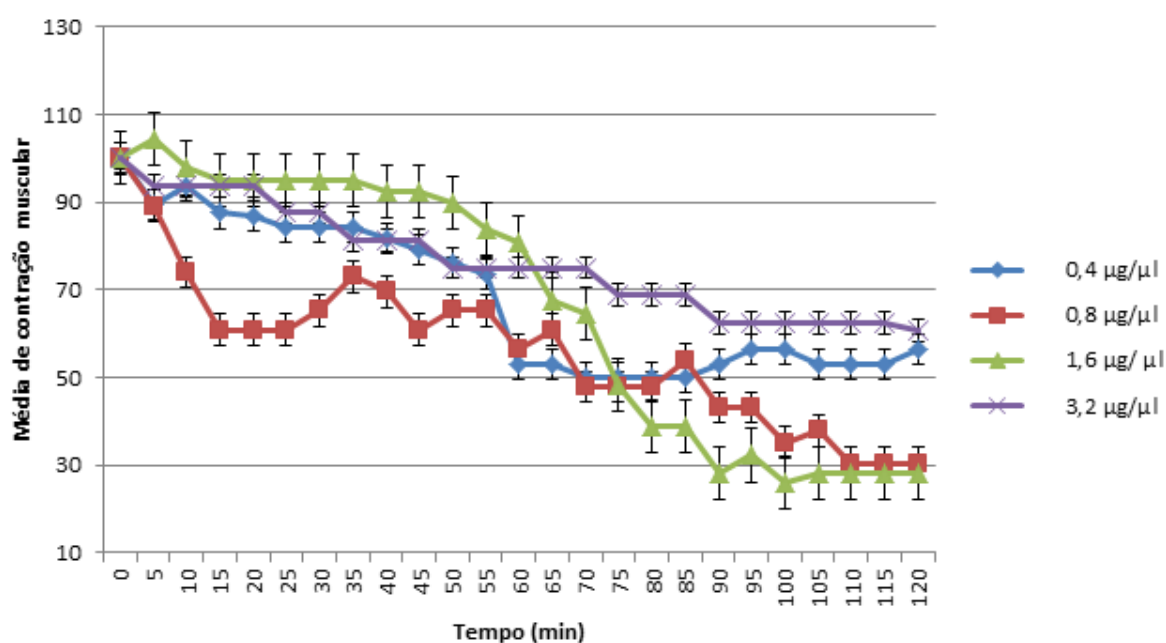
FIGURA 9 – Resultados dos ensaios eletrofisiológicos.



Média de contração muscular por tempo decorrido para cada uma das concentrações testadas. Pode-se observar que todas as concentrações testadas induziram uma redução da força de contração muscular (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 3,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Fonte: Do autor. Dados não publicados.

Analisando o restante dos resultados, nota-se que as doses intermediárias ($0,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $1,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) foram as que apresentaram um maior efeito sobre a força de contração muscular. De forma interessante, a maior concentração testada ($3,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, Figura 9D) foi a que mostrou menor efeito sobre a média de contração muscular. Como sabemos, a composição de venenos são uma complexa mistura de moléculas bioativas. Como o animal tem que estar sempre pronto para as mais diversas presas, ou para se defender de seus predadores, nestas complexas misturas que são os componentes das peçonhas, encontramos não só moléculas com efeitos bloqueadores, mas também moléculas com propriedades ativadoras. A nossa hipótese para este resultado, é de que estamos observando o limiar do efeito dose resposta. Na concentração de $3,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a concentração de moléculas com capacidade de ativação para canais iônicos começa a se tornar tão significativa quanto a concentração de moléculas com propriedades de bloqueio, e assim observamos o declínio da média de contração muscular, mas uma resposta menor que as demais concentrações testadas.

Figura 10 – Comparação de todos os resultados dos ensaios.



Todas as concentrações ensaiadas resultaram no aumento do tônus muscular, que se caracteriza por uma rigidez na musculatura, diminuindo assim a média de contração muscular.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em nossos resultados, pode-se concluir que nas concentrações testadas, observou-se um efeito dose-dependente sobre a força de contração muscular. Nenhuma das concentrações ensaiadas induziu aumento da resposta contrátil na presença do veneno. Por outro lado, um aumento do tônus muscular (rigidez da musculatura, diminuindo assim a capacidade de contração) foi observado, em todas as concentrações ensaiadas (Figura 10). Os resultados sugerem que o veneno de *B. bonariensis* induz neurotoxicidade periférica quando administrado em baratas. 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.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho apresenta resultados preliminares sobre o efeito do veneno de *B. bonariensis*. Trabalhos mais aprofundados se fazem necessário para podermos responder em qual canal/canais que este veneno age, e qual é a molécula(s) que são responsáveis por tal ação.

8 REFERÊNCIAS

AIRES, MARGARIDA DE MELLO. **Fisiologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. *et al.*, **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. p. 1294

BARRET, C. T.; BARRET, J. F. **Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems?** Current Opinion in Biotechnology, v. 6, p. 621-626. 2003.

BATISTA, CESAR V F; D'SUZE, GINA; GOMEZ-LAGUNAS, FROYLAN; *et al.*, **Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins**. Proteomics, v. 6, n. 12, p. 3718-27. 2006.

