

LUCIENE TOSHIE TAKEISHI OSSANAI

Efeitos da injeção intra-hipocampal de toxinas isoladas do  
veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
da Secretaria de Estado da Saúde de  
São Paulo, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública**  
**Orientador: Profa. Dra. Valquiria Abrão  
Coronado Dorce**

**SÃO PAULO**

**2009**

LUCIENE TOSHIE TAKEISHI OSSANAI

Efeitos da injeção intra-hipocampal de toxinas isoladas do  
veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública**  
**Orientador: Profa. Dra. Valquiria Abrão  
Coronado Dorce**

**SÃO PAULO**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ossanai, Luciene Toshie Takeishi

Efeitos da injeção intra-hipocampal de toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos / Luciene Toshie Takeishi Ossanai – São Paulo, 2009.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Valquiria Abrão Coronado Dorce

1. Escorpiões 2. Venenos de escorpião/isolamento e purificação 3. Venenos de escorpião/farmacologia 4. Excitação neurológica. 5. Microdiálise 6. Microscopia confocal

SES/CCD/CD-223/09

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade,  
pelos momentos felizes que me foram proporcionados;*

*Aos meus irmãos, que me ensinaram a viver com alegria e descontração;*

*Ao meu namorado Raul, por estar sempre ao meu lado... Em todos os  
momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dra. Valquiria Abrão Coronado Dorce, minha orientadora, pelo voto de confiança, pela excelente convivência durante todos estes anos e pelos sábios ensinamentos transmitidos;

À Prof. Dra. Ana Leonor Abrahão Nencioni e Dra. Geane Antiques Lourenço pela amizade, fornecimento de conhecimentos e ajuda nos experimentos realizados;

À todos os amigos e pesquisadores do Instituto Butantan, em especial à Ana Letícia, Adriana, Aline, Bianca, Bruna, Cíntia, Diana e Marcela, por todos estes anos de convivência e pela amizade cultivada;

À todos os funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan;

Ao Dr. Ivo Lebrun e Aline Vivian pela purificação do veneno e dosagem de aminoácidos;

À Dra. Toshie e ao Alex pela manipulação do microscópio confocal e constante atenção;

À Dra. Norma Yamanoue pelo fornecimento de conhecimento e ajuda na microscopia confocal;

À todos os professores dos cursos de pós-graduação por terem contribuído para minha formação acadêmica;

À todos da Secretaria de Pós-Graduação da área de concentração em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública;

À CAPES, pela auxílio financeiro;

À todas as pessoas não mencionadas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

No Brasil, os escorpiões *Tityus serrulatus* e o *Tityus bahiensis* são os de importância médica. Porém, poucos são os estudos sobre os efeitos do veneno do *T. bahiensis* principalmente no sistema nervoso central. Os venenos escorpiônicos são compostos por neurotoxinas, polipeptídeos de baixo peso molecular. Em estudos prévios, o veneno do *Tityus bahiensis* mostrou-se convulsivo e com características distintas das do *Tityus serrulatus*. Suas frações foram estudadas e quatro delas apresentaram resultados interessantes nos parâmetros observados (alterações comportamentais e eletroencefalográficas e perda neuronal). O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos hipocâmpais de toxinas que compõem estas frações em ratos. As frações selecionadas para o estudo foram recromatografadas em HPLC de coluna fase-reversa e os picos de maior rendimento foram utilizados nos experimentos. Cânulas e eletrodos foram implantados no hipocampo de ratos machos Wistar. Cada grupo de animais recebeu 1µl da solução de toxina (1 ou 2µg/µl) ou solução Ringer (grupo controle) e foi submetido à análise comportamental, eletrográfica e histológica. Todas as toxinas estudadas provocaram aparecimento de alterações eletrográficas e comportamentais, em intensidades diferentes. As toxinas 3-IV, 1-V, 24-V e 28-V causaram lesão neuronal significativa em CA4 ipsi e contralateral. A toxina Tb 4-V induziu efeito epileptogênico mais pronunciado e por isso foi estudada pela técnica de microdiálise para dosagem de aminoácidos neurotransmissores e mobilização de cálcio intracelular por microscopia confocal. Sua administração provocou aumento diferencial do glutamato nos indivíduos observados e aumento da mobilização de cálcio citoplásmico em algumas fatias hipocâmpais. Além disso, a toxina 4-V, principalmente, apresentou marcado efeito “tudo ou nada”. Portanto, as toxinas provenientes do veneno do *Tityus bahiensis* podem ser úteis ferramentas para o estudo da fisiologia dos canais iônicos e fisiologia neural.

**Palavras-chave:** *Tityus bahiensis*, toxinas escorpiônicas, microdiálise, microscopia confocal.

## ABSTRACT

*Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* are the scorpions of medical importance in Brazil. However, there are few studies about effects of *Tityus bahiensis* venom mainly in central nervous system. The scorpion venom are composed by neurotoxins that are polipeptides of low molecular weight. In previous studies, the venom of *Tityus bahiensis* showed to be convulsive and with characteristics distinct from *Tityus serrulatus*. Four fractions were studied and presented interesting results like behaviour and electroencephalografics alterations, neuronal loss. The presented work aimed to study the hippocampal effects of the toxins isolated from these fractions in rats. They were separated on reverse-phase column by HPLC and the peaks with higher profit were used in experiments. Cannulas and electrodes were implanted in the hippocampus of Wistar male rats. Each group received 1 $\mu$ l of toxin solution (1 or 2 $\mu$ g/ $\mu$ l) or Ringer solution (control group) and was submitted to behavioral, electrographic and histological analysis. All the toxins studied evoked electrographic and behavioral alterations in different intensity. The toxins 3-IV, 1-V, 24-V and 28-V caused significant neuronal loss in CA4 ipsi and contralateral hippocampal areas. Since toxin 4-V induced more pronounced epileptic-like effect, other experiments were realized with it such as intracerebral neurotransmitters assessment through microdialysis technique and intracellular calcium mobilization through confocal microscopy. The toxin provoked enhanced extracellular levels of glutamate in rats and cytoplasmatic calcium mobilization in half of hippocampal slices. Moreover, toxin 4-V, mainly, presented marked "all or none" effect. Thus, toxins from *Tityus bahiensis* may be useful tools to study the physiology of ionic channels and neuronal hodology.

**Key words:** *Tityus bahiensis*, scorpion toxins, microdialysis, confocal microscopy.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – serotonina

AAE – aminoácidos excitatórios

ACh – acetilcolina

AMC – área mastigatória cortical

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propionico,

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

Tb – *Tityus bahiensis*

CA – Corno de Ammon

Ca<sup>2+</sup> – íons de cálcio

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

Da – Dalton (unidade de medida de massa atômica)

DL<sub>50</sub> – Dose que provoca a morte de 50% da população em estudo

DLM – dose letal mínima

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

GABA – ácido gama aminobutírico

GD – giro denteado

H<sup>+</sup> – hidrogênio

HPLC – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

III-8b – toxina III-8 bahiensis

IV-5b – toxina IV-5 bahiensis

mGluR – receptor glutamatérgico metabotrópico

MnCl<sub>2</sub> – Cloreto de manganês

Na<sup>+</sup> – sódio

NMDA – N-metil D-Aspartato

pH – potencial hidrogeniônico

RyR – receptores de rianodina

RyR1 – receptores de rianodina 1

RyR2 – receptores de rianodina 2

RyR3 – receptores de rianodina 3

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC – Sistema Nervoso Central

TbTx-VI – toxina VI bahiensis

TsTX – Tityustoxina

WDS – wet dog shake

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Alterações comportamentais observadas após a injeção intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> .....	53
Tabela 2: Alterações eletrográficas observadas após a injeção intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do 'pool' V do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> .....	54
Tabela 3: Alterações eletrográficas observadas após a injeção intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do 'pool' V do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> .....	55
Figura 1: <i>Tityus bahiensis</i> .....	17
Figura 2: Localização de sítios receptores das neurotoxinas escorpiônicas dos tipos $\alpha$ e $\beta$ e seus sítios de ligação em canais de sódio de mamíferos.....	20
Figura 3: Corte coronal da região hipocampal identificando as subregiões: CA1, CA3 e CA4.....	28
Figura 4: Circuito trissináptico. Corno de Ammon (CA) e giro denteado (GD) .....	30
Figura 5: Separação do veneno bruto do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em 6 frações através da coluna de gel Sephadex G50.....	39
Figura 6: Exemplos das alterações eletrográficas quantificadas.....	56
Figura 7: Análise histológica das regiões CA1, CA3 e CA4 ipsi e contralaterais após administração intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> .....	58
Figura 8: Níveis hipocampais de glutamato, glicina e GABA em ratos machos submetidos à injeção intracerebral da toxina 4-V.....	60
Figura 9: Níveis individuais de glutamato hipocampal.....	61
Figura 10: Níveis individuais de GABA hipocampal.....	62

Figura 11: Níveis individuais de glicina hipocampal.....	63
Figura 12: Diferentes perfis da variação percentual de cálcio citosólico, em relação ao tempo zero, dado pela fluorescência em microscopia confocal após a aplicação da toxina 4-V obtida do 'pool' V do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> .....	65
Figura 13: Exemplo de aumento ocorrida em metade das amostras em que foi feita a aplicação da toxina 4-V isolada do 'pool' V do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> da quantidade de cálcio citosólico em fatias hipocampais visualizadas em microscópio óptico.....	65
Figura 14: Exemplo da não variação ocorrida em metade das amostras em que foi feita a aplicação da toxina 4-V isolada do 'pool' V do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> da quantidade de cálcio citosólico em fatias hipocampais visualizadas em microscópio óptico.....	66

## ÍNDICE

1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. Material e Métodos.....	36
3.1. Animais experimentais.....	36
3.2. Toxinas, drogas e reagentes.....	36
3.3. Procedimentos.....	38
3.3.1. Obtenção dos “pools” e purificação das toxinas.....	38
3.3.2. Procedimento cirúrgico para implantação de cânulas e eletrodos.....	40
3.3.3. Injeção intrahipocampal e registro da atividade elétrica cerebral.....	41
3.3.4. Perfusão e desidratação cerebral.....	41
3.3.5. Inclusão cerebral em Paraplast e análise histopatológica.....	42
3.3.6. Microdiálise.....	43
3.3.7. Dosagem dos níveis cerebrais de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	43
3.3.8. Microscopia confocal.....	45
3.3.9. Mobilização de cálcio por microscopia confocal.....	46
3.4. Delineamento Experimental.....	47
3.4.1. Experimento 1 – Avaliação eletrográfica e comportamental após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em ratos.....	47
3.4.2. Experimento 2 – Avaliação da lesão neuronal após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em ratos.....	48

3.4.3. Experimento 3 - Dosagem de aminoácidos neurotransmissores após injeção intrahipocampal da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em ratos. ....	48
3.4.4. Experimento 4 – Avaliação do efeito da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> na mobilização de cálcio pela técnica de microscopia confocal em fatias de hipocampo de ratos.....	49
3.5. Análises Estatísticas.....	49
4. Resultados.....	50
4.1. Experimento 1 – Avaliação eletrográfica e comportamental após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em ratos.....	50
4.2. Experimento 2 – Avaliação da lesão neuronal após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em ratos.....	56
4.3. Experimento 3 - Dosagem de aminoácidos neurotransmissores após injeção intrahipocampal da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> em ratos.....	59
4.4. Experimento 4 – Avaliação do efeito da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> na mobilização de cálcio pela técnica de microscopia confocal em fatias de hipocampo de ratos.....	64
5. Discussão.....	67
6. Conclusão.....	84
7. Referências Bibliográficas.....	85

## 1. Introdução

Os escorpiões são artrópodes pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida e ordem Scorpiones (Méier e White, 1995). São animais muito antigos sendo que os primeiros fósseis datam do período Siluriano, há cerca de 400 milhões de anos (Lucas e Silva Júnior, 1992; Tian *et al.*, 2008) e, portanto, são considerados os aracnídeos mais antigos que se conhece (Stormer, 1963). Os registros fósseis indicam muitos representantes destes animais e um ponto controverso é se os escorpiões primitivos eram terrestres ou aquáticos (Scholtz e Kamenz, 2006).

No entanto, já em 1963, Stormer afirmava que estes seriam provavelmente os primeiros aracnídeos a habitarem a terra firme. Um achado que reforça a afirmação de Stormer são as evidências fósseis que mostram semelhanças entre os escorpiões atuais com euriptéridos aquáticos (Braddy *et al.*, 1999). Recentemente, Braddy *et al.* (2008) encontraram uma quelícera de aproximadamente 46cm do euriptérideo *Jaekelopterus rhenaniae* (“escorpião marinho”) do período Devoniano revelando que o comprimento destes animais chegava a 2,5m. O gigantismo dos artrópodes terrestres da era Paleozóica é geralmente atribuído aos elevados níveis de oxigênio na atmosfera enquanto o gigantismo aquático deve-se a fatores extrínsecos tais como recursos ambientais, predação e competição (Braddy *et al.*, 2008). Embora menores, as espécies atuais apresentam grande semelhança com os ancestrais (Lucas e Silva Júnior, 1992).

A classe Arachnida, além da Hexapoda, foi a que mais obteve sucesso terrestre entre os grupos de artrópodes em termos de número de espécie, abundância de indivíduos e diversidade ecológica. Uma das adaptações fundamentais para a vida terrestre dos que compõem esta classe é o pulmão foliáceo opistosomal, presente nos integrantes da ordem Scorpiones e Tetrapulmonata (Scholtz e Kamenz, 2006). Kamenz *et al.* (2008) verificaram que estes pulmões apresentam minúsculos pilares cuticulares que separam as

lamelas pulmonares adjacentes e criam um espaço aéreo permanente. São adaptações convergentes à respiração aérea que se estendem por todo o opistossoma (Scholtz e Kamenz, 2006).

Os escorpiões habitam todos os continentes, exceto a Antártica, e encontram-se em todas as latitudes, vivendo em terra firme e em quase todos os ecossistemas terrestres, como desertos, savanas, florestas temperadas e tropicais (Cruz, 1994). Algumas espécies são encontradas ao nível do mar enquanto outras em regiões montanhosas (Borges *et al.*, 2007) ou em regiões quentes e temperadas da Terra, dando preferência aos ambientes áridos onde ocorre uma grande diversidade de espécies (Lucas e Silva Júnior, 1992). Estão adaptados a sobreviver em ambientes termais extremos, às vezes constituindo a maior parte do total de biomassa animal nestes ambientes (Polis, 1990)

Durante o dia estes animais escondem-se embaixo de rochas, pedaços de madeira, dentro de tronco de árvores, no solo úmido ou até mesmo sob as areias dos desertos (Candido, 1999). Várias espécies são habitantes de cavernas, outras vivem ao longo das praias e na zona das marés (Polis, 1990). Podem ser encontrados em galerias subterrâneas para abrigar-se da luz solar e obter umidade e temperatura estáveis ou viverem próximos às construções humanas (Cendrero, 1971) as quais possuem condições que favorecem a propagação e multiplicação dos escorpiões (Bücherl, 1971), tais como lixo e entulho (Cendredo, 1971).

Alcançam a maturidade em três anos podendo viver de cinco a oito anos e seu crescimento é feito por sucessivas trocas de pele (Bücherl, 1971). Alimentam-se de insetos, artrópodes e até mesmo outros escorpiões e seu veneno é usado na captura destes e na defesa contra predadores (Inceoglu *et al.*, 2003). Podem viver sem comida por vários meses, mas precisam sempre de água fresca. São caçadores noturnos e não enxergam muito bem (Bücherl, 1971).

Reproduzem-se sexuadamente, entretanto, das quase 1500 espécies distribuídas pelo mundo, não menos que 8 espécies são partenogênicas

(Lourenço, 2000). O primeiro a ser descrito por realizar partenogênese foi o escorpião *Tityus serrulatus* (Bücherl, 1956; Matthiesen, 1963), porém a existência de macho desta espécie existe de fato e foi baseada em dois espécimes coletados no norte de Minas Gerais (De Souza *et al.*, 2009).

Das 13 famílias de escorpiões existentes em todo o mundo (Soleglad e Fet, 2003), a família *Buthidae* é a mais importante do ponto de vista epidemiológico, pois a ela pertencem as 25 espécies consideradas perigosas para o homem. No Brasil, os representantes desta família pertencem ao gênero *Tityus* e, de acordo com a Fundação Nacional da Saúde (FUNASA, 2001), representam cerca de 60% da fauna escorpiônica neotropical, com maior número de espécies descritas dentro da ordem Scorpiones (Fet *et al.*, 2000).

Desde 1988, quando houve implantação da notificação dos acidentes escorpiônicos no Brasil, o número de casos tem aumentado significativamente (FUNASA, 2001). Durante o período de 1988 a 1993, foram notificados 30.109 casos, com tendência para aumento no número de incidentes (Fan *et al.*, 1996). Somente no ano de 2006 o Ministério da Saúde notificou mais de 38.000 casos de acidentes por escorpiões, correspondendo a 38,8% dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil. Esse índice é maior que o de acidentes ofídicos que é de 29,3% e por aranhas que é de 19,2% (SINAN, 2008). O maior número de notificações provém das regiões Nordeste e Sudeste do país, sendo os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Alagoas e Pernambuco responsáveis por grande parte dos acidentes escorpiônicos (Wen e Santalucia, 2005).

Os acidentes podem ser classificados em leve, moderado ou intenso, de acordo com a severidade das manifestações clínicas (FUNASA, 2001) e vários fatores influenciam na gravidade dos acidentes, dentre eles, o local da picada, espécie e tamanho do escorpião, quantidade de veneno inoculado, massa corpórea da vítima, estação do ano em que ocorreu o acidente, idade e sensibilidade da vítima ao veneno do animal (Magalhães, 1946; Amaral *et al.*,

1993,1994; Bouaziz *et al.*, 1996; Fernandez-Bouzas *et al.*, 2000, Osnaya-Romero *et al.*, 2001; Mesquita *et a.l.*, 2003).

A maioria dos pacientes picados por escorpiões, o que corresponde a 90% dos acidentados, apresenta somente dor e parestesia no local da picada (Bucarechi, 1990; Fan *et al.*, 1996). No entanto, náuseas, vômitos, dor abdominal, sialorreia, arritmias cardíacas, hipertensão ou hipotensão, choque, edema agudo de pulmão, tremores e confusão mental também são achados clínicos frequentes (Hering *et al.*, 1987; Amaral *et al.*, 1993; Bucarechi *et al.*, 1995; Amitai, 1998; Saldarriaga *et al.*, 2000; Troncon *et al.*, 2000; FUNASA, 2001; Mesquita *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2005).

As mais importantes espécies de escorpião existentes no Brasil são *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e *Tityus metuendus* (Fan *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2002). A espécie *Tityus serrulatus* é considerada a mais peçonhenta da América do Sul devido à alta toxicidade do seu veneno (Lucas e Silva Júnior, 1992) e, portanto, diversos estudos sobre seu veneno e toxinas são encontrados em literatura. No entanto, Lourenço *et al.* (2002) mostraram que o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* (Figura 1), segundo causador de acidentes no Brasil, é extremamente convulsivante e com características distintas das do *Tityus serrulatus*. Acidentes com esta espécie de escorpião também podem evoluir para óbitos. Entre os anos de 1988 e 1989, segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 1992), 22 mortes ocorreram nos Estados de São Paulo e Minas Gerais devido a acidentes com *Tityus bahiensis*, sendo a maioria dos casos com crianças menores de 15 anos.



**Figura 1.** *Tityus bahiensis*.

No envenenamento severo por *Tityus bahiensis*, os sintomas encontrados são alterações no ritmo cardíaco e respiratório, podendo progredir para falência cardíaca, edema pulmonar e choque, acompanhados de vômitos frequentes e diarreia, salivação excessiva, hipertensão arterial, agitação alternada com prostração, tremor (Brasil, 1993) e, por vezes, convulsão (Freire-Maia e Campos, 1989; Ismail *et al.*, 1990). Entretanto, assim como outros membros do gênero *Tityus*, o *Tityus bahiensis* inocula apenas uma pequena quantidade de veneno a cada picada e por isso a maioria dos acidentes envolvendo adultos não é letal.

A principal diferença no quadro de envenenamento experimental entre o veneno dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* é a presença de sintomas convulsivos logo após a injeção do veneno do *Tityus bahiensis*, mesmo em pequenas doses (0,5mg/kg). Além disso, o veneno do *Tityus serrulatus* mata os animais num pequeno espaço de tempo e o veneno do *Tityus bahiensis* produz inúmeras convulsões nos animais até levá-los a óbito,

sendo que pouco menos de 20% dos animais morre na primeira hora após a injeção (Lourenço, 2002). A porcentagem de envenenamentos severos causados por *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* é cerca de 0,4% e 4,3%, respectivamente (Freire-Maia *et al.*, 1994), afetando principalmente crianças e idosos (Freire-Maia *et al.*, 1994; Bucarechi *et al.*, 1995; Tamassone *et al.*, 2007; Januário *et al.*, 1996 ).

Os sintomas encontrados após o acidente escorpiônico devem-se principalmente à complexa interação entre estimulação simpática e parassimpática (Amitai, 1998) com liberação de mediadores como adrenalina, noradrenalina e acetilcolina (revisto por Dorce e Sandoval, 1992). O mecanismo predominante da ação da toxina escorpiônica depende da espécie causadora do acidente assim como a quantidade de peçonha inoculada (Reeves, 1998).

Além dos efeitos periféricos observados após a picada, há evidências clínicas e experimentais de que o veneno e suas toxinas têm ação sobre o sistema nervoso central (SNC). Em 1971, Bücherl observou que a injeção sistêmica de veneno de escorpiões do gênero *Tityus* provocava convulsões em camundongos. Convulsões tônico-clônicas generalizadas foram observadas em ratos após injeção intrahipocampal do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* (Sandoval e Dorce, 1993). Em 2002, Lourenço *et al.* mostraram que o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* possuía potencial convulsivante maior que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e que frações purificadas deste mesmo veneno, quando administradas por via endovenosa, tinham atividade convulsivante agindo direta ou indiretamente no SNC ou causavam lesões neuronais.

Venenos escorpiônicos são uma mistura aquosa contendo muco, sais inorgânicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular e pequenas proteínas básicas, as neurotoxinas (Inceoglu *et al.*, 2003). Cada veneno de escorpião pode conter várias neurotoxinas, as quais são polipeptídeos básicos sem ação enzimática com peso molecular por volta de 7000 Da constituídas por

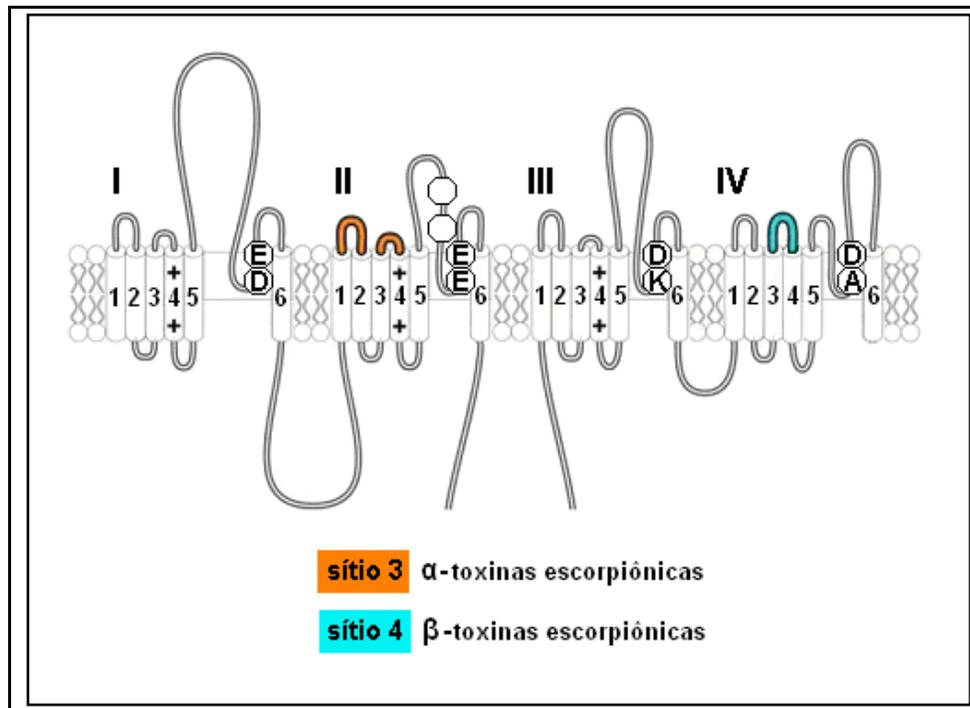
cadeias únicas ligadas por pontes dissulfídicas (Couraud e Jover, 1984), responsáveis pela toxicidade do veneno.

Os escorpiões desenvolveram venenos ricos em toxinas, que afetam diversos tipos de canais iônicos de membranas excitáveis, como armas para presa e defesa (Tian *et al.*, 2008). Estas neurotoxinas atuam especificamente em diversos organismos como insetos, crustáceos e mamíferos (Catterall, 1980; Rochat *et al.*, 1979; Vasquez *et al.*, 1995; Pintar *et al.*, 1999; Gwee *et al.*, 2002; Gurevitz *et al.*, 2007), alterando a permeabilidade a íons nas células excitáveis e promovendo a liberação de neurotransmissores por se ligarem a sítios específicos nos canais iônicos.

Das toxinas que agem em mamíferos, quatro famílias são descritas como tendo especificidade de ligação em receptores de membrana de canais iônicos. As duas famílias mais estudadas são as que interferem em canais de sódio (Catterall, 1980 e 1988; Rochat *et al.*, 1979) e em canais de potássio (Carbone *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2003). As outras duas, descobertas e estudadas mais tardiamente, são as que interferem em canais de cloreto (De Bin *et al.*, 1993; Lippens *et al.*, 1995) e em canais de cálcio (Valdívia *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2004; Shahbazzadel *et al.*, 2007).

As principais neurotoxinas escorpiônicas agem em canais de sódio dependentes de voltagem, responsáveis pelo início e propagação do potencial de ação em células excitáveis como células nervosas, musculares e neuroendócrinas. Estes canais são alvos moleculares para vários grupos de neurotoxinas que alteram sua função por se ligarem a sítios específicos (Cestèle e Catterall, 2000).

Os polipeptídeos tóxicos são compostos por 58-76 resíduos de aminoácidos estabilizados por 4 pontes dissulfídicas (Jover *et al.*, 1980; Possani *et al.*, 1999, 2000; De la Vega e Possani, 2005; Becerril *et al.*, 1997) e diferenciam-se em  $\alpha$  e  $\beta$  de acordo com o sítio de ligação no canal (Jover *et al.*, 1980; Kalapothakis e Olórtégui, 1997; Cestèle e Catterall, 2000).



**Figura 2.** Localização de sítios receptores das neurotoxinas escorpiônicas dos tipos  $\alpha$  e  $\beta$  e seus sítios de ligação em canais de sódio de mamíferos (modificado de King *et al.*, 2008)

As toxinas do tipo  $\alpha$  se ligam ao sítio 3 do canal de sódio (Figura 2) de maneira dependente de voltagem e são responsáveis por lentificar ou bloquear o mecanismo de inativação deste canal prolongando, portanto, o tempo em que permanece aberto (Catterall, 1986; Bergman *et al.*, 1976; Cestèle e Catterall, 2000; Campos *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008). As toxinas do tipo  $\beta$  se ligam ao sítio 4 do canal de sódio (Figura 2) e alteram o limiar para potenciais mais negativos ocasionando, assim, uma maior tendência da célula a disparar potenciais de ação espontânea e repetitivamente, independentemente do potencial de repouso da célula (Conceição *et al.*, 1998; Lee e Adams, 2000; De La Vega e Possani, 2007; Couraud e Jover, 1984; Rochat *et al.*, 1984; Tian *et al.*, 2008)

As toxinas específicas para canais de potássio possuem de 31 a 39 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 (Dauplais *et al.*, 1995) ou 4 pontes

dissulfídicas (Olamendi-Portugal, 1996) e obstruem o poro dos canais de potássio retardando a repolarização da célula (Carbone *et al.*, 1982; Strong *et al.*, 1989). Sendo assim, há um aumento na liberação de neurotransmissores (Castle *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 2000; De la Vega e Possani, 2004). Os canais de potássio exercem papel importante nas respostas elétricas do sistema nervoso determinando a duração do potencial de ação e a frequência de disparos de potenciais de ação (Hille, 2001; Mitterdorfer e Bean, 2002). Além disso, são responsáveis pelo retorno do potencial da célula aos valores do repouso ou mais negativos e na regulação da excitabilidade de neurônios individuais (Mathie *et al.*, 2003).

Indiretamente, as  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas também podem ativar um ou mais tipos de canais de cálcio, dependendo do sítio de ligação destas toxinas no canal de sódio. Além do mais, há toxinas escorpiônicas que possuem atividade sobre receptores de rianodina (RyR) promovendo a liberação do estoque do íons de cálcio (Valdívia *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2004; Shahbazzadeh *et al.*, 2007). Receptores de rianodina são canais de liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático envolvidos em diversas respostas celulares (van de Vrede *et al.*, 2007; Shirokova e Niggli, 2008) e são expressos em três isoformas: RyR1, RyR2 e RyR3. Todas estas isoformas estão presentes em neurônios piramidais de CA1 do hipocampo, principalmente RyR3 (van de Vrede *et al.*, 2007).

Dos escorpiões do gênero *Tityus*, somente o *Tityus serrulatus* foi extensamente estudado, porém nos últimos anos cresceu o interesse pelo estudo do veneno e toxinas de outros escorpiões do mesmo gênero. Estudos mostram semelhanças bioquímicas entre os venenos das diferentes espécies de escorpiões do gênero *Tityus* (Trequattrini *et al.*, 1995). A purificação e sequenciamento de toxinas do veneno do *Tityus bahiensis* foram realizadas inicialmente por Becerril *et al.* (1996) que as compararam às toxinas já bem caracterizadas do veneno do *Tityus serrulatus*. Dez por cento da parte solúvel do veneno do *Tityus bahiensis* é composta pela toxina  $\gamma$ -bahiensis que tem 95% de homologia com a toxina  $\gamma$  do *Tityus serrulatus* (Becerril *et al.*, 1997). As

toxinas III-8 bahiensis (III-8b), IV-5 bahiensis (IV-5b) e TbTx-VI também foram isoladas e verificou-se que a toxina IV-5 bahiensis tem 80% de homologia com a toxina IV-5 do *Tityus serrulatus* (Trequattrini *et al.*, 1995).

A pesquisa do veneno do *Tityus bahiensis* começou a se intensificar com o estudo dos efeitos imunológicos do veneno para produção de soro em acidentes causados por *Tityus serrulatus* (Nishikawa *et al.*, 1994), mas ainda são encontrados poucos trabalhos focados na purificação e sequenciamento e no esclarecimento do mecanismo de ação e efeito das toxinas que compõe o veneno do *Tityus bahiensis* (Becerril *et al.*, 1996; 1997; Trequattrini *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 2002).

Como antes mencionado, os sintomas observados após o envenenamento escorpiônico são conseqüentes à liberação de neurotransmissores que ocorre após a ligação das neurotoxinas aos canais iônicos, principalmente aos de sódio (Coutinho-Netto *et al.*, 1980; Olney, 1985; Champetier de Ribes, 1985; Choi, 1988; Meldrum, 1991; 1995; Gomez *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996; Bicalho *et al.*, 2002). Devido a isto, neurotoxinas escorpiônicas têm sido ferramentas úteis para o estudo dos canais iônicos (Leipold *et al.*, 2007) como sua identificação e purificação de seus componentes protéicos (Catterall *et al.*, 1982; Sampaio *et al.*, 1997; Anderson e Greenberg, 2001) assim como estabelecer a relação entre a toxina e o canal (Cestèle *et al.*, 2006), pois qualquer alteração na função destes causa profunda consequência fisiológica (Mathie *et al.*, 2003) como, por exemplo, convulsões.

Diversos mecanismos têm sido implicados na gênese das convulsões incluindo diminuição na potência da inibição GABAérgica, somação de sinapses excitatórias e ativação de canais sensíveis à voltagem. Estes mecanismos levam ao disparo de uma população limitada de neurônios. Se a descarga for intensa o suficiente e ocorrer em certos neurônios, o surto inicial pode se espalhar de seu local de origem, através das conexões excitatórias, à outras áreas incapazes de originar descargas por si só (Lothman *et al.*, 1991).

A relação entre excitação e inibição é importante no estudo das convulsões, pois a atividade epiléptica parece ser proveniente de alterações no balanço entre elas. Os mecanismos provavelmente envolvidos neste desequilíbrio são os mecanismos inibitório GABAérgico e o excitatório glutamatérgico, particularmente aqueles envolvendo receptores NMDA (Bradford, 1995). O funcionamento normal do cérebro depende do balanço destes mecanismos e qualquer distúrbio que favoreça a excitação pode levar a uma atividade neuronal excessiva e sincronizada semelhante às descargas epileptiformes humanas (Gerfin-Moser *et al.*, 1995).

Os aminoácidos glutamato e aspartato são os principais neurotransmissores excitatórios rápidos do sistema nervoso central de mamíferos (Williams *et al.*, 1990; Nedergaard *et al.*, 2002) e acredita-se que sejam responsáveis pela maioria dos potenciais pós-sinápticos excitatórios em todo o cérebro e medula (McBain e Mayer, 1994). Uma desordem na neurotransmissão excitatória mediada por glutamato é considerada o fator central na etiologia de algumas formas de epilepsias humana e experimental (Meldrum, 2000; Silva e Cavalheiro, 2004).

Em 1954, Hayashi mostrou que injeções intracerebrais de glutamato produziam convulsões. Várias evidências favorecem a idéia de que danos cerebrais são iniciados pela ativação excessiva de receptores glutamatérgicos endógenos (Olney, 1985).

Os aminoácidos excitatórios (AAE) agem em receptores ionotrópicos (iGluRs) como NMDA, AMPA e cainato e em receptores metabotrópicos (mGluRs) (Schoepp *et al.*, 1995). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos permeáveis a cátions (Meldrum, 2000) e medeiam diretamente a sinalização elétrica das células nervosas (Knöpfel *et al.*, 1995). Os metabotrópicos são acoplados à proteína G ligados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares (Michaelis, 1998; Tapia *et al.*, 1999; Rang *et al.*, 2006). A ação do glutamato em receptores NMDA, AMPA ou mGluR1 pode contribuir para o dano cerebral que ocorre após *status epilepticus*, isquemia cerebral ou injúria

cerebral traumática (Meldrum, 2002). A transmissão sináptica excitatória que ocorre no hipocampo é mediada por receptores NMDA, AMPA e cainato (McBain e Dingledine, 1992).

Quando a importância e a ampla distribuição do sistema inibitório mediado pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) se tornaram bastante apreciadas, a pesquisa sobre epilepsia centrou-se na deficiência do sistema GABAérgico como uma possível causa primária desta condição (Roberts, 1984; Meldrum, 1989). No entanto, a diminuição dos níveis do principal neurotransmissor inibitório central apenas contribui para a atividade convulsiva (Gale, 1989; Meldrum, 1990).

A diminuição na potência da inibição GABAérgica está associada à epilepsia (Fariello *et al.*, 1991) já que a atividade GABAérgica regula a atividade glutamatérgica (Hertz, 2006). Drogas que aumentam a função GABAérgica ou agonistas de GABA são usadas no tratamento da epilepsia (Olsen, 1981). Várias são as evidências que sugerem o envolvimento do GABA na epilepsia, por outro lado, alguns estudos não encontraram alterações em populações de interneurônios GABAérgicos em hipocampo epiléptico de humanos (Babb *et al.*, 1989; Kumlien, 1994).

A maioria dos estudos sobre convulsão baseia-se nos mecanismos glutamatérgico e GABAérgico, mas atualmente os estudos são direcionados a outros sistemas a fim de descobrir todos os mecanismos envolvidos nos processos convulsivos.

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor amplamente difundido no SNC, no periférico e no autonômo (Amenta e Tayebati, 2008) e seus efeitos excitatórios são mediados por vários subtipos de receptores nicotínicos (ionotrópicos) ou muscarínicos (acoplados à proteína G) (Rang *et al.*, 2006). Há vários indícios de que alterações na função colinérgica eliciem atividade epileptiforme (Segal, 1991). Estudos bioquímicos com pilocarpina, um agonista muscarínico, mostraram indução de atividade epiléptica similar à epilepsia do lobo temporal em humanos (Turski *et al.*, 1983; Freitas *et al.*, 2003; Smith e

Shibley, 2002; Zimmerman *et al.*, 2008). Alterações nos aminoácidos das proteínas que compõem os receptores nicotínicos diminuem a resposta a este neurotransmissor de maneira dependente de cálcio e esse efeito promove excitabilidade, podendo gerar crises epilépticas (Heron *et al.*, 2007). Em 2008, Zimmerman *et al.* mostraram que baixas concentrações de ACh induzem atividade semelhante a convulsão e atividade interictal prolongada mediada por via muscarínica.

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma monoamina que age como neurotransmissor no sistema nervoso (Kandel *et al.*, 2003a) e participa de diversas funções incluindo sono, cognição, percepção sensorial, atividade motora, humor, apetite, entre outras (Goodman e Gilman, 2006). Seu papel nas convulsões é controverso (Bagdy *et al.*, 2007), pois os neurônios serotoninérgicos modulam a atividade dos neurônios corticais e subcorticais ativando diferentes subtipos de receptores: alguns excitatórios, outros inibitórios e alguns dos dois tipos (Kandel *et al.*, 2003a). Geralmente a 5-HT é vista como um neurotransmissor inibitório, já que o aumento da função serotoninérgica retarda a geração e tempo de duração da convulsão (López-Meraz *et al.*, 2005) e sua diminuição aumenta a susceptibilidade à convulsão (Waterhouse, 1986; Peterson e Albertson, 1982).

A glicina, assim como o GABA, é um clássico neurotransmissor inibitório encontrado nos interneurônios do corno dorsal (Betz, 1991), mas também é encontrada na medula espinhal e tronco cerebral (Goodman e Gilman, 2006; Rang *et al.*, 2006).

No SNC, a noradrenalina é um transmissor em neurônios cujos corpos celulares localizam-se principalmente no *locus ceruleus* (Giorgi *et al.*, 2004), um núcleo do tronco encefálico com muitas e complexas funções modulatórias (Kandel *et al.*, 2003b). Embora em poucos números, esses neurônios noradrenérgicos se projetam difusamente por todo o córtex, cerebelo e medula espinhal (Kandel *et al.*, 2003b). O papel da noradrenalina endógena durante convulsões experimentais foi identificado por estudos pré-clínicos realizados

com diversos tipos de anticonvulsivantes e que mostraram um efeito atenuante nas convulsões (Giorgi *et al.*, 2004). Essa função antiepiléptica da noradrenalina endógena foi pressuposta a partir de estudos que mostraram o efeito deletério de um dano do sistema noradrenérgico nas convulsões induzidas por estimulação elétrica ou administração sistêmica de anticonvulsivantes (McIntyre, 1980; Corcoran, 1988).