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, v.72, p. 121-126. 2009.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. **Animais peçonhentos no Brasil**. 2ª edição. São Paulo. Sarvier, 2009.

CHEN, T.; WALKER, B.; ZHOU, M.; SHAW, C. **Molecular cloning of a novel putative potassium channel-blocking neurotoxin from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi***. Peptides, v.26, p. 731-736. 2005.

COLOGNA, C. T.; ARANTES, E. C. **Isolamento e caracterização estrutural e funcional da Ts15, uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia. 2010.

CRUZ, E. F. S. **Biologia dos Escorpiões**. Em: Barra viera, B. **Venenos Animais - Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas Ltda. 1994.

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*, v.29, p. 5941-5947. 1990.

DA SILVA, S. T.; TIBURCIO, I. C. S.; CORREIA G. Q. C.; AQUINO R. C. T. **Escorpiões, aranhas e serpentes: aspectos gerais e espécies de interesse médico no Estado de Alagoas.** Maceió : EDUFAL. 2005.

DONATO M. F.; Araujo D. A. M. **Purificação, caracterização bioquímica e eletrofisiológica da toxina mic6c7ntx da peçonha da serpente *Micrurus ibiboca* (Merrem, 1820).** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, 2008.

FET, V.; SISSOM, W.D.; LOWE, G.; BRAUNWALDER, M.E. **Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998).** New York Entomological Society, New York. p.690. 2000.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS Versão Eletrônica Disponível em:
<<http://www.funed.mg.gov.br>> Acessado em: 26/08/2013 20:26:08.

Google Maps Versão Eletrônica Disponível em: < <https://maps.google.com/>> Acessado em: 21/10/2013 16:37:17.

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

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*, v.100, p. 922- 927. 2003.

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

LIEN, S.; LOWMAN, H. B. **Therapeutic peptides**. Trends Biotechnol, v. 12, p. 556-562. 2003.

LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; PIMENTA, A. M. C. *et al.*, **Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. Comparative biochemistry and physiology**. Toxicology & pharmacology : CBP, v. 146, p. 264-279. 2007.

LOURENÇO, W.R. **Scorpion of Brazil**. Paris/França. Les Edicions de l'If. 2002, 307 p. 2003.

LORET, E.; SAMPIERI, F.; MIRANDA, F.; GRANIER, C.; ROCHAT, H. **Scorpion toxins active on insects**. Methods in Neuroscience, v. 8, p. 381-395. 1992.

LUCAS S. M.; SILVA JUNIOR P. I. **Escorpiões de interesse médico no Brasil**. In: Schuartsman S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

LUCHO, A.P.B.; FREITAS, T.C.; PERDOMO JR. J.D.; SSTURMER, G.; HEBERLE, M.H.; CORREA, M.S.; DAL BELO, C.A. **Avaliação da atividade bloqueadora neuromuscular do extrato etanólico de *Araucaria angustifolia***. In: II SIEPE Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Uruguaiana. Livro de Resumos.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Escorpiões. **Biologia, envenenamento e mecanismos de ação e de suas toxinas**. 1ª Edição. FUNPEC-Editora, 2011.

MÉNEZ, A.; STOCKLIN, R.; MEBS, D. **The venomous system genome project**. Toxicon, v. 47, p. 255-259. 2006.

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

MYLES, D. C. **Novel biologically active natural and unnatural products**. Current Opinion in Biotechnology, v. 14, p. 627–633. 2003.

National Center for Biotechnology Information Versão Eletrônica Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acessado em: 26/08/2013 20:41:06.

O`GARA, B.A.; DREWES, C.D. **Modulation of tension production by octopamine in the methatoraxic dorsal longitudinal muscle of the cricket *Teleogryllus oceanus***. J. Exp. Biol, v. 149, p. 161-176. 1990.

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.

O`SHEA M.; ADAMS M. E.; BISHOP C.; WITTEN J.; WORDEN M. K. **Model Peptidergic Systems at the Insect Neuromuscular Junction**. Peptides, v. 6, p. 417-424. 1985.

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

PATERSON, I.; ANDERSON E. A. **The renaissance of natural products as drug candidates**. Science, v. 310, p. 451–453. 2005.

PIMENTA, A. M. C.; DE LIMA, M. E. **Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms**. Journal of Peptide Science, v.11, p. 670–676. 2005.

PIMENTA, A. M.; DE MARCO ALMEIDA, F.; DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; **Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry**. Rapid Commun Mass Spectrom, v.17, p. 413–418. 2003.

Portal da Saúde Versão Eletrônica Disponível em
<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>> Acessado em: 04/09/2013 12:02:12.

Protein Data Bank Versão Eletrônica Disponível em
<<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>> Acessado em: 01/09/2013 10:40:17.

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

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo - SP: ROCA, 2005.

SINAN/SVS/MS Versão Eletrônica Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>
Acessado em: 10/09/2013 16:18:11.

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

SOLEGLAD, M. E.; FET, V. **High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni)**. Escorpius, v. 11, p. 1-175. 2003.

STOCKWELL, S.A. **Revision of the Phylogeny and Higher Classification of Scorpions (Chelicerata)**. Ph.D. Dissertation, University of California, Berkeley, 1989.

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