No *status epilepticus*, o glutamato, aspartato e acetilcolina exercem os principais papéis como neurotransmissores excitatórios e o GABA é o neurotransmissor inibitório predominante (Wasterlain *et al.*, 1993). No entanto, independente do sistema de neurotransmissão envolvido (Wasterlain *et al.*, 1993), sabe-se que após convulsões epilépticas prolongadas há morte neuronal, por excitotoxicidade, em estruturas límbicas (Fujikawa *et al.*, 2000), principalmente na amígdala e formação hipocampal (Carpenter, 1978).

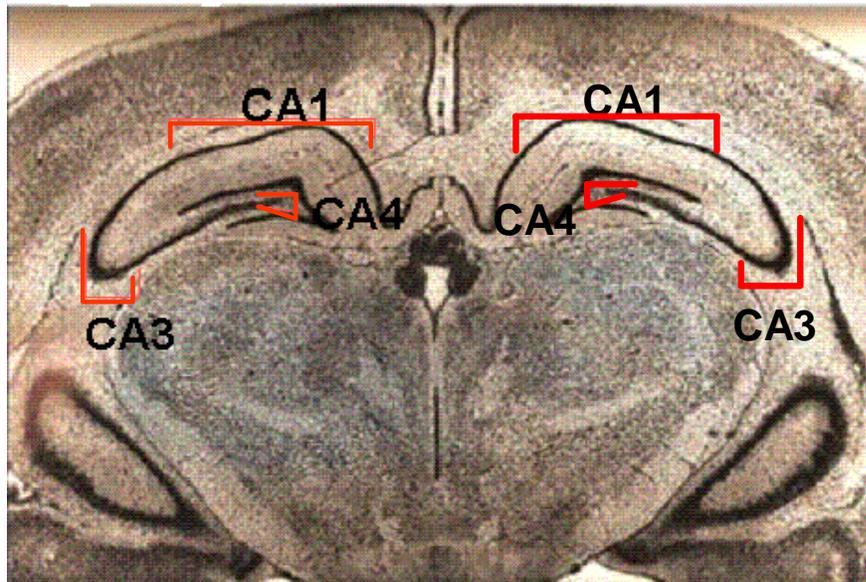
Na excitotoxicidade clássica, níveis extracelulares elevados de glutamato causam despolarização persistente do neurônio desencadeando uma cascata de eventos celulares que eventualmente levam à morte celular. A despolarização promovida pelo excesso de glutamato ativa canais de cálcio e provoca, conseqüentemente, a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Choi, 1988) resultando em uma acidificação intracelular por mecanismos ainda não conhecidos (Wu *et al.*, 1999). Esta acidose intracelular estimula diversos mecanismos de regulação do pH, incluindo a troca  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Grinstein *et al.*, 1992) e se esta troca for persistentemente ativa haverá uma sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por reversão da troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Trudeau *et al.*, 1999). A elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode exacerbar o processo de morte celular (Choi, 1987; Stout *et al.*, 1998) pela ativação de proteases, endonucleases e fosfolipases causando danos irreversíveis na membrana plasmática, citoesqueleto, núcleo e mitocôndrias (Scatton, 1994; Niebauer e Gruenthal, 1999). A sobrecarga deste íon desenvolve um papel chave na morte neuronal durante a excitotoxicidade por glutamato (Lee *et al.*, 2009).

Entretanto, outra alternativa de morte neuronal por excitotoxicidade foi proposta por Dargent *et al.* (1996). Neste estudo, foi demonstrado que a morte neuronal pode ser provocada pela ativação persistente de canais de sódio sem mediação de glutamato ou de canais de cálcio, já que lesão provocada pela administração de uma  $\alpha$ -toxina isolada do veneno do escorpião *Androctomus australis* não foi prevenida por antagonistas de receptores glutamatérgicos, nem por antagonistas de canais de cálcio.

Inversamente à geração de morte neuronal após convulsões, a lesão em estruturas límbicas elicia episódios convulsivos (Wasterlain *et al.*, 1993). Em 1983, Corsellis e Bruton analisaram o cérebro de pacientes que foram à óbito durante ou logo após *status epilepticus* e verificaram que a região mais vulnerável do cérebro era o hipocampo. Devido à correlação entre patologia hipocampal e epilepsia crônica há um grande interesse no entendimento das mudanças estruturais do hipocampo e como elas podem causar convulsões (Lothman *et al.*, 1991).

O hipocampo (Figura 3) é uma região particularmente sensível às convulsões (Carpenter, 1978; Lothman *et al.*, 1991) e está envolvido com a fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal, o tipo mais comum de convulsão em adulto (Meurs *et al.*, 2008). A perda neuronal hipocampal tem sido a resposta para a causa ou para o efeito da convulsão, já que o *status epilepticus* grave é caracterizado por convulsões prolongadas ou repetidas frequentemente seguidas por dano neuronal que envolve o hipocampo e outras estruturas límbicas (Sutula *et al.*, 1994).

A formação hipocampal compreende um grupo de regiões corticais, incluindo o giro denteado (GD), hipocampo propriamente dito ou corno de Ammon (CA), subiculum, presubiculum, parasubiculum e córtex entorrinal (Amaral e Lavenex, 2007). O subiculum, presubiculum e parasubiculum são, algumas vezes, agrupados e recebem a denominação “complexo subicular” (Amaral e Witter, 1995).



**Figura 3.** Corte coronal da região hipocampal identificando as subregiões: CA1, CA3 e CA4 ipsilateral. Atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1998)

O corno de Ammon (Figura 3) é caracterizado por uma única camada de células piramidais que começa no hilus do giro denteado e subsequentemente se curva acima do giro denteado e termina no subiculum (Lothman *et al.*, 1991). Pode ser dividido nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 (Rogacheski *et al.*, 1998).

Os principais tipos de células neuronais do hipocampo são as células piramidais que se diferem uma das outras de acordo com sua região hipocampal. Possuem corpo celular médio a grande, um dendrito apical longo, dendritos basais opostos ao pólo e um único axônio saindo da porção basal (Lothman *et al.*, 1991). Entre este tipo celular há algumas variações que distinguem as subregiões do corno de Ammon umas das outras.

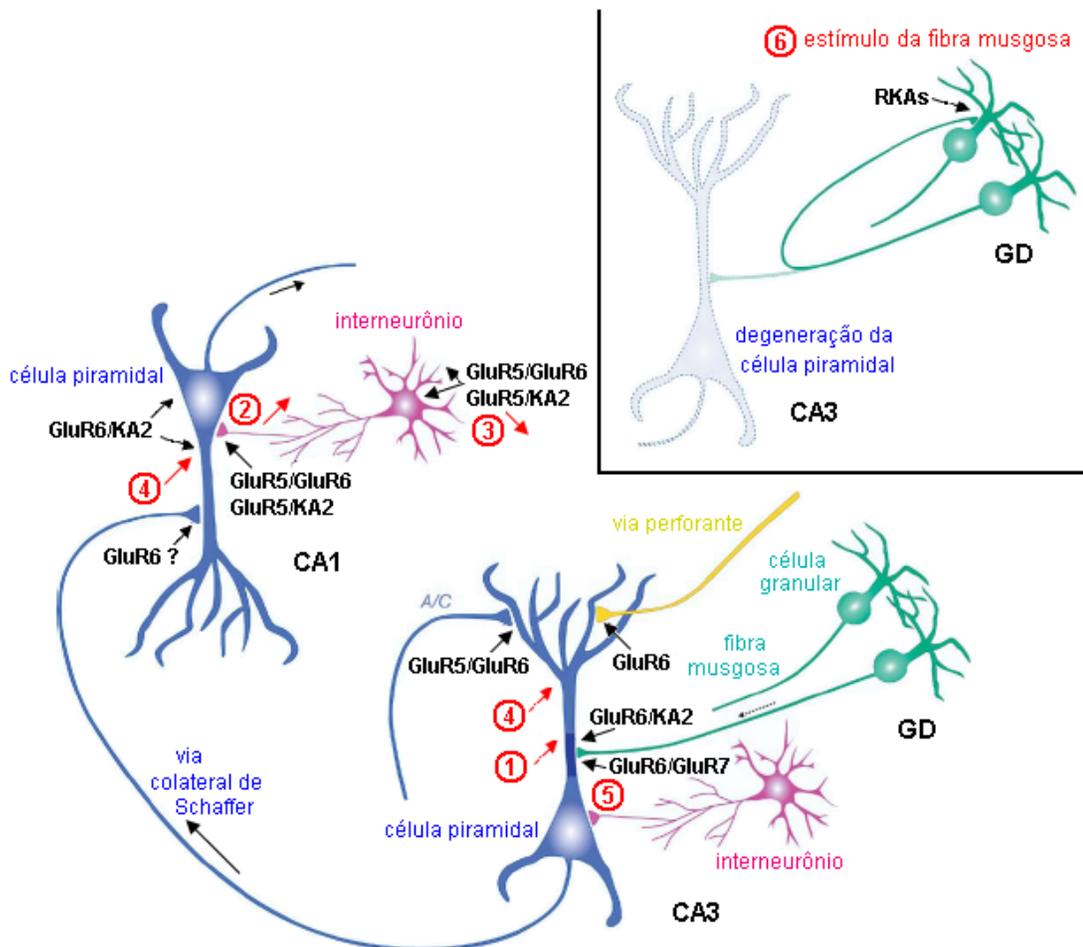
A região de CA1 (Figura 3), também chamada de setor Sommer (Rogacheski *et al.*, 1998), possui células piramidais pequenas (Amaral e Witter, 1995) e com densidade celular maior que em outras regiões hipocampais (Lothman *et al.*, 1991). Nas regiões CA2 e CA3 (Figura 3), ou setor Spielmeyer

(Rogacheski *et al.*, 1998), os tipos celulares são semelhantes, porém as células piramidais encontradas na região CA2 não possuem espinha dendrítica nos dendritos apicais proximais como as encontradas nas células da região CA3 (Lothman *et al.*, 1991). Além disso, o comprimento e organização das células piramidais de CA3 são bastante variáveis (Amaral *et al.*, 1990), com células grandes localizadas distalmente no campo (Amaral e Witter, 1995).

Outra região do corno de Ammon é o CA4 (Figura 3), ou setor Bratz (Rogacheski *et al.*, 1998), termo utilizado para designar a porção final da camada de células piramidais hipocâmpais. Esta região insere-se dentro do “V” (ou “U”) formado pelas camadas molecular e de células granulares do GD (Amaral e Witter, 1995).

A formação hipocâmpal abrange um grupo de vias excitatórias unidirecionais (Amaral e Lavenex, 2007). Acredita-se que a principal conexão intrínseca do circuito hipocâmpal seja o circuito trissináptico (Figura 4), que consiste em uma cascata excitatória que envolve o GD e as regiões hipocâmpais CA1 e CA3 (Hsiao *et al.*, 2006).

O circuito começa com neurônios do córtex entorrinal que, através da via perfurante, enviam axônios à camada molecular do GD (Resmondés, 2004) que por sua vez faz contato com as células granulares (Lorente de No, 1934; Ramón y Cajal, 1952). Esta via possui duas partes funcionais: a via temporodentada, que atravessa a fissura hipocâmpal e entra no GD, e a via temporoamônica, que permanece no corno de Ammon fazendo contato com os neurônios piramidais em CA3 e CA1 (Lucatero, 2002; Resmondés, 2004).



**Figura 4.** Circuito trissináptico. Corno de Ammon (CA) e giro denteado (GD) (modificado de Vincent e Mulle, 2009).

A via temporodenteada dá origem à primeira sinapse da via trissináptica por excitação das células granulares do GD que enviam seus axônios (as fibras musgosas) aos dendritos apicais proximais da sub-região CA3 no *stratum lucidum*. As fibras musgosas excitam as células piramidais de CA3 (segunda sinapse) que, por sua vez, enviam axônios excitatórios aos neurônios piramidais de CA1 através da via colateral de Schaeffer terminando no *stratum radiatum* (terceira sinapse) (Lothman *et al.*, 1991; Kandel *et al.*, 2003b; Lucatero, 2002).

A região CA1 é tida como a saída da área hipocampal para a extrahipocampal. O alvo primário para as eferências de CA1 é o subiculum ipsilateral com sinapses por toda a camada de células. Há projeções desta região também para o córtex entorrinal, porém com sinapses mais proeminentes na camada interna de células granulares do córtex cerebral (Lothman *et al.*, 1991).

A maioria dos axônios originados no corno de Ammon permanece dentro do complexo hipocampal ipsilateral ou contralateral à célula de origem com exceção da massiva projeção do hipocampo ao núcleo septal lateral. Axônios originados no septo medial projetam-se para todo o hipocampo, incluindo GD, CA3 e CA1. Outras origens de muitas sinapses aferentes no corno de Ammon incluem a amígdala e o núcleo talâmico central (Lothman *et al.*, 1991).

O papel exato do hipocampo na geração de convulsões é incerto, mas sabe-se que ele está envolvido em convulsões espontâneas e é frequentemente o primeiro sítio de detecção da convulsão quando há registro com eletrodos intracerebrais (Lothman *et al.*, 1991). O hipocampo também pode ser envolvido mais tardiamente, como no espraiamento das convulsões (Lothman *et al.*, 1991).

Por outro lado, o cérebro normal pode gerar convulsões com uma variedade de insultos tais como toxinas, drogas, distúrbios metabólicos ou trauma (Lothman *et al.*, 1991). Recentemente, distúrbios funcionais do sistema imune têm sido detectados com mais frequência em indivíduos epiléticos que na população geral (Elenkov *et al.*, 2005). A análise histológica do cérebro de indivíduos com epilepsia de diversas etiologias sugere fortemente a existência de um processo inflamatório crônico no cérebro.

O sistema imune também tem sido implicado como o provedor de mudanças fisiopatológicas induzidas por venenos escorpiônicos. Diversos autores (Zeghal *et al.*, 2000; De Matos *et al.*, 2001; D'Suze *et al.*, 2003; Fukuhara *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2007) relataram liberação de

prostaglandinas, catecolaminas, corticosteróides e bradicinina após a picada de escorpiões dos gêneros *Leiurus*, *Buthotus* e *Tityus*. Todos esses agentes têm sido comprovados por induzir a liberação de mediadores imunológicos tais como citocinas e quimocinas (Choursousos, 1995).

Citocinas são liberadas por macrófagos em resposta inflamatória ao envenenamento (Petricevich, 2004) e desempenham um importante papel como mediadores na síndrome da resposta inflamatória sistêmica regulando e amplificando a resposta imune, induzindo injúria tecidual e mediando complicações de reação inflamatória (Gabay e Kushner, 1999; Voronov *et al.*, 1999).

Os estímulos que iniciam a liberação de citocinas são variados, embora injúria tecidual, hemorragia, infecção e lipopolissacarídeos tenham sido demonstrados como potentes iniciadores desta resposta. Pacientes com envenenamento severo podem desenvolver uma resposta semelhante à síndrome da resposta inflamatória sistêmica, pois os achados clínicos destes são similares aos dos pacientes com sepsis, nos quais os níveis de mediadores pró-inflamatórios (TNF, IL-1, IL-6, PAF e eicosanóides) estão alterados (Simons e Hoyt, 1994). No caso dos pacientes com manifestações leves ou severas, Magalhães *et al.* (1999) observaram aumento somente nos níveis de IL-1 $\alpha$ .

A severidade do envenenamento poderia resultar, como efeito adverso, em uma amplificação da cascata de resposta inflamatória. Neste caso, somente o envenenamento mais severo eliciaria o início a cascata de sinais causada pela estimulação do sistema nervoso autônomo seguida da liberação de mediadores químicos culminando na expansão da secreção de citocinas. Algumas epilepsias podem originar de alterações inflamatórias, eventos

traumáticos, má-formação de canais iônicos ou doença metabólicas ou degenerativas (Eeg-Olofsson, 2003; Láson, 2006; Urbanska e Kleinrok, 1998). A desregulação e a produção excessiva de um amplo espectro de citocinas podem conduzir a degeneração de neurônios, causada pela influência neurotóxica delas, e pode induzir convulsão (Espinosa e Bermudez-Rattoni, 2001; Ravizza e Vezzani, 2006; Sdzelenyi, 2001; Vezzani e Granata, 2005).

Apesar dos diversos estudos encontrados na literatura, a ação central das frações tóxicas dos venenos escorpiônicos tem sido omitida devido ao entendimento comum de que estes peptídeos não atravessam a barreira hematoencefálica (Ismail *et al.*, 1973, 1974; Revelo *et al.*, 1996; Guidine *et al.*, 2008). Porém, em camundongos recém-nascidos, os quais ainda não têm esta barreira completamente desenvolvida, Clot-Faybesse *et al.* (2000) relataram encontrar toxinas lábeis no SNC após injeção subcutânea. Adicionalmente, após a inoculação subcutânea de TsTX, Nunan *et al.* (2003) e Guidine *et al.* (2009) observaram a presença desta toxina em cérebros de ratos jovens o que indica que a TsTX atravessou a barreira hematoencefálica.

Estes estudos sugerem uma grande importância das toxinas no SNC em envenenamentos severos, o que explicaria a maior ocorrência de acidentes desta gravidade em pacientes cuja barreira está comprometida ou não é totalmente desenvolvida (Guidine *et al.*, 2008). A concordância entre estes estudos e os dados clínicos é clara, pois os acidentes severos prevalecem em crianças e idosos. Em tais casos uma fragilidade da barreira hematoencefálica, principalmente ao nível do 4º ventrículo, onde ela é naturalmente mais permeável, comprometeria a função exercida pelos núcleos cardiovascular e respiratório (Faraci *et al.*, 1989).

Um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que frações isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* (Lourenço *et al.*, 2002), quando administradas via endovenosa, provocaram alterações centrais, reforçando os relatos de que toxinas são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Neste estudo, foi realizado um “screening” com seis frações

isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* e, destas, quatro apresentaram resultados interessantes nos parâmetros observados como alterações comportamentais, eletrográficas e lesão neuronal. Quando injetada intrahipocampalmente, a fração P4 causou lesão neuronal apenas na região CA3 do hipocampo contralateral a injeção. As frações P5 e P6 causaram convulsão comportamental e eletrográfica e extensa lesão neuronal em ratos. A fração P7 produziu convulsão comportamental e eletrográfica, porém sem causar dano neuronal.

Baseados neste trabalho, propomo-nos a estudar os efeitos que algumas toxinas isoladas das três primeiras frações citadas promovem no SNC de ratos bem como analisar o envolvimento da liberação de aminoácidos neurotransmissores e dos canais de cálcio nos processos lesivos provocados por uma das toxinas estudadas.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Estudo dos efeitos de toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* sobre o sistema nervoso central de ratos após injeção intrahipocampal.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliação da atividade elétrica cerebral após injeção intrahipocampal de toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.
- Avaliação da atividade comportamental após injeção intrahipocampal de toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.
- Avaliação da integridade neuronal nas áreas CA1, CA3 e CA4 ipsi e contralaterais à injeção após administração intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.
- Determinação dos aminoácidos neurotransmissores liberados após injeção intrahipocampal da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* por HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho) através da técnica de microdiálise.
- Avaliação das alterações citosólicas de cálcio provocadas pela toxina 4-V isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em células hipocampais de rato através de microscopia confocal.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 250g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e acomodados no biotério do laboratório de Farmacologia do mesmo Instituto. Os animais foram mantidos em caixas plásticas forradas de maravalha e fechadas com grade metálica com, no máximo, seis animais e em condições padronizadas de biotério, ou seja, temperatura controlada (20 a 22°C), ciclo de claro-escuro de 12h (com luz ligada às 7h) e água e comida à vontade. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan sob o certificado número 462/08.

#### 3.2. Toxinas, drogas e reagentes

- Toxina 3 purificada do pool IV, toxinas 1, 4, 5, 24, 27 e 28 purificadas do pool V e toxina 14 purificada do pool VI do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*
  - Solução anestésica: hidrato de cloral (4,25g), sulfato de magnésio (2,16g), tiopental (0,97g), propilenoglicol (42,8mL), álcool absoluto (11,5mL) e água destilada q.s.p. (100mL).
  - Solução transfer para microscopia confocal: KCl 4,7mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5mM; NaHPO<sub>4</sub> 1,2mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2mM; glicose 11mM; sacarose 225mM; pH 7,4.
  - Solução tampão fosfato para perfusão: 100mL solução fosfato (3,58g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 26,5g NaHPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O e água destilada q.s.p. 1000mL),

100mL solução salina (81,82g NaCl e água destilada q.s.p. 1000mL) e água destilada q.s.p. 1000mL

- Solução formol 4% para perfusão: 270mL formaldeído e 730mL de solução de sacarose (3,42g sacarose, água destilada q.s.p. 1000mL)

- Solução de derivatização: 350µl de etanol, 50µl de água ultrapura, 50µl de trietilamina e 50µl de fenil-isotiocianato

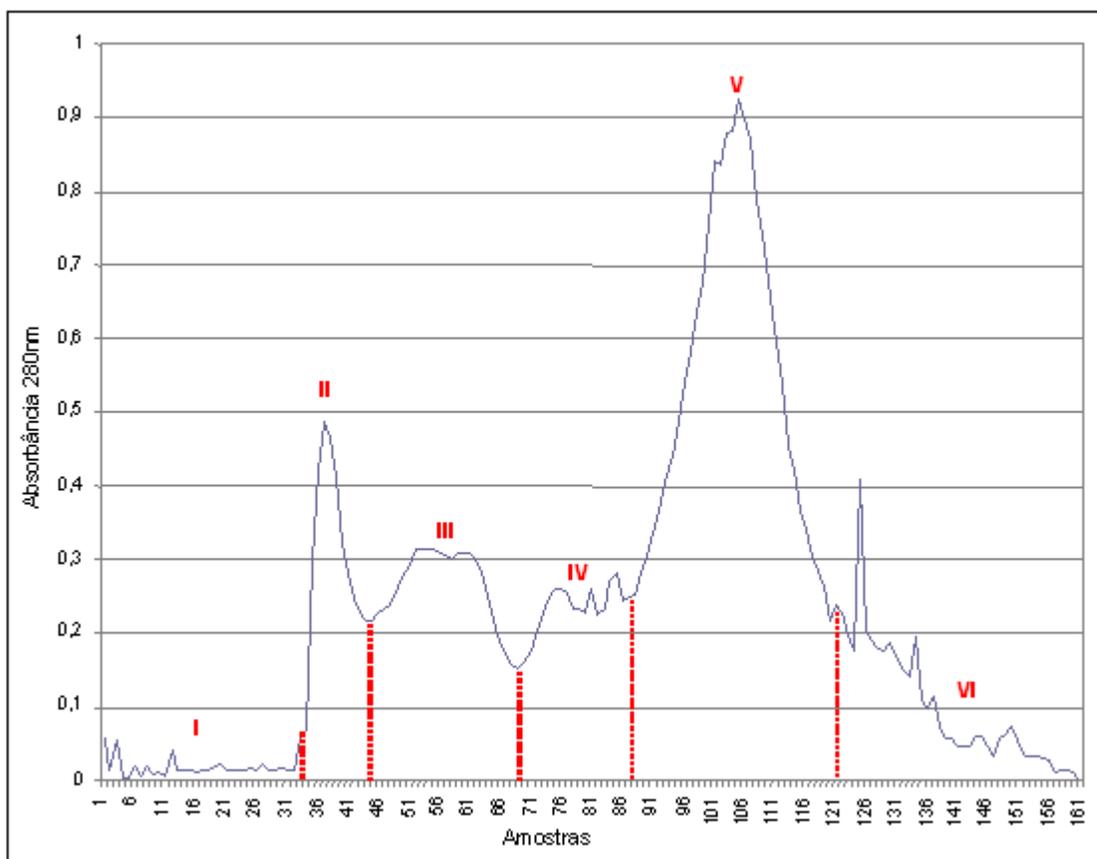
- Álcool absoluto – Synth
- Solução Ringer com lactato de sódio – Aster
- Formaldeído 38% – Synth
- Xilol – Synth
- Violeta de cresil – Merck
- Paraplast® – Oxford Labware
- Entellan® – Merck
- Etanol – Synth
- Trietilamina – Sigma
- Fenil isotiocianato – Sigma
- Acetonitrila – J. T. Baker
- EDTA – J. T. Baker
- Ácido acético glacial – VETEC
- Acetato de sódio – Merck
- Ácido trifluoracético (TFA) – Merck
- Bicarbonato de amônio – Merck
- Ácido glutâmico – RBI (Research Biochemicals International)
- Ácido aspártico – RBI (Research Biochemical International)
- Glicina – Sigma
- GABA – Sigma
- Fluo 3 AM® – Invitrogen
- Pluronic® – Sigma
- Digitonina – Sigma

### 3.3. Procedimentos

#### 3.3.1. Obtenção dos “pools” e purificação das toxinas

O veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* foi obtido pelo laboratório de Artrópodes e fornecido pela Comissão de Venenos do Instituto Butantan. A separação das frações e a purificação das toxinas foram realizadas pelo Dr. Ivo Lebrun do laboratório de Biofísica e Bioquímica do mesmo Instituto.

Para a separação das frações (ou “pools”), 50mg do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* foram diluídos em 500µl de solução tampão bicarbonato de amônio 50mM. A solução foi homogeneizada, centrifugada (6000 rpm) e o sobrenadante estocado em geladeira. O precipitado foi ressuspenso com o mesmo tampão e na mesma quantidade, homogeneizado, centrifugado e o sobrenadante foi unido ao primeiro sendo que o volume total obtido foi de 1,0mL. O sobrenadante final foi aplicado a uma coluna de gel Sephadex G50 de 78 cm e Ø0,5cm com volume total de 245mL e volume morto de 49mL, o qual foi descartado. A coleta dos “pools” foi realizada através de um coletor automático de frações com fluxo de 9,0mL/h, com frações de 1,5mL, de onde foram obtidos 6 pools (Figura 5), de acordo com sua densidade óptica lida em espectrofotômetro com absorvância de 280nm. Os “pools” foram, então, liofilizados e estocados a -20°C até sua utilização.



**Figura 5.** Separação do veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* em 6 frações através da coluna de gel Sephadex G50.

Para a purificação das toxinas, os “pools” de interesse foram ressuspensos em 1,5mL de água ultrapura e aplicados em um sistema de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC – HP série 1100) equipado com uma coluna analítica C18 (Beckman 5 $\mu$ m Ultrasphere, 250mm x 4,6mm) com detecção em espectrofotômetro (HP) em comprimento de onda de 214nm, usando-se como fase aquosa polar uma solução a 0,1% de ácido trifluoracético em água ultrapura (solvente A) e como fase apolar, uma solução a 90% de acetonitrila com 10% de solvente A (solvente B). O material aplicado ao HPLC foi submetido a uma corrida de 30 minutos com gradiente linear de 10 a 70% do solvente B. A quantidade de material de cada pico foi estimada pela área dos

mesmos. Os diferentes picos de material foram coletados e liofilizados, sendo estocados, a seguir, a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### 3.3.2. Procedimento cirúrgico para implantação de cânulas e eletrodos

Os animais foram injetados intraperitonealmente com anestésico preparado com hidrato de cloral (4,25g), sulfato de magnésio (2,16g), tiopental (0,97g), propilenoglicol (42,8mL), álcool 90% (11,5mL) e água destilada q.s.p 100ml na dose de 4ml/kg. Depois de anestesiado, a pelagem da cabeça do animal foi retirada e a cabeça fixada em aparelho estereotáxico. Realizou-se assepsia da pele e, posteriormente, uma incisão longitudinal medial para expor a caixa craniana. O perióstio foi removido, a superfície óssea lixada e a pele do animal cauterizada. Foram feitas perfurações da díploe craniana, com auxílio de uma broca, para a implantação de cânula e eletrodo bipolares na região CA1 do hipocampo dorsal cujas coordenadas (para cânula: -4,3 de ântero posterior, -3,2 de lateral e -2,8 de altura e para o eletrodo: -4,3 de ântero posterior, +3,2 de lateral e -3,0 de altura) foram determinadas pelo Atlas Estereotáxico de Paxinos e Watson (1998). Nos animais submetidos à microdiálise, foi implantada uma cânula-guia para probe de microdiálise de acordo com as coordenadas -5,3 de ântero posterior, -4,0 de lateral e -2,0 de altura determinadas pelo Atlas Estereotáxico de Paxinos e Watson (1998). O sistema implantado foi fixado à caixa craniana por parafusos e polímero de acrílico + acrílico autopolimerizante. Um mandril foi colocado no interior da cânula para que sua permeabilidade fosse mantida e a pele foi suturada de modo que cânula e eletrodo ficassem expostos. Após a cirurgia, os animais foram alojados individualmente em caixas plásticas para recuperação, com água e comida à vontade por um ou dois dias.

### **3.3.3. Injeção intrahipocampal e registro da atividade elétrica cerebral**

Os animais foram colocados em caixas de vidro dentro de uma gaiola de Faraday e, através de seus eletrodos hipocampais, foram conectados por cabos flexíveis a um registrador eletrográfico marca PowerLab para registro basal da atividade elétrica cerebral por cerca de 30 minutos. Após este período, os animais tiveram seus eletrodos desconectados para a administração das soluções Ringer lactato ou de toxinas.

A administração foi realizada através da cânula guia com auxílio de uma microseringa Hamilton® de 5µl conectada a uma sonda de polipropileno fixada com acrílico odontológico à uma agulha de carpule. Foi administrado um volume de 1µl da solução Ringer lactato para o grupo controle e 1µl das toxinas do pool V, IV e VI na concentração de 1 ou 2µg/µl para os grupos experimentais. A velocidade da injeção foi de 0,2µl/min, sendo o volume total injetado em 5min. Após a injeção, a agulha foi mantida por mais um minuto para evitar o refluxo. Os animais foram recolocados nas caixas individuais e, através de seus eletrodos hipocampais, reconectados ao registrador computadorizado. O registro eletrográfico foi realizado por um período de 4h com concomitante análise comportamental.

### **3.3.4. Perfusão e desidratação cerebral**

Os animais foram anestesiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica, cada um teve o tórax aberto para exposição do coração. O ventrículo esquerdo foi puncionado e conectado a um sistema de perfusão colocado a 2 metros acima do animal e uma incisão no átrio direito foi feita para escoamento do líquido. Foram utilizados tampão fosfato e solução de formol a 4% por volta de 5 minutos cada. Os animais foram decapitados e

tiveram seus cérebros removidos e colocados em formol por, no mínimo, uma semana. Após este período em formol, os cérebros foram dessecados através de constantes trocas de álcool. Foram realizadas 3 trocas diárias com intervalo de aproximadamente 4 horas por uma semana sendo que a última troca do último dia foi feita de álcool para xilol.

### **3.3.5. Inclusão cerebral em Paraplast e análise histopatológica**

No dia seguinte à troca de álcool por xilol, os cérebros foram mergulhados em 3 banhos sucessivos de resina Paraplast® por 1h30min cada. Ao final deste tempo, cada cérebro foi colocado em uma caixinha de papel devidamente identificada e depois embebido com Paraplast®. Os blocos foram fixados em suportes de madeira e depois posicionados em micrótomo. Na área de implante da cânula e eletrodo, foram feitos cortes de 10 $\mu$ m, posicionados em lâminas de vidro e, posteriormente, corados com violeta de cresil. As lâminas foram levadas ao microscópio óptico e, no aumento de 40x, efetuou-se a contagem dos neurônios íntegros das áreas hipocâmpais CA1, CA3 e CA4 ipsi e contralaterais à injeção. Para cada animal foram contados 5 cortes selecionados da seguinte maneira: o corte com a maior profundidade da cânula e dois cortes antes e dois depois a ele de forma que fosse pulado um corte entre cada um dos selecionados. Com isso, a distância mínima entre um corte e outro foi de 50 $\mu$ m. A contagem dos neurônios íntegros foi realizada com auxílio de um retículo de 100X100 $\mu$ m colocado previamente na ocular do microscópio. Foram contados apenas os neurônios piramidais intactos localizados dentro do retículo, ou seja, aqueles em que o núcleo e nucléolo eram bem nítidos. Os demais foram considerados lesados. O número de neurônios íntegros nos cinco cortes foram somados e o resultado desta soma foi analisado.

### **3.3.6. Microdiálise**

Os animais, já recuperados da cirurgia, foram colocados em gaiolas plásticas individuais onde permaneceram por cerca de 30 minutos para habituação. Foram utilizadas “probes” para microdiálise CMA/11 conectadas, através de catéteres de polietileno de 90cm de comprimento, à microseringas Hamilton® com capacidade para 2500µl previamente preenchidas com solução Ringer e inseridas a uma bomba de infusão regulada para um fluxo de 2,13µl/min. Catéteres de saída também foram conectados às “probes” e, através destes, os perfusatos foram coletados e armazenados em tubos tipo Eppendorf. As “probes” foram inseridas nas cânulas-guia implantadas na cabeça do animal e iniciou-se a coleta das amostras após 30min de fluxo, tempo necessário para o líquido percorrer o catéter de saída. Os perfusatos eram coletados a cada uma hora. As 3 primeiras amostras corresponderam à linha de base. Ao final destas coletas basais, os animais foram submetidos à injeção intrahipocampal de 1µl da toxina 4-V através da cânula-guia, mas sem interrupção do fluxo do sistema. Logo em seguida as probes foram reinseridas e as coletas continuadas. Ao total, foram coletadas 8 amostras, sendo 3 amostras basais e 5 amostras após injeção da toxina. Imediatamente após cada coleta os perfusatos foram congelados e armazenados em freezer -80°C até o momento da dosagem dos neurotransmissores.

### **3.3.7. Dosagem dos níveis cerebrais de aminoácidos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)**

A análise de aminoácidos é um método quali e quantitativo que possibilita a identificação e quantificação de aminoácidos provenientes de um material biológico que contenha proteínas, peptídeos ou aminoácidos livres. O

método utilizado baseia-se numa relação de acoplamento do aminoácido com um cromóforo (artigo no prelo).

Para este experimento, utilizou-se um sistema de HPLC da marca HP série 1100 equipado com uma coluna analítica C18 (Beckman 5 $\mu$  Ultrasphere ODS-PTH) medindo 250mm x 4,6mm em um gradiente com fase móvel, conforme descrito por Heinrikson e Meredith (1984) e modificado por Ebert (1986), constituída por solução A (30ml de acetonitrila e 470ml da solução tampão para aminoácidos – 19g de acetato de sódio, 1000ml água ultrapura, 0,5ml de trietilamina, 200 $\mu$ l EDTA, titulado para pH 6,4 com ácido acético glacial) e solução B (400ml de acetonitrila, 100ml de água ultrapura e 100 $\mu$ l de EDTA 0,1M). As soluções A e B permaneceram por 20min em sonicador para deaeração, afim de impedir a interferência de bolhas no momento da leitura.

As alíquotas obtidas pelo procedimento anterior (3.3.6) foram descongeladas, colocadas em um evaporador centrífugo tipo Speed Vac e levadas ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Inicialmente, foi feita a derivatização das amostras com 30 $\mu$ l da solução de fenilisotiocianato, reação que promove a ligação do fenilisotiocianato ao NH<sub>2</sub> do aminoácido formando um composto que será absorvido no comprimento de onda de 254nm. Os perfusatos foram completados com água ultrapura para obter um volume final de 200 $\mu$ l e submetidos ao agitador automático (tipo VORTEX). Destes, 100 $\mu$ l foram injetados no sistema de cromatografia líquida.

As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as a um padrão de aminoácidos de concentração conhecida. O tempo de corrida foi de 21 minutos. Os padrões contendo as concentrações de 1 $\mu$ M de ácido glutâmico, 1 $\mu$ M de ácido aspártico, 1 $\mu$ M de glicina e 1 $\mu$ M de GABA foram diluídos em água pura, distribuídos em tubos de plástico tipo Eppendorf (1,5ml) e estocados em freezer -80°C por tempo indeterminado. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos com a solução de derivatização.

Gradiente para eluição dos aminoácidos derivatizados:

Tempo (min)	Solução A	Solução B
0	100%	0%
12	54%	46%
15	0%	100%
20	100%	0%
21	100%	0%

### 3.3.8. Microscopia confocal

O animal foi anestesiado em câmara de CO<sub>2</sub>, guilhotinado e seu cérebro removido rapidamente. A porção rostral e o cerebelo foram retirados e a região mediana do cérebro colada a um suporte o qual foi fixado no vibrátomo. Foram feitos cortes sagitais do hipocampo com espessura de 200µm. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, as fatias foram retiradas delicadamente do vibrátomo e depositadas em uma placa de Petri com solução transfer aerada e gelada. Os hipocampus foram separados do restante do cérebro e mantidos em solução transfer gelada e aerada constantemente.

A solução transfer foi preparada no dia e mantida gelada com aeração de carbogênio. No momento do uso foi transferida para o vibrátomo e mantida sob as mesmas condições.

Os hipocampus foram colocados individualmente em lamínulas, o excesso da solução transfer retirado com papel filtro e as bordas laterais do hipocampo aderidas à lamínula com cola instantânea. As lamínulas foram incubadas em solução de 25µg/ml de Fluo-3 AM® acrescida de 2µl de Pluronic® 20% por 30 minutos, protegidas da luz, com aeração constante e em temperatura ambiente (média de 25°C).

Após este período, as lamínulas foram lavadas quatro vezes em solução transfer e colocadas em câmaras apropriadas para visualização em microscópio confocal, banhadas por 500 $\mu$ l de solução transfer.

### **3.3.9. Mobilização de cálcio por microscopia confocal**

O microscópio de varredura confocal é utilizado para aumentar o contraste da imagem microscópica fluorescente e construir imagens tridimensionais através uma fonte de luz laser que promove a excitação de um fluoróforo (de Azevedo, 2005) e da utilização de um pequeno diafragma, pinhole, que permite uma alta definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal. Este diafragma permite a passagem apenas da luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco.

Neste experimento foi utilizado um laser Argon de excitação a 488nm para o Fluo-3. A luz emitida foi adquirida com um filtro de emissão LP (Long Pass) a 505nm no confocal.

Uma visualização panorâmica do hipocampo foi feita em objetiva com aumento de 10x para selecionar uma área da região CA1 que foi, posteriormente, focada em objetiva LD 20x. A primeira imagem deste campo foi capturada sem a adição de qualquer substância. Posteriormente, foram acrescentados 10 $\mu$ l da solução contendo a toxina 4-V (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) e, em seguida, mais vinte e nove imagens foram captadas, com intervalo de 5 segundos entre cada uma. A concentração final da toxina na câmara foi de 0,02 $\mu$ g/ $\mu$ l.

O mesmo procedimento foi repetido com adição de 10 $\mu$ l de digitonina 5mM para a obtenção da fluorescência máxima e depois com adição de 10 $\mu$ l de solução de cloreto de manganês 0,2M para obtenção de fluorescência mínima. Estas duas substâncias foram utilizadas para verificar a viabilidade do tecido hipocampal. A digitonina é responsável por promover o rompimento da

membrana celular liberando o cálcio citosólico e, então, causar a máxima fluorescência. O cloreto de manganês tem maior afinidade ao fluoróforo que o cálcio e, neste caso, o fluoróforo não interagirá com o cálcio para promover a fluorescência do material em estudo.

### **3.4. Delineamento Experimental**

#### **3.4.1. Experimento 1 – Avaliação eletrográfica e comportamental após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos.**

Para o grupo controle, seis animais foram injetados (item 3.3.3) com 1µl da solução de Ringer. Todos os animais dos grupos experimentais receberam 1µl da solução de toxina. Foram utilizados 6 animais para a toxina 3-IV na concentração de 2µg/µl, 12 animais para o teste da toxina 1-V na concentração de 1µg/µl, 11 animais para a toxina 4-V na concentração de 1µg/µl, 13 animais para a toxina 5-V na concentração de 1µg/µl, 6 animais para a toxina 24-V na concentração de 2µg/µl, 8 animais para a toxina 27-V na concentração de 2µg/µl, 8 animais para a toxina 28-V na concentração de 2µg/µl e 8 animais para a toxina 14-VI na concentração de 2µg/µl.

Logo após a injeção, os animais tiveram seus eletrodos reconectados ao aparelho e o registro foi realizado por um período de, no mínimo, 4 horas, conforme descrito no item 3.3.3. Foram quantificadas espículas isoladas, agrupamento de espículas, descargas leves e moderadas como alterações eletrográficas, e “wet dog shakes” (WDS), mioclonias, bocejos, movimentos mastigatórios, aumento de secreção, salivação como alterações comportamentais que ocorreram durante esse período.

### **3.4.2. Experimento 2 – Avaliação da lesão neuronal após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos.**

Após sete dias da injeção das toxinas ou de solução Ringer, os animais do experimento anterior foram anestesiados e perfundidos e tiveram seus cérebros retirados (item 3.3.4) e processados para análise histopatológica (item 3.3.5). Foram feitos cortes transversais de 10 µm em micrótomo e depois fixados em lâmina para coloração. Após coloração com violeta de cresil, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico para contagem de neurônios íntegros das regiões CA1, CA3 e CA4 ipsi e contralaterais à injeção conforme item 3.3.5 com auxílio de um contador manual.

### **3.4.3. Experimento 3 – Dosagem de aminoácidos neurotransmissores após injeção intrahipocampal da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos.**

Um grupo de seis animais foi operado para implantação de cânula-guia para probe de microdiálise conforme descrito no item 3.3.2. Após recuperação, os animais foram submetidos à microdiálise.

Inicialmente foram feitas três coletas basais, ou seja, antes da injeção da toxina. Após estas coletas, foi realizada, através da cânula guia para probe de microdiálise, a injeção intrahipocampal de 1µl da solução da toxina 4-V na concentração de 1µg/µl e, posteriormente, a coleta de mais cinco amostras. As três primeiras coletas correspondem às amostras de base, a seguinte continua contendo níveis basais de aminoácidos devido ao tempo necessário para que o perfusato percorra o catéter e a partir da 5ª amostra, os níveis encontrados são aqueles obtidos após injeção da toxina.

A dosagem dos aminoácidos neurotransmissores foi realizada de acordo com item 3.3.7.

#### **3.4.4. Experimento 4 – Avaliação do efeito da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* na mobilização de cálcio pela técnica de microscopia confocal em fatias de hipocampo de ratos**

Oito animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seus cérebros removidos. Foram feitas fatias hipocampais em vibrátomo e preparadas de acordo com a descrição do item 3.3.8. As lamínulas foram levadas ao microscópio confocal e 10 $\mu$ l da solução de toxina 4-V foram aplicados, conforme descrito no item 3.3.9. A concentração final da toxina na câmara foi de 0,02 $\mu$ g/ $\mu$ l.

### **3.5. Análises Estatísticas**

Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer para a análise da contagem celular e ANOVA para medidas repetidas seguida de teste de Tukey-Kramer para a análise das dosagens de neurotransmissores. Para a análise comportamental foi utilizado o teste de Fisher. Os dados de alterações eletrográficas foram analisados pela análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para todas as comparações realizadas a probabilidade de pelo menos  $p < 0,05$  foi considerada capaz de demonstrar diferenças significantes entre os grupos.

## 4. Resultados

### 4.1. Experimento 1 – Avaliação eletrográfica e comportamental após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos.

Os animais injetados com solução Ringer não apresentaram nenhum tipo de alteração eletrográfica e/ou comportamental.

Do “pool” IV proveniente do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* obteve-se onze picos, mas somente o pico 3 foi utilizado nos experimentos. Esta toxina, assim como as Tb 24-V, 27-V, 28-V e 14-VI, não apresentou alterações na menor dose (1µg) e por isso foi testada na dose de 2µg por animal (n=6). Na maior dose, a toxina Tb 3-IV provocou o aparecimento de espículas isoladas e agrupadas e descargas leves e moderadas (dados não mostrados), porém estas alterações não foram quantificadas. O tempo de latência para a ação desta toxina foi de aproximadamente 600 segundos após sua administração (dados não mostrados). Quanto às alterações comportamentais, 83,3% dos animais apresentaram mioclonias e 50% WDS, observadas na tabela 1.

O “pool” V originou 30 picos, dos quais apenas 1, 4, 5, 24, 27, 28 apresentaram quantidade suficiente para o ‘screening’ inicial (Tabela 1). A figura 5 exemplifica o registro controle e os padrões de alterações eletrográficas analisadas. As Tabelas 2 e 3 mostram detalhadamente as alterações eletrográficas observadas após a administração destas toxinas.

A toxina Tb 1-V, na dose de 1µg/µl (n=12) (Tabela 2), iniciou seus efeitos em 133,3 segundos após sua administração e provocou aumento significativo dos tempos de descargas leves e espículas agrupadas e da frequência do surgimento de espículas isoladas e agrupadas (Tabelas 2 e 3). Os animais que receberam esta toxina, comportamentalmente, apresentaram

bocejos (83,3%), aumento do movimento mastigatório (83,3%), mioclonias (100%) e WDS (83,3%) (Tabela 1). Além das alterações citadas, esta toxina provocou aumento de secreção salivar e/ou nasal em 33,3% dos animais, o que não aconteceu com a administração das demais toxinas.

A toxina Tb 4-V, na dose de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $n=11$ ), teve uma média de tempo de latência de 91,25 segundos após injeção intrahipocampal. Foram verificados aumentos significantes na frequência de espículas isoladas e de descargas leves e no tempo de duração destas descargas (Tabelas 2 e 3). Houve presença de agrupamentos de espículas, descargas moderadas e intensas, porém sem significância estatística (Tabelas 2 e 3). As alterações comportamentais observadas foram mioclonias (81,8%), movimentos mastigatórios (63,6%), bocejos (63,6%) e WDS (81,8%) (Tabela 1).

A toxina Tb 5-V (Tabela 2) tem um tempo médio de ação de 367,3 segundos. Sua administração na dose de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $n=13$ ) provocou um aumento significativo da frequência do aparecimento de espículas isoladas e de descargas leves assim como um aumento significativo no tempo de ocorrência destas descargas (Tabelas 2 e 3). Quanto à alteração comportamental, observou-se aumento da frequência de bocejos em 92,3% dos animais, movimentos mastigatórios em 76,9%, mioclonias em 84,5% e WDS em 61,5%. Curiosamente, as toxinas Tb 4-V e Tb 5-V causaram “soluços” nos animais, porém este evento não apresentou significância estatística.

Com uma dose de  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $n=6$ ), toxina Tb 24-V apresentou o menor tempo de latência para o aparecimento dos efeitos, 59,0 segundos (Tabela 2). Esta toxina provocou aumento significativo da frequência de espículas isoladas e também o surgimento de espículas agrupadas, descargas leves e moderadas, estas, porém, sem significância quando comparadas ao controle (Tabelas 2 e 3). Em relação ao comportamento, a toxina provocou alterações de bocejo em 50% dos animais, mioclonias em 83,3% e WDS em 50% (Tabela 1).

O tempo de latência da toxina Tb 27-V ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;  $n=8$ ), foi de 278,3 segundos, em média (Tabela 2). Com sua administração, foram observadas

espículas isoladas e agrupadas e descargas leves, moderadas e intensas, porém nenhuma destas em quantidade significativa (Tabelas 2 e 3). Foi observada alteração na quantidade de WDS em 50% dos animais (Tabela 1).

A toxina Tb 28-V, 1µg/µl (n=8) teve uma média de tempo de latência de 290,5 segundos após injeção intrahipocampal (Tabela 2). Verificou-se aumento significativo na frequência de espículas isoladas e no tempo de espículas agrupadas. Descargas leves, moderadas e intensas foram observadas, porém sem significância estatística (Tabelas 2 e 3). Alterações comportamentais como WDS (62,5%), movimentos mastigatórios (62,5%) e mioclonias (75%) foram observadas após a administração da toxina (Tabela 1).

Com relação à toxina Tb 14-VI na dose de 1µg/µl (n=8), houve o aparecimento de movimentos mastigatórios em 62,5% dos animais injetados, mioclonias em 62,5% e WDS em 50% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Alterações observadas após a injeção intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.

	Bocejo	Movimento mastigatório	Aumento de secreção	Mioclonia	Wet dog shake
Ringer	-	-	-	-	-
Tb 3-IV (n=6)	-	-	-	83,3% * (5/6)	50% * (3/6)
Tb 1-V (n=12)	83,33% * (10/12)	83,33% * (10/12)	41,6% (5/12)	100% * (12/12)	83,33% * (10/12)
Tb 4-V (n=11)	63,64% * (7/11)	63,64% * (7/11)	27,3% (3/11)	81,82% * (9/11)	81,82% * (9/11)
Tb 5-V (n=13)	92,31% * (12/13)	76,92% * (10/13)	-	84,46% * (11/13)	61,54% * (8/13)
Tb 24-V (n=8)	50% * (4/8)	33,33% (2/8)	16,6% (1/6)	83,33% * (5/8)	50% * (4/8)
Tb 27-V (n=8)	25% (2/8)	37,5% (3/8)	37,5% (3/8)	37,5% (3/8)	50% * (4/8)
Tb 28-V (n=9)	12,5% (1/8)	62,5% * (5/8)	-	75% * (6/8)	62,5% * (5/8)
Tb 14-VI (n=8)	25% (2/8)	62,5% * (5/8)	37,5% (3/8)	62,5% * (5/8)	50% * (4/8)

\* diferente do controle Ringer,  $p < 0,05$ . Teste de Fischer

**Tabela 2.** Alterações eletrográficas observadas após a injeção intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do “pool” V do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.

	Latência para o primeiro episódio <sup>(a)</sup>	Frequência de espículas isoladas <sup>(b)</sup>	Frequência de espículas agrupadas <sup>(b)</sup>	Tempo de espículas agrupadas <sup>(a)</sup>
Ringer	-	-	-	-
Tb 1-V	133,3±31,3	19 (14-21)**	4 (3-6)	30,0±16,3*
Tb 4-V	91,2±44,9	13 (6-26)*	3 (0-6)	16,2±9,2
Tb 5-V	367,3±84,9	18 (9-26)**	2 (0-7)	14,5±11,4
Tb 24-V	59,0±6,9	10 (10-15)	2 (1-4)	13,7±6,5
Tb 27-V	278,3±118,2	4 (2-12)	1 (0-2)	12,3±6,7
Tb 28-V	290,5±98,3	16 (12-20)	4 (0-7)*	37,0±15,0*

(a) média ± erro padrão da média, em segundos, da latência para o primeiro episódio ou do tempo total de descarga.

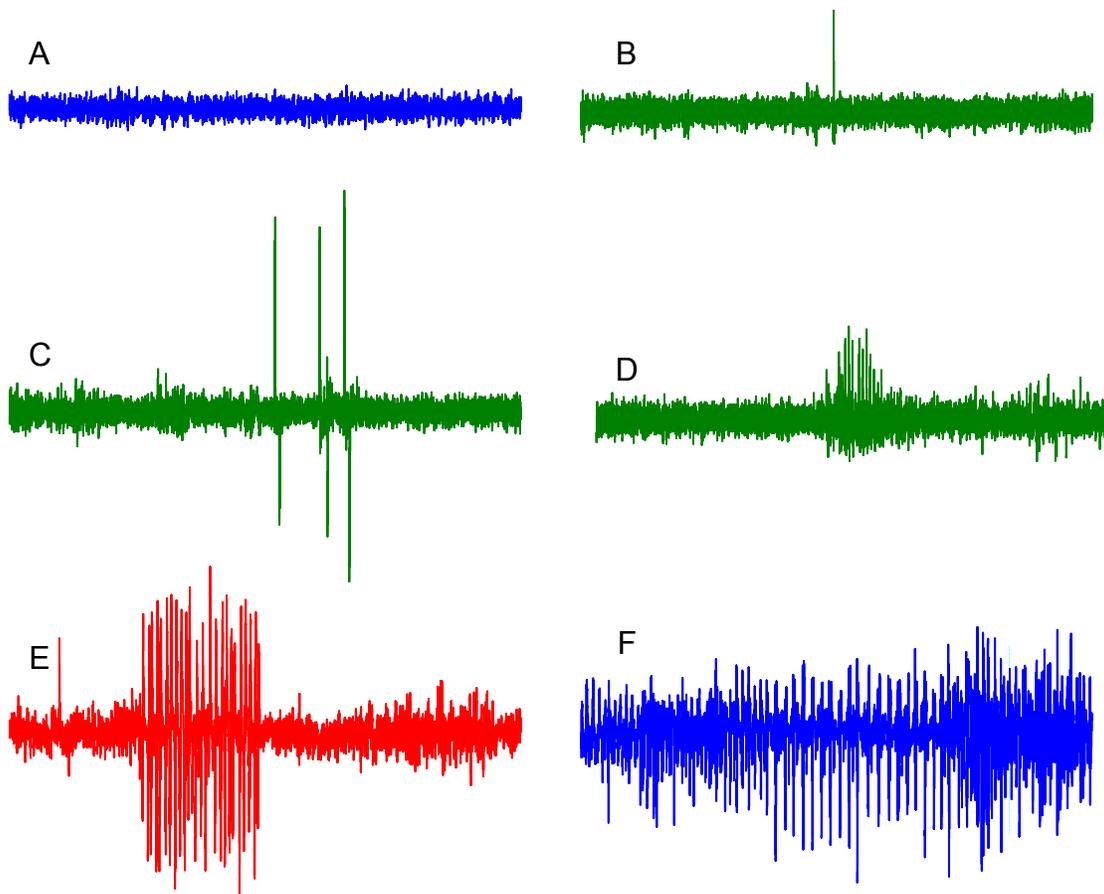
(b) mediana ± intervalo de confiança do número de eventos. \* significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ) – Análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn. \*\* significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,01$ ) – Análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn.

**Tabela 3.** Alterações eletrográficas observadas após a injeção intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do “pool” V do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.

	Frequência de descargas leves <sup>(b)</sup>	Tempo de descargas leves <sup>(a)</sup>	Frequência de descargas moderadas <sup>(b)</sup>	Tempo de descargas moderadas <sup>(a)</sup>	Frequência de descargas intensas <sup>(b)</sup>	Tempo de descargas intensas <sup>(a)</sup>
Ringer	-	-	-	-	-	-
Tb 1-V	2,5(0-5)	8,7±3,0	-	-	-	-
Tb 4-V	5,5 (2-12)	22,5±9,2	0 (0-11)	63,5±63,5	0 (0-9)	199,5±199,5
Tb 5-V	11 (9-17)*	39,5±12,6	-	-	-	-
Tb 24-V	2 (0-8)	2,4±1,6	0 (0-1)	2,5±2,5	-	-
Tb 27-V	2 (0-5)	15,4±3,5	0 (0-3)	14,0±14,0	0,5 (0-2)	38,5±29,4
Tb 28-V	3,5 (2-6)	14,2±2,4	1 (1-2)*	16,6±4,2	0 (0-4)	21,2±21,2

(a) média ± erro padrão da média, em segundos, do tempo total de descarga.

(b) mediana ± intervalo de confiança do número de eventos. \* significativamente diferente do grupo controle (p<0,05) – Análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn. \*\* significativamente diferente do grupo controle (p<0,01) – Análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn.



**Figura 6.** Exemplos das alterações eletrográficas quantificadas: registro controle (A), espícula isolada (B), agrupamento de espículas (C), descarga leve (D), descarga moderada (E) e descarga intensa (F).

#### **4.2. Experimento 2 – Avaliação da lesão neuronal após injeção intrahipocampal das toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos.**

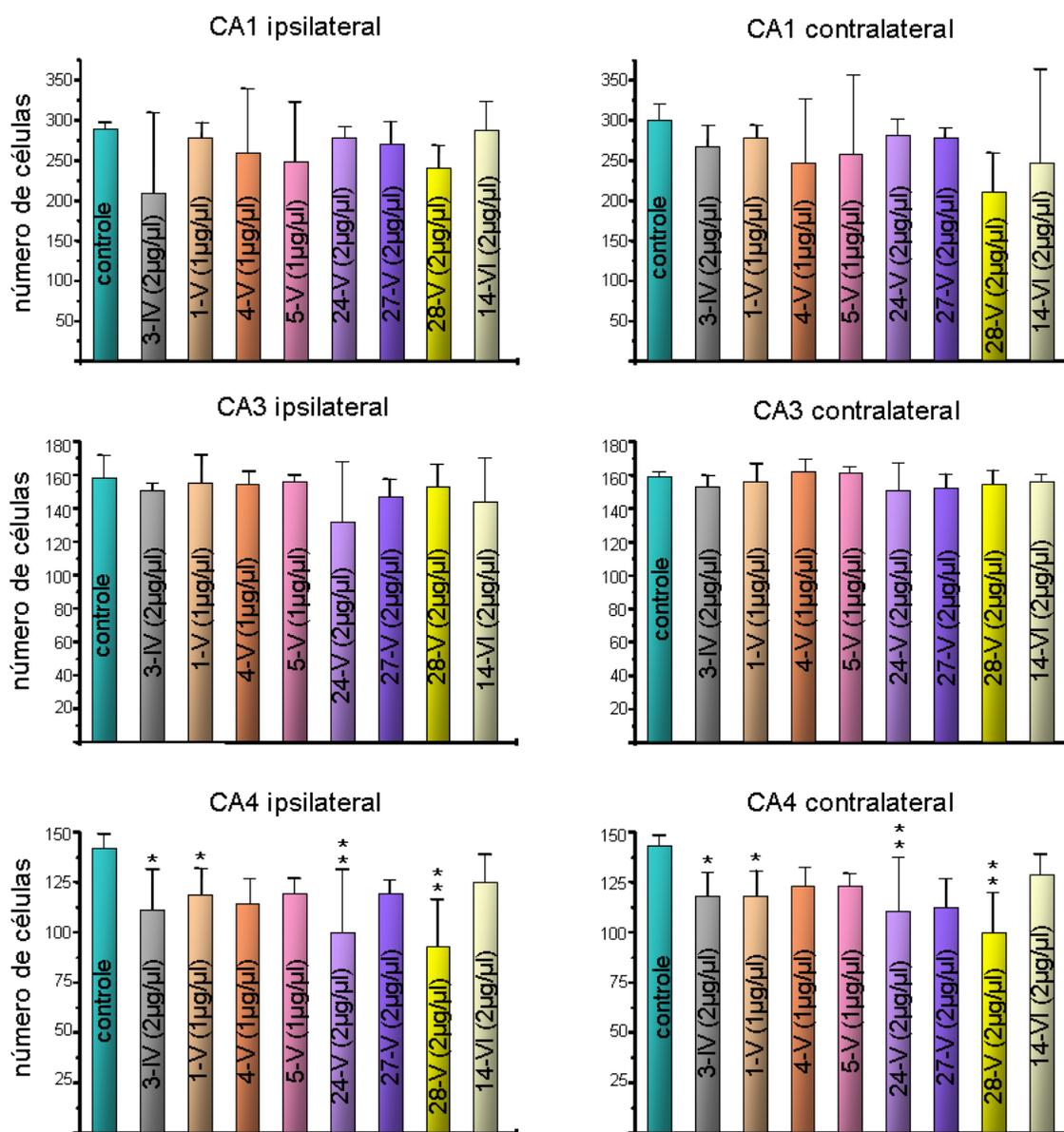
Após sete dias da administração de solução Ringer ou das diferentes toxinas isoladas dos “pools” IV, V e VI do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*, os animais foram anestesiados e perfundidos e tiveram seus cérebros dessecados e preparados para análise histológica.

Os resultados obtidos com a contagem das células íntegras das áreas hipocâmpais CA1, CA3 e CA4 ipsi e contralaterais à injeção estão representados na figura 7.

Em relação aos grupos experimentais, pôde-se observar diminuição significativa de células íntegras nas regiões CA4 ipsi e contralateral à injeção após administração das toxinas Tb 3-IV, Tb1-V, Tb 24-V e Tb 28-V. A quantidade de células das demais regiões não foi alterada significativamente por estas toxinas, apesar de algumas provocarem diminuição na quantidade de células viáveis de certas regiões.

Na figura 7, são observados desvios-padrão muito grandes. Isto se deve à lesão neuronal encontrada em um ou dois animais. A Tb 3-IV provocou lesão neuronal em dois animais na região de CA1 ipsilateral (média entre os cortes dos dois animais = 82 células). Com a Tb 4-V, um animal apresentou apenas 100 células em CA1 ipsi e 92 células em CA1 contralateral. A Tb 5-V causou lesões nas regiões CA1 ipsi e contralateral (89 e 38 células viáveis, respectivamente). Na região CA1 contralateral, a Tb 14-VI provocou lesão em um animal. A análise histológica deste animal revelou apenas 36 células viáveis, enquanto que em animais sem lesão a quantidade de células viáveis encontradas é de aproximadamente 300.

As demais toxinas testadas não eliciaram alterações significantes nas regiões analisadas.



**Figura 7.** Análise histológica das regiões CA1, CA3 e CA4 ipsi e contralaterais após administração intrahipocampal das diferentes toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.

Os dados se referem à média  $\pm$  desvio padrão da média.

\* significamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ) - Teste ANOVA seguido de teste Tukey Kramer

\*\* significamente diferente do grupo controle ( $p < 0,01$ ) - Teste ANOVA seguido de teste Tukey Kramer

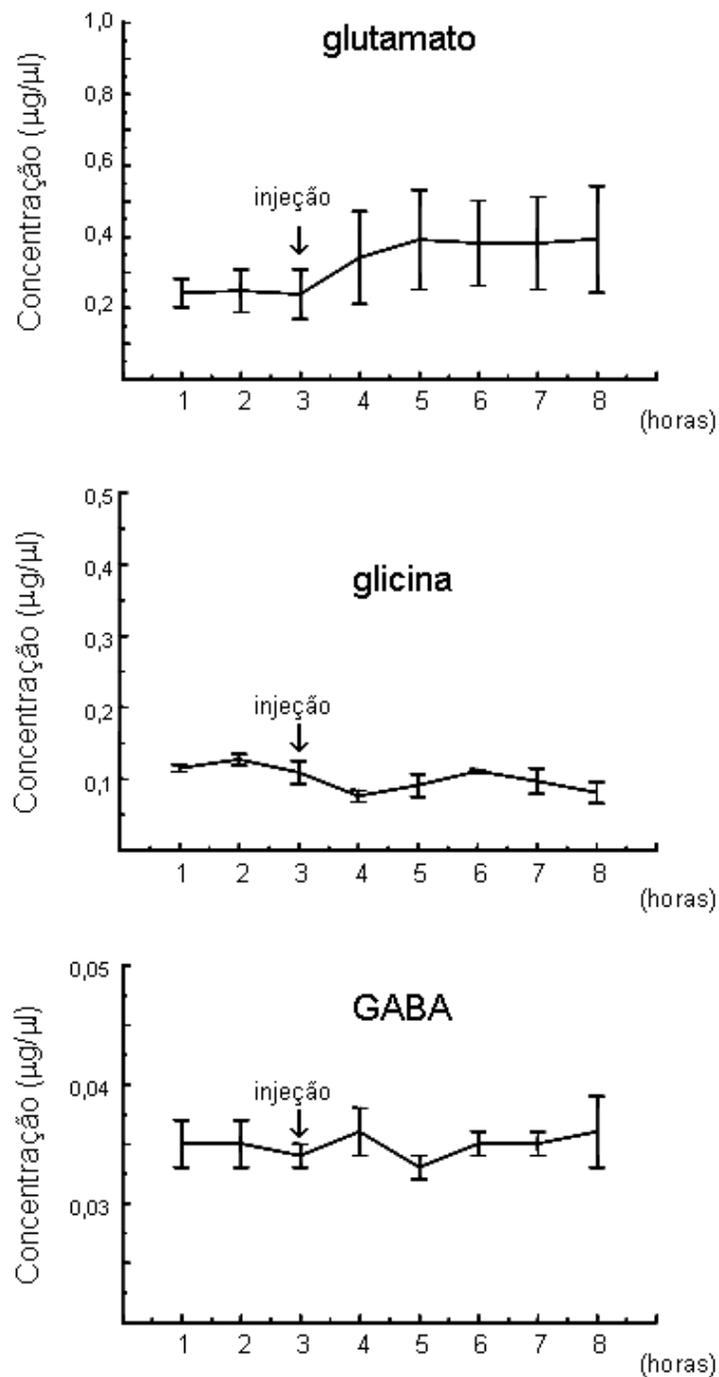
### **4.3. Experimento 3 - Dosagem de aminoácidos neurotransmissores após injeção intrahipocampal da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos.**

Para este experimento, somente a toxina 4-V foi utilizada por ter produzido um efeito epileptogênico mais pronunciado que as demais e pelo seu bom rendimento após a coleta dos picos.

Na dosagem de aminoácidos neurotransmissores, verificou-se um pequeno aumento na concentração de glutamato após a administração da toxina Tb 4-V (Figura 8). Porém, este aumento não foi significativo em relação ao nível basal. Os aminoácidos glicina e GABA não apresentaram variações de concentração em relação aos níveis basais obtidos antes da injeção da toxina (Figura 8).

Devido ao sutil aumento, porém sem significância, na concentração de glutamato optamos por analisar individualmente os níveis de aminoácidos neurotransmissores. As figuras 9, 10 e 11 mostram as concentrações individuais e as variações percentuais individuais de glutamato, GABA e glicina, respectivamente, na região hipocampal após a administração da toxina Tb 4-V.

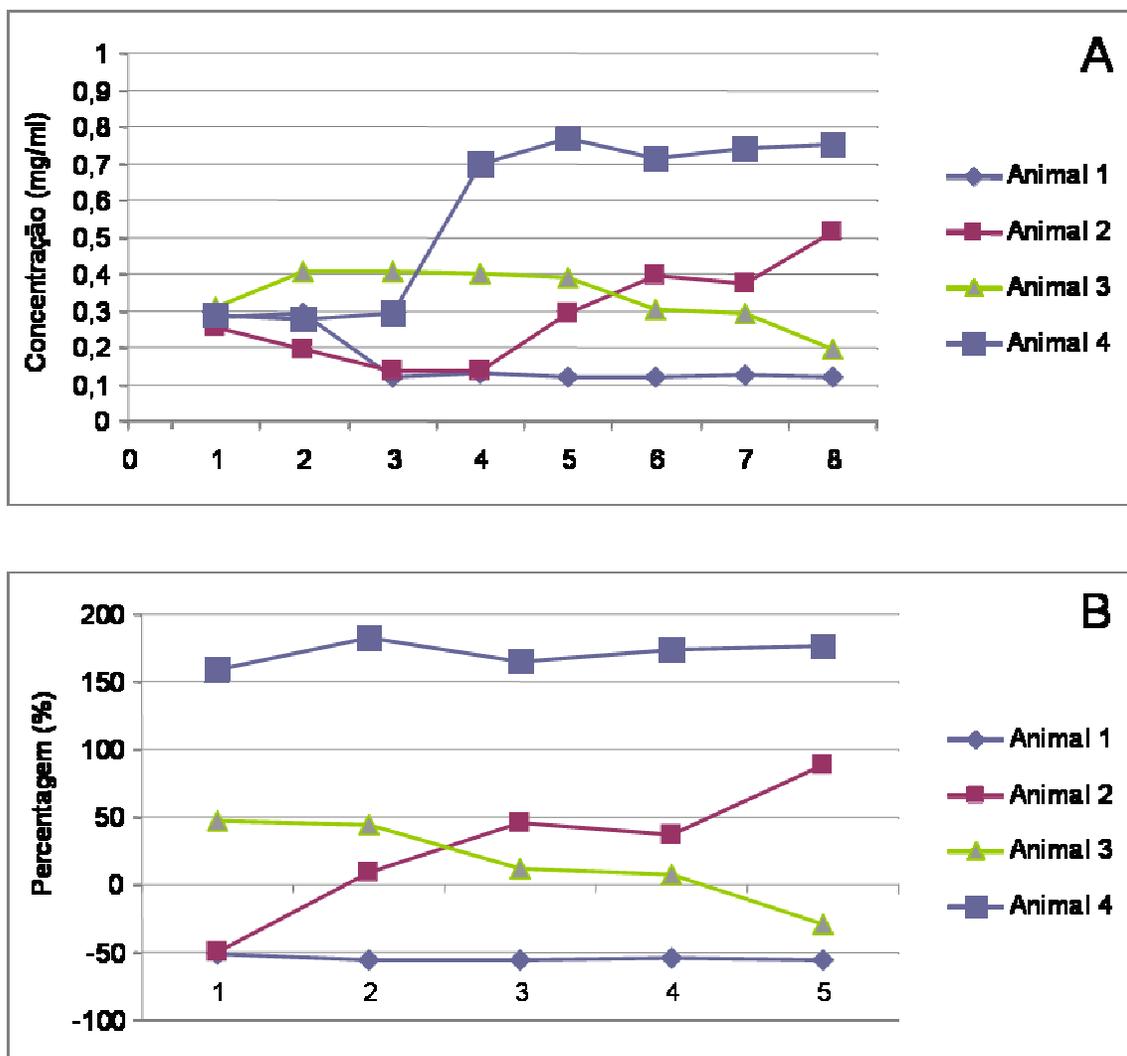
Podemos observar que em um dos animais observados houve um aumento de aproximadamente 150% da concentração extracelular de glutamato em relação aos níveis basais (figura 9B). Este animal apresentou agitação, WDS, frequentes mioclonias, aumento de secreção lacrimal e nasal e dificuldade respiratória nas primeiras duas horas após a injeção da toxina 4-V, comportamentos diferentes dos observados. Após este tempo, as alterações foram se extinguindo. Alterações nos níveis extracelulares de glicina e GABA não foram observadas.



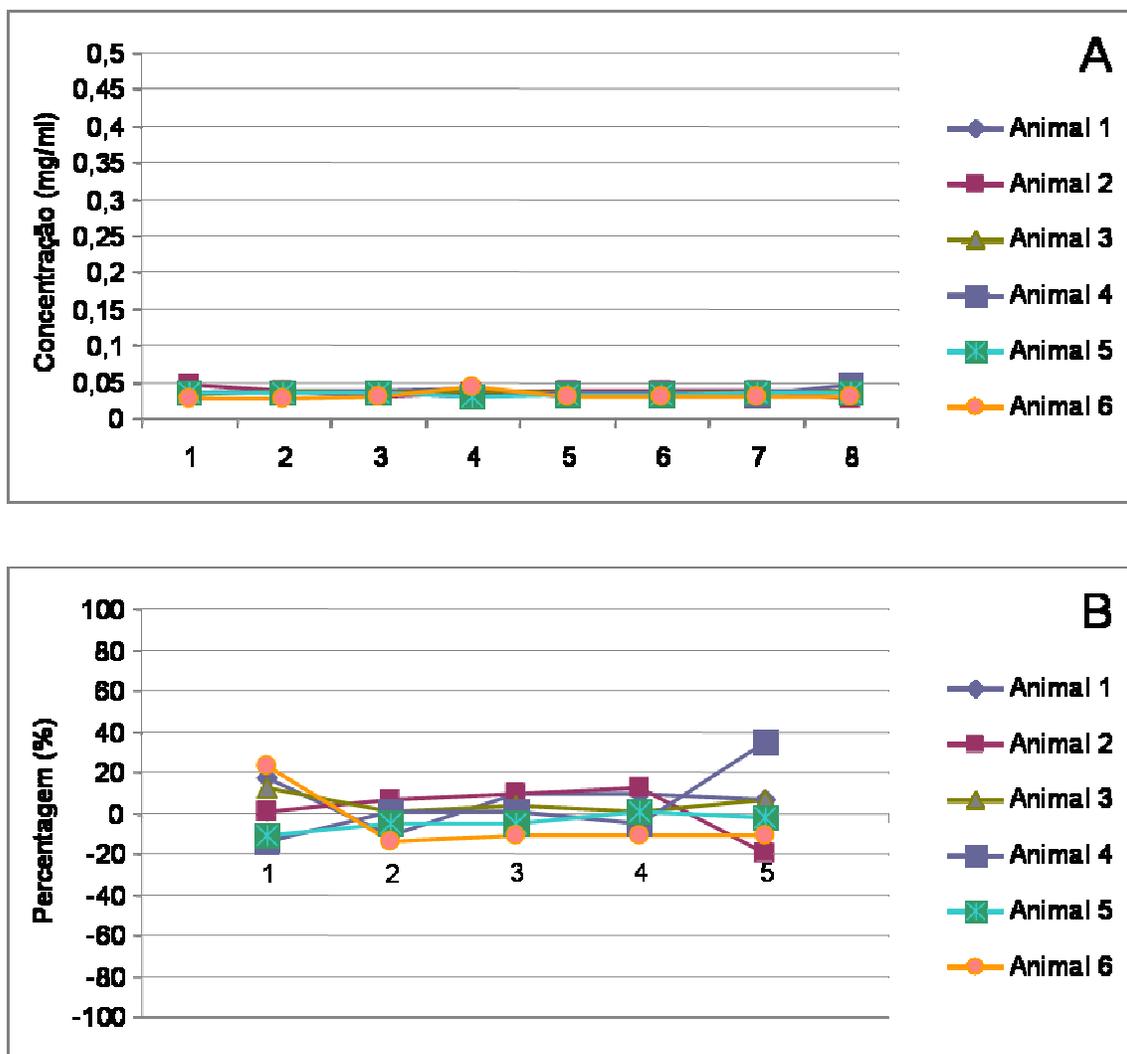
**Figura 8.** Níveis hipocâmpais de glutamato, glicina e GABA em ratos machos submetidos à injeção intracerebral da toxina 4-V.

Dados representados como média  $\pm$  erro padrão.

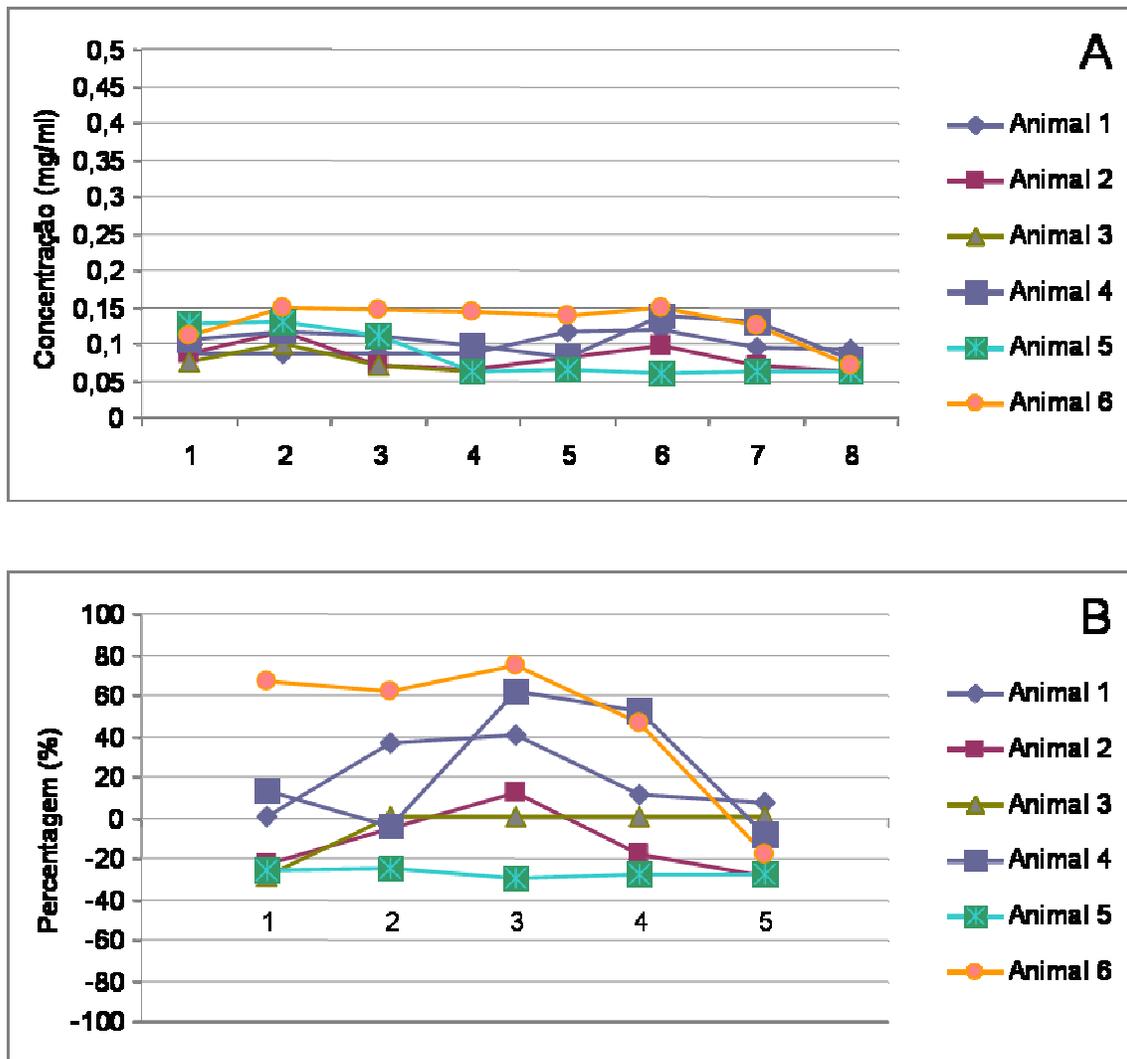
Onde  $p > 0,05$ , ANOVA para medidas repetidas seguida de teste de Tukey Kramer.



**Figura 9.** Níveis individuais de glutamato hipocampal. A) Variação individual dos níveis de glutamato observada nas oito horas de coleta de aminoácidos neurotransmissores. B) Variação percentual da concentração individual de glutamato após a administração da toxina 4-V em relação aos níveis basais.



**Figura 10.** Níveis individuais de GABA hipocampal. A) Variação individual dos níveis de GABA observada nas oito horas de coleta de aminoácidos neurotransmissores. B) Variação percentual da concentração individual de GABA após a administração da toxina 4-V em relação aos níveis basais.



**Figura 11.** Níveis individuais de glicina hipocampal. A) Variação individual dos níveis de glicina observada nas oito horas de coleta de aminoácidos neurotransmissores. B) Variação percentual da concentração individual de glicina após a administração da toxina 4-V em relação aos níveis basais.

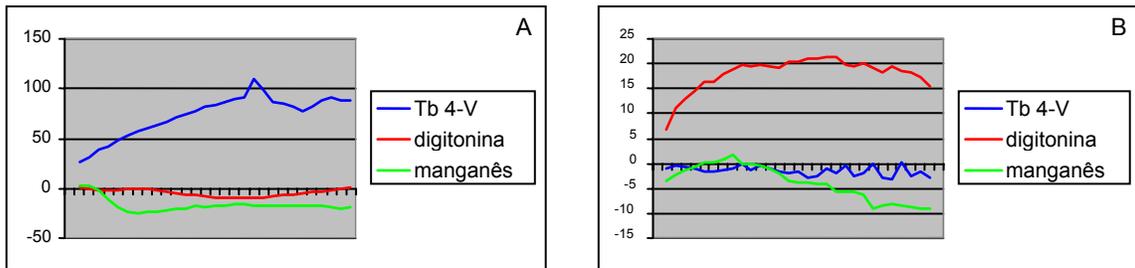
#### **4.4. Experimento 4 - Avaliação do efeito da toxina 4-V isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* na mobilização de cálcio pela técnica de microscopia confocal em fatias de hipocampo de ratos**

Assim como no experimento 3, somente a toxina Tb 4-V foi utilizada no experimento de mobilização de cálcio.

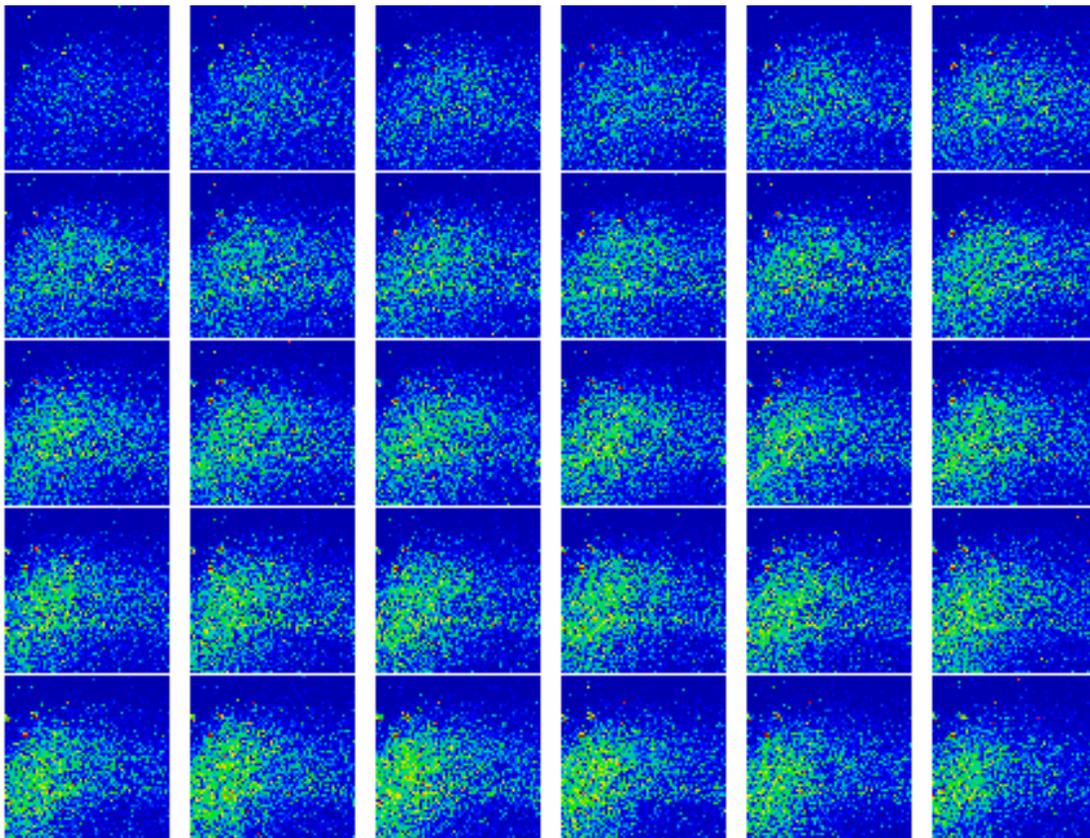
Das oito fatias hipocampais viáveis submetidas à microscopia confocal, quatro delas apresentaram um aumento de 25 a 45% de fluorescência logo após a aplicação da toxina chegando a 90 a 110% entre os tempos 10 e 20 (50 a 100 segundos) e caindo para 60 a 90%, em relação à concentração basal de cálcio citosólico, no 30º tempo (150 segundos), como verificado na figuras 12A e 13. Nas outras quatro fatias houve uma diminuição de 0,5 a 6% durante todo o tempo de captação de imagens em relação à concentração basal (Figuras 12B e 14).

Para a validação dos experimentos, após a aplicação da toxina, foi utilizada digitonina que, por ter uma ação detergente, rompe as membranas das organelas e da célula e libera o cálcio presente na célula, o que determina a máxima fluorescência. Para a verificação de fluorescência mínima, o manganês, na forma de  $MnCl_2$ , foi utilizado ao final do experimento. Os resultados aqui apresentados são das fatias em que a digitonina e o manganês tiveram o efeito esperado, comprovando a viabilidade das fatias.

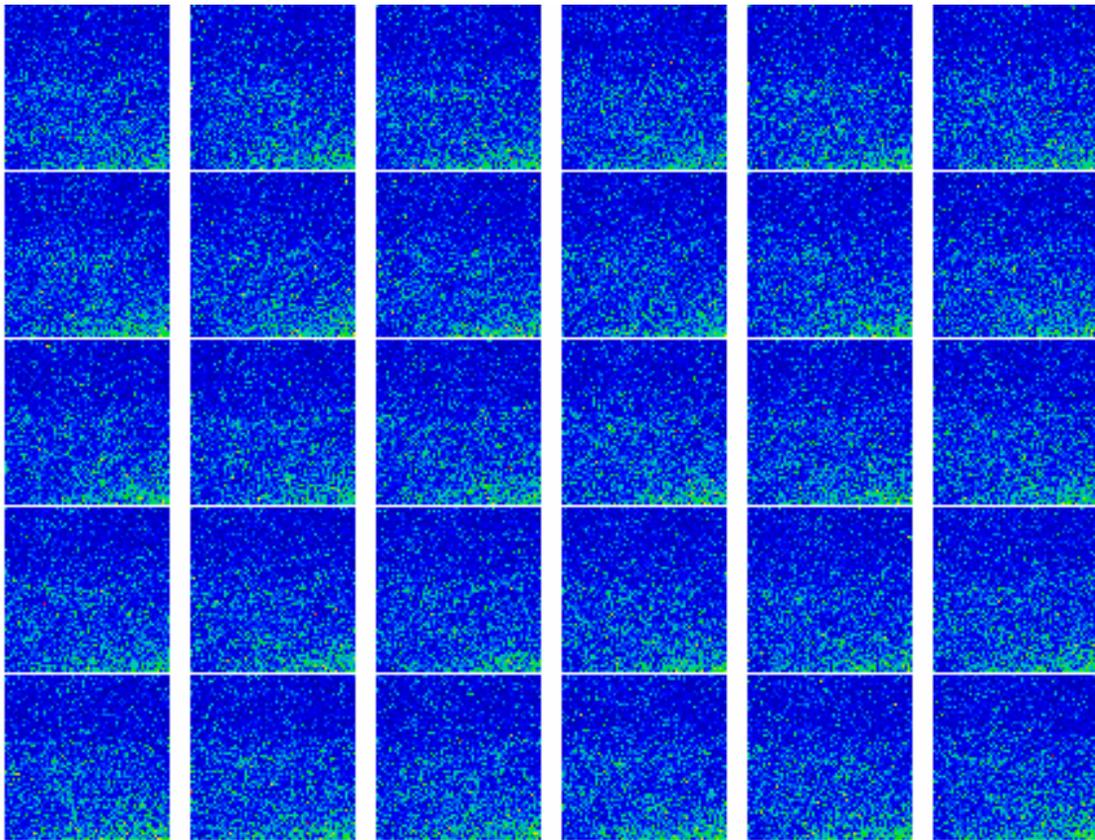
As concentrações de cálcio variam conforme a preparação não sendo possível realizar análise estatística para a determinação de significância em comparação ao meio sem toxina.



**Figura 12.** Diferentes perfis da variação percentual de cálcio citosólico, em relação ao tempo zero, dado pela fluorescência em microscopia confocal após a aplicação da toxina 4-V obtida do “pool” V do veneno do escorpião *Tityus bahiensis*.



**Figura 13.** Exemplo de aumento ocorrido em metade das amostras em que foi feita a aplicação da toxina 4-V isolada do “pool” V do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* da quantidade de cálcio citosólico em fatias hipocâmpais visualizadas em microscópio confocal.



**Figura 14.** Exemplo da não variação ocorrida em metade das amostras em que foi feita a aplicação da toxina 4-V isolada do “pool” V do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* da quantidade de cálcio citosólico em fatias hipocâmpais visualizadas em microscópio confocal.

## 5. Discussão

A espécie *Tityus serrulatus* é considerada a mais perigosa e por isso a maioria dos trabalhos encontrados na literatura é direcionada ao estudo de seu veneno e toxinas. Entretanto, como pouco se sabe a respeito dos efeitos dos venenos de outros escorpiões da família Buthidae (Severino *et al.*, 2009) presentes no Brasil, a pesquisa com veneno destes tem crescido e alguns resultados relativos aos efeitos centrais obtidos com o veneno dos escorpiões *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* são divergentes. Em 1993, Sandoval e Dorce encontraram uma DL<sub>50</sub> de 0,56mg/Kg do veneno do *Tityus serrulatus* quando injetado via endovenosa em ratos enquanto que para o veneno do *Tityus bahiensis* Lourenço *et al.* (2002) encontraram quase o dobro deste valor, 1,180mg/Kg, quando testado em camundongos via endovenosa. Já Nishikawa *et al.* (1994) observaram que, em camundongos, o veneno do *Tityus bahiensis* é mais tóxico que o do *Tityus serrulatus*. As DL<sub>50</sub> intraperitoneais dos venenos do *Tityus bahiensis* e do *Tityus serrulatus* encontradas neste estudo foram 1,062mg/kg e 1,160mg/Kg, respectivamente. Porém, quando testado em cobaias, o veneno do *Tityus bahiensis* apresentou uma dose letal mínima (DLM) de 126µg por animal, aproximadamente duas vezes menor que a do *Tityus serrulatus* (DLM = 250µg por animal) (Nishikawa *et al.*, 1994). Diferenças de espécie, metodologia e sazonalidade podem ser responsáveis por estas discordâncias.

Em um trabalho anterior (Lourenço *et al.*, 2002) realizado no laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, verificou-se que o veneno do *Tityus bahiensis* causa convulsão mais acentuada que a provocada pelo veneno do *Tityus serrulatus*. Posteriormente, foi feito um “screening” das frações deste veneno para verificar quais eram as responsáveis pela pronunciada atividade convulsivante provocada pelo veneno bruto.

As frações IV, V e VI apresentaram resultados epileptogênicos mais pronunciados e por isso, no presente estudo, foram submetidas ao processo de

purificação para obtenção de toxinas. Destas, as que tiveram ótimo rendimento para os experimentos foram estudadas após administração intrahipocampal. O hipocampo foi a região de escolha por estar envolvido no processo epileptogênico. Por isso é utilizado em vários modelos animais de epilepsia (Fisher, 1989). Esta região também é de fácil acesso para administração de substâncias e facilmente identificada na análise histológica.

O hipocampo é um tecido vulnerável com alto potencial epileptogênico e extensas conexões para outras áreas (Surges *et al.*, 2008). A suscetibilidade desta estrutura deve-se ao grande número de sinapses excitatórias que possui, estando também associada à maioria das desordens comportamentais em epilepsia (Fisher, 1989; Lothman *et al.*, 1991). A perda de neurônios desta região tem sido apontada como causa ou efeito da convulsão, já que o *status epilepticus* grave é caracterizado por convulsões prolongadas ou repetidas frequentemente seguidas por dano neuronal que envolve o hipocampo e outras estruturas límbicas (Sutula *et al.*, 1994).

A fração V, primeira a ser submetida à cromatografia, deu origem a 30 picos dos quais apenas os picos 1 (Tb 1-V), 4 (Tb 4-V), 5 (Tb 5-V), 24 (Tb 24-V), 27 (Tb 27-V) e 28 (Tb 28-V) foram testados. Somente as três primeiras toxinas deste “pool” foram utilizadas na dose de 1µg/µl, pois todos os demais peptídeos, na mesma dose, não provocaram qualquer alteração nos animais. Optamos, então, por dobrar suas doses. As toxinas provenientes dos “pools” IV e VI, Tb 3-IV e Tb 14-VI, também foram testadas na dose de 2µg/µl pelo mesmo motivo que o das toxinas citadas anteriormente.

No presente trabalho, todas as toxinas analisadas apresentaram duas ou mais alterações comportamentais. As principais causadoras de alterações foram as toxinas Tb 1-V, Tb 4-V e Tb 5-V as quais provocaram bocejos, aumento da frequência de movimentos mastigatórios, mioclonia e WDS em mais de cinquenta por cento dos animais. WDSs estiveram presentes em todos os grupos e mioclonia só não foi observada após a injeção da Tb 27-V.

Apesar da ausência de convulsões tônicas e/ou clônicas, as principais alterações observadas, com exceção do bocejo, estão relacionadas ao processo convulsivo em roedores.

Sabe-se que os venenos dos escorpiões da família Buthidae possuem uma grande quantidade de toxinas que modulam a função dos canais de sódio (De la Vega e Possani, 2005) e que o mecanismo de ação das toxinas escorpiônicas é o aumento da liberação de neurotransmissores. Estudos realizados com as toxinas provenientes do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* que provoca alterações comportamentais semelhantes às observadas no presente estudo têm demonstrado que estas toxinas são capazes de estimular a liberação de neurotransmissores do sistema adrenérgico, glutamatérgico e GABAérgico nos sinaptossomas corticais de ratos (Gomez *et al.*, 1995; Romano-Silva *et al.*, 1994) e no hipocampo de animais vivos (Nencioni *et al.*, 2003). Devido às semelhanças comportamentais, sugere-se que as toxinas do estudo também aumentem a liberação de neurotransmissores, dentre eles o glutamato, que em excesso pode induzir processos patológicos (Filiat *et al.*, 1998) como convulsões epiléticas (Cunningham *et al.*, 1994) e morte neuronal por excitotoxicidade (Olney, 1986).

Em epilepsia experimental, WDS tem sido descrito como um comportamento associado a convulsões em modelos animais crônicos (Tanaka *et al.*, 1996) e agudos (Dagci *et al.*, 2002). Este comportamento é considerado o precursor da convulsão límbica generalizada (Rondouin *et al.*, 1987; Ootom *et al.*, 2006). Estudos (Elliot *et al.*, 1992; Bristow e Young, 1994; Piot *et al.*, 1995; Stoessl *et al.*, 1995; Duarte, 2003; Umeda *et al.*, 2007) relatam que WDS, auto-limpeza, “sapatear” da pata posterior e locomoção provavelmente estariam relacionados com a liberação de neurotransmissores como dopamina, serotonina ou acetilcolina. Deste modo, a sugestão de que as toxinas estudadas tenham ação semelhante às toxinas do veneno do *Tityus serrulatus* é válida visto que há um provável envolvimento de neurotransmissores neste evento.

Em relação à mioclonia, segunda alteração comportamental mais frequente, sabe-se que é um dos movimentos involuntários mais comuns associado ao processo epiléptico e caracteriza-se por um súbito e rápido surto de contrações musculares (Caviness e Brown, 2004) que envolvem extremidades, face, tronco, não associada à perda de consciência (Shibasaki, 1998).

De acordo com a classificação etiológica proposta por Marsden (1982), a mioclonia verificada no presente estudo corresponde à “mioclonia epiléptica”, alteração que acompanha a epilepsia podendo ocorrer como um componente da convulsão, uma única manifestação convulsiva ou um dos muitos tipos de eventos observados dentro de uma síndrome epiléptica. A natureza específica do circuito neuronal anormal responsável por tal alteração permanece desconhecida (Caviness, 2007; Molteni *et al.*, 2008), porém evidências a partir de modelos animais e humanos sugerem que possa haver múltiplos sítios no sistema nervoso central contribuindo para seu desenvolvimento e que há diversas vias para sua produção a partir de pontos de visão fisiológicos (Caviness, 2007).

Devido ao entendimento comum de que toxinas escorpiônicas liberem neurotransmissores e que o excesso destes possa causar danos neuronais no hipocampo (Hilton *et al.*, 2006), os achados na literatura referentes à mioclonia corroboram com os dados encontrados. A morte neuronal provocada pelas toxinas poderia estar direta ou indiretamente relacionada à alteração comportamental de mioclonia já que a neurodegeneração seria uma das causas desta manifestação comportamental.

O excesso de movimentos mastigatórios verificados indica um comportamento estereotipado oral que consiste de um movimento repetitivo sem função aparente que pode aparecer em animais em situações de excitação (Odberg, 1978). Esta alteração pode ser eliciada em ratos por apomorfina (Ellenbroek e Cools, 2002; Martins *et al.*, 2008) e se restringe ao envolvimento

do sistema dopaminérgico (Ellenbroek e Cools, 2002). Desta forma, pode-se sugerir um efeito das toxinas sobre este sistema.

Bocejos, apesar de não terem correlação com a convulsão, foram alterações observadas em todos os grupos de animais. É um evento fisiológico comum que ocorre concomitantemente com o aumento da atividade eletroencefalográfica cortical (Bertolini e Gessa, 1981). E, provavelmente, as estruturas neurais responsáveis pelo bocejo localizam-se próximas ao tronco encefálico (Daquin *et al.*, 2001) ou dentro dos centros vasomotores e respiratórios, especialmente aqueles que controlam as mímicas faciais, mastigação, garganta e respiração e possivelmente o alongamento (Argiolas e Melis 1998).

O bocejo pode ocorrer como consequência de uma variedade de interações entre neurotransmissores e neuropeptídeos no cérebro (Argiolas e Melis, 1998; Daquin *et al.*, 2001), incluindo dopamina, aminoácidos excitatórios, acetilcolina, serotonina, óxido nítrico, peptídeos relacionados ao hormônio adrenocorticotrófico e oxitocina e é inibido por peptídeos opióides. No entanto, é essencialmente afetado por dopamina (Daquin *et al.*, 2001), substância que pode ativar a produção de ocitocina (Daquin *et al.*, 2001) pelos neurônios oxitocinérgicos que se projetam do núcleo paraventricular do hipotálamo para áreas extra-hipotalâmicas do cérebro como, por exemplo, o hipocampo (Argiolas e Melis, 1998). A ocitocina, então, ativa a transmissão colinérgica no hipocampo fazendo com que a acetilcolina induza o bocejo. Entretanto, essa é apenas uma suposição, já que o hipocampo parece ser a região cerebral onde agonistas de receptores colinérgicos agem induzindo o bocejo (Daquin *et al.*, 2001).

Outra proposta, surgida recentemente, é a de que o bocejo seja um mecanismo termorregulatório (Gallup e Gallup Jr., 2008). A temperatura do cérebro humano é determinada por variáveis que incluem a temperatura do sangue arterial que vai ao cérebro, índice de fluxo sanguíneo e índice de produção metabólica de calor (Caputa, 1981) e há mecanismos químicos e

termorregulatórios que operam para manter a temperatura ótima do cérebro (Falk, 1990). Devido a isto, Gallup e Gallup Jr (2007) propõem que o bocejo funcione como um mecanismo de refrigeração do cérebro que visa manter níveis ótimos de eficiência mental.

Além dos propósitos fisiológicos, bocejos anormais podem ser observados em pacientes epiléticos (Daquin *et al.*, 2001; Yankovsky *et al.*, 2006). O sentimento ou ato de bocejar pode ser parte de convulsões epiléticas. Há relatos de que, na epilepsia parcial, o bocejo seja a aura da convulsão epilética (Askenasy, 1989) e tem sido observado durante espasmos infantis (Donnat e Wright, 2000).

As alterações comportamentais observadas no presente estudo têm em comum o envolvimento do sistema dopaminérgico, o que nos leva supor que a dopamina seja um importante neurotransmissor envolvido na promoção destes eventos. Para a comprovação desta hipótese, poderia ser realizada a dosagem de dopamina por cromatografia líquida de alta eficiência após a administração das toxinas estudadas.

Um comparativo entre o presente estudo e o anterior realizado no mesmo Laboratório (Lourenço *et al.*, 2002) revelou que os resultados são concordantes. A fração P4 não eliciu qualquer alteração comportamental e, dentre todas as testadas, a Tb 3-IV foi toxina que provocou menos alterações. As frações P5 e P6 produziram manifestações comportamentais relacionadas à convulsão tais como WDS, mioclonias e completa imobilidade estando de acordo com os achados atuais em que as toxinas purificadas destas frações apresentaram as alterações mais evidentes.

Em relação às alterações eletrográficas, todas as toxinas estudadas provocaram alterações nestes parâmetros, embora nem todas tenham sido quantificadas. daquelas que tiveram seus resultados tabulados, as toxinas Tb 4-V e Tb 24-V apresentaram menor tempo de latência para o aparecimento de alterações eletrográficas e/ou comportamentais. Quanto à frequência de espículas isoladas, todos os grupos quantificados, com exceção do grupo que

recebeu Tb 27-V, tiveram aumento significativo neste parâmetro. Outros dados que merecem atenção são as descargas eletrográficas. Verificamos que, apesar de apresentar aumento significativo apenas no número e tempo de descargas leves, a toxina Tb 4-V eliciu o aparecimento de descargas moderadas e intensas com maior número de eventos e maior tempo de duração das descargas que as demais toxinas.

Os resultados eletrográficos obtidos neste estudo corroboram com diversos achados da literatura que mostram que a administração do veneno ou de toxinas escorpiônicas altera o traçado da atividade eletrográfica. Carvalho *et al.* (1998) verificaram que a TS-8F, neuropeptídeo posteriormente identificado como sendo a TsTX, induziu espículas isoladas que progrediram para descargas epiléticas intensas. Algumas frações do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* também promoveram alterações eletrográficas tais como descargas moderadas e intensas (Lourenço *et al.*, 2002). Além desta similaridade, as alterações de traçado geralmente coincidiram com a imobilidade do animal, o que também foi encontrado nos trabalhos de Nencioni *et al.* (2003) e de Lourenço *et al.* (2002).

Alterações eletrográficas foram mais evidentes após a injeção da toxina Tb 4-V comprovando seu maior potencial epileptogênico. Em 2002, Lourenço *et al.* verificaram que a fração a qual esta toxina pertence (P5), quando injetada intrahipocampalmente, induzia alterações eletrográficas como descargas intensas e moderadas, o que concorda com nossos achados evidenciando que as toxinas desta fração são mais potentes que as demais testadas.

As toxinas estudadas no presente trabalho apresentaram convulsão eletrográfica. Convulsão pode ser definida como um evento anormal onde descargas excessivas (Fonseca *et al.*, 2005) estão sincronizadas por toda parte e localizadas ou distribuídas por populações de neurônios no cérebro (Lothman *et al.*, 1991). É caracterizada por uma descarga repentina, excessiva e temporária de alguns neurônios cerebrais levando a liberação de

neurotransmissores (Fisher, 1989), podendo haver ou não manifestação comportamental simultânea.

Diversos mecanismos têm sido implicados na origem das convulsões incluindo diminuição na potência da inibição GABAérgica, somação de sinapses excitatórias e ativação de canais sensíveis à voltagem (Lothman *et al.*, 1991) e estes levam ao disparo de uma população limitada de neurônios. A relação entre excitação e inibição é importante, pois a atividade epiléptica parece ser proveniente de alterações no balanço entre elas (Vornov, 1991) e qualquer distúrbio que favoreça a excitação pode levar a uma atividade neuronal excessiva e sincronizada semelhante às descargas epileptiformes humanas (Gerfin-Moser *et al.*, 1995). Provavelmente, os mecanismos envolvidos neste desbalanço são os mecanismos inibitório GABAérgico e o excitatório glutamatérgico (Bradford, 1995).

Várias toxinas do veneno do *Tityus serrulatus*, e de outras espécies como o *Tityus bahiensis* (Possani *et al.*, 1999), agem nos canais de sódio e potássio induzindo a liberação de ACh (Gomez e Farrell, 1985), glutamato e aspartato (Coutinho-Neto *et al.*, 1980), além de outros neurotransmissores, nos sistemas nervosos central e periférico. Há muitos indícios de que alterações na função colinérgica eliciem atividade epileptiforme (Segal, 1991). Estudos bioquímicos com pilocarpina, um agonista muscarínico, mostraram indução de atividade epiléptica similar à epilepsia do lobo temporal em humanos (Turski *et al.*, 1983; Freitas *et al.*, 2003; Smith e Shibley, 2002; Zimmerman *et al.*, 2008). Agonistas de receptores de glutamato causam descargas epileptiformes e danos neuronais no hipocampo (Hilton *et al.*, 2006). Estes efeitos podem explicar as alterações eletroencefalográficas irritativas e epileptogênicas após o envenenamento escorpiônico, pois a hiperativação dos canais de sódio pode representar um mecanismo celular intrínseco explicando a epileptogênese (Farghly e Ali, 1999).

Quanto às análises histológicas realizadas nos cortes hipocampais dos animais injetados com as toxinas isoladas do veneno do *Tityus bahiensis*,

verificamos que o número de células neuronais diminuiu nas regiões CA4 ipsi e contralaterais. As toxinas Tb 3-IV, Tb 1-V, Tb 24-V e Tb 28-V provocaram diminuição neuronal em CA4 ipsi e contralateral à injeção. As demais toxinas não promoveram alteração nas regiões analisadas.

Sabe-se que as convulsões epiléticas prolongadas associam-se à morte neuronal por excitotoxicidade (Griffiths *et al.*, 1984) em estruturas límbicas (Fujikawa *et al.*, 2000), principalmente na amígdala e formação hipocampal (Carpenter, 1978). A vulnerabilidade de cada região do cérebro ao aumento de excitação depende do tipo de receptor e canal iônico existentes nos neurônios que a formam.

No hipocampo, o processo de morte celular está relacionado à entrada excessiva de cálcio nas células mediada por aminoácidos excitatórios (Olney, 1985; Tanaka *et al.*, 1996). Como citado anteriormente, é de grande conhecimento que a participação das neurotoxinas escorpiônicas na liberação de neurotransmissores deve-se à sua ligação aos canais iônicos, principalmente canais de sódio. Estas toxinas mantêm a despolarização fazendo com que os canais de sódio permaneçam abertos por mais tempo aumentando, então, a liberação dos neurotransmissores (Bicalho *et al.*, 2002). Esta excessiva liberação de neurotransmissores, tais como o glutamato, contribui para o aumento de influxo de cálcio dentro do neurônio pós-sináptico promovendo o processo de morte neuronal por excitotoxicidade (Fujikawa, 2005). Baseados neste conhecimento acerca das toxinas, supomos que a lesão neuronal verificada seja decorrente do aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios, o que também provocaria os efeitos comportamentais e eletrográficos observados.

As lesões neuronais foram encontradas somente na região CA4. Células piramidais de CA3 e CA4 emitem axônios que fazem sinapses em CA1 (Guedes *et al.*, 2006). No entanto, na literatura, não são encontrados estudos que provem que o inverso também é verdadeiro, desta forma podemos sugerir

a existência de uma via de estimulação direta ou indireta entre a região de administração das toxinas, CA1, e a região CA4.

Uma hipótese surgida recentemente para a indução de morte neuronal a longa distância é a existência de vias de comunicação bidirecionais entre neurônios e células da glia (Canas *et al.*, 2004). Estas células são capazes de se comunicar umas com as outras de duas maneiras. Uma é através de canais transmembrana que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas entre as células emparelhadas e a outra envolve sinais químicos (gradiente iônico, neurotransmissores, fatores tróficos e citocinas) que trafegam bidirecionalmente entre estas células (Carmignoto, 2000; Perea e Araque, 2002; Tsacopoulos, 2002).

A participação de células gliais na geração de epilepsia é citada por Kumaria *et al.* (2008). Dentre estas células, os astrócitos desempenham um papel crítico no desenvolvimento e fisiologia do SNC estando envolvido em aspectos-chave da função neuronal tais como suporte trófico, sobrevivência neuronal e diferenciação, orientação neuronal, crescimento nervoso e eficácia sináptica. Além disso, contribuem para a homeostase cerebral regulando a concentração de íons e substâncias neuroativas local (Perea e Araque, 2002). Os astrócitos são considerados células não-excitáveis, uma vez que não mostram excitabilidade elétrica, porém são capazes de desenvolver uma forma de excitabilidade baseada nas variações de  $Ca^{2+}$  intracelular (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991)

Neurônios do córtex cerebral, hipotálamo, medula e outras partes do SNC liberam ATP como co-transmissor que serve de sinal dependente de atividade, evocando uma resposta nos astrócitos. Estas células podem reforçar a sinapse liberando glutamato para o neurônio adjacente ou ATP para demais astrócitos (Kumaria *et al.*, 2008). A liberação de ATP astrocítico promove uma onda de cálcio que é propagada para os demais astrócitos através da sua ligação em receptores P2. Após a onda de cálcio ter sido propagada à

distância, astrócitos liberam glutamato a neurônios distantes e sincronizam seus disparos (Kumaria *et al.*, 2008).

As ondas de cálcio parecem ser o mecanismo de sinalização glial à longa distância no SNC, pois tem sido observado que o percurso é de mais de 500µm a uma velocidade de 14µm/s em cultura (Schipke *et al.*, 2002). Esta onda é facilitada pelas junções permeáveis aos íons  $Ca^{2+}$  (Hassinger *et al.*, 1996; Guthrie *et al.*, 1999 ).

A hipótese do envolvimento de ATP nas lesões provocadas pelas toxinas do *Tityus bahiensis* não pode ser descartada, visto que houve diminuição neuronal apenas em CA4. No entanto, concluir tal fato apenas com estudos comportamentais, eletrográficos e histológicos é impossível. Estudos com o co-transmissor ATP poderiam ser úteis para a confirmação desta hipótese.

Vale notar que a toxina injetada no lado ipsilateral não é capaz de chegar ao lado contralateral e provocar lesão, porém pode ser que as associações entre os neurônios de ambos os lados tenham gerado a lesão neuronal observada.

Witter e Amaral (2004) e Swanson *et al.* (1978) afirmam que as duas formações hipocâmpais são interconectadas através de extensas projeções comissurais. Funcionalmente, os dois lados são precisamente sincronizados, em particular, quando os animais estão ativamente explorando seu ambiente (Kocsis *et al.*, 1994). Contudo, o sincronismo dos dois hipocâmpos não tem sido investigado em modelos de animais de epilepsia do lobo temporal. Estudos deste tipo são de extrema importância, pois a atividade eletroencefalográfica patológica relacionada à convulsão no foco pode fortemente influenciar o outro lado através de conexões comissurais (Jefferys e Williams, 1987). Em particular, tem sido mostrado que no cérebro imaturo, atividades paroxismais unilaterais crônicas propagam contralateralmente dentro de estruturas cerebrais saudáveis e induzem um foco epiléptico espelhado (Khalilov *et al.*, 2003).

Dentre todas as toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* estudadas, a Tb 4-V foi a que mostrou ação mais proeminente e por isso foi estudada mais a fundo, por técnica de microdiálise e microscopia confocal por mobilização de cálcio. Esta toxina mostrou indução de convulsão eletrográfica caracterizada por espículas isoladas e agrupadas e descargas leves, moderadas e intensas e alterações comportamentais relacionadas ao processo convulsivo. Apesar da intensa atividade epileptiforme, não foi verificado um grande potencial lesivo por parte desta toxina, apenas uma tendência à diminuição do número de células nas regiões CA1 e CA4 ipsi e contralaterais à injeção. A ausência de significância deve-se ao fato de que alguns animais apresentaram uma extensa lesão neuronal enquanto que os demais, pouca ou nenhuma.

A ação das toxinas do veneno do *Tityus bahiensis* parece seguir um tipo de efeito “tudo ou nada”. Já se tentou correlacionar este efeito com a condição física do acidentado, distribuição de veneno, liberação de toxinas e ação no SNC (De Rezende *et al.*, 1996; Mesquita *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2007), pois efeitos similares são observados clinicamente, onde alguns pacientes apresentam dor e alguns efeitos leves e outros um grande número de efeitos graves (Dorce e Sandoval, 1992; Ismail, 1995). Recentemente, o sistema imune tem sido implicado como o provedor de mudanças fisiopatológicas induzidas por venenos escorpiônicos.

Vários trabalhos têm demonstrado que o veneno escorpiônico e suas toxinas aumentam os níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ , e TNF $\alpha$  em pacientes com envenenamento moderado ou severo (Magalhães *et al.*, 1999; D’Suze *et al.*, 2003; Fukuhara *et al.*, 2003; Petricevich, 2004). Além disso, estas citocinas estão implicadas na severidade das manifestações clínicas do envenenamento. A despolarização causada pela ligação das toxinas com os receptores desencadeia uma cascata de eventos que ao final se manifesta pela síntese e secreção dos mediadores inflamatórios, que por sua vez causam uma variedade de manifestações secundárias que podem levar à morte das vítimas

de acidentes escorpiônicos ou de animais injetados com as toxinas (Petricevich *et al.*, 2007). É importante notar que citocinas são apontadas como tendo a capacidade de afetar profundamente a convulsão em roedores, em particular a IL-1 $\beta$  tem uma ação pro convulsivante em uma grande variedade de modelos de convulsão (Vezzani *et al.*, 2008). Desta maneira, é possível que a liberação de citocinas causada pelas toxinas do veneno escorpiônico contribuam para as alterações eletrográficas observadas em nossos experimentos.

É de grande conhecimento que as toxinas escorpiônicas ajam por ligação em canais de sódio e potássio, principalmente. Essa ligação permite o aumento da liberação de neurotransmissores sendo que, para toxinas do veneno do *Tityus serrulatus*, o glutamato é o principal neurotransmissor liberado e responsável pelo efeito (Massensini *et al.*, 1998; Nencioni *et al.*, 2003). Há poucos estudos a respeito do mecanismo de ação das toxinas do *Tityus bahiensis* (Trequatrinni *et al.*, 1995; Becerril *et al.*, 1996) e as toxinas usadas neste estudo ainda não possuem mecanismo elucidado. Como os resultados obtidos foram semelhantes aos das toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* acreditamos que o mecanismo de ação das toxinas do *Tityus bahiensis* seja semelhante.

Diversos sistemas de neurotransmissores estão envolvidos nos processos convulsivos e para conhecer quais se correlacionam à ação da Tb 4-V foram realizadas coletas de amostras intracerebrais de neurotransmissores por meio da técnica de microdiálise, metodologia que permite o monitoramento temporal do efeito da toxina com o animal vivo e acordado. Esta técnica tem sido extensamente usada para estudar as alterações nas concentrações extracelulares de neurotransmissores relacionados à convulsão no cérebro de pacientes humanos epiléticos e animais experimentais (Meurs *et al.*, 2008).

A ACh, 5-HT e catecolaminas como dopamina, noradrenalina e adrenalina estão associadas com a regulação da atividade epilética no cérebro (Segal, 1991). A noradrenalina (Jimenez-Rivera e Waterhouse, 1991) e ACh (Segal, 1991) são importantes para gerar e manter as descargas. A dopamina

parece modular a excitabilidade hipocampal por ações contrárias dos receptores D1 e D2 (Barone *et al.*, 1991). Em relação à serotonina, alguns achados relatam um aumento nas concentrações extracelulares deste neurotransmissor (Ziz *et al.*, 1992; Cavalheiro *et al.*, 1994) e outros não encontram alterações (Kokaia *et al.*, 1989), porém é fato que a serotonina está implicada na fisiopatologia das convulsões (Starr, 1996; Bagdy *et al.*, 2007). Contudo, são os sistemas inibitório GABAérgico e excitatório glutamatérgico os de maior importância na convulsão, pois um desarranjo no balanço entre eles favorecendo a excitação pode levar a uma atividade neuronal excessiva e sincronizada, características das descargas epileptiformes humanas (Gerfin-Moser *et al.*, 1995). No presente estudo foram dosados os níveis de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC (Leeson e Iversen, 1994; Cecchini *et al.*, 2006), de GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC (Vornov, 1991; Cecchini *et al.*, 2006) e de glicina que, além de atuar como neurotransmissor inibitório na medula espinhal, possui papel excitatório ao agir como co-agonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Leeson e Iversen, 1994).

O complexo receptor NMDA é controlado por vários sítios regulatórios (Zaleski *et al.*, 2004) e os sítios de ligação do glutamato e glicina neste receptor são diferentes, porém alostericamente acoplados. A glicina é um co-agonista obrigatório do receptor NMDA, pois, apesar da glicina por si só não ser capaz de ativar o receptor, sem ela não há ativação (Bressan e Pilowsky, 2003). Como a glicina é importante para a resposta do receptor, uma diminuição em seus níveis seria esperada para que houvesse um mecanismo regulatório na tentativa de diminuir a atividade convulsiva. Porém, não foi verificada essa diminuição, alteração esperada para que finalizasse o processo convulsivo da toxina.

O GABA também não sofreu alterações após a administração da toxina. Assim como o déficit esperado da glicina, um aumento nas concentrações de GABA também era esperado para cessar a atividade convulsiva. Este é o

principal neurotransmissor inibitório do SNC e quando há menor inibição, a excitação prevalece levando a atividade neuronal excessiva. O aumento na liberação de GABA seria um mecanismo compensatório no foco epiléptico que limitaria o desenvolvimento de subseqüentes atividades convulsivas (Jiang e Zhang, 1999; Treiman, 2001). Provavelmente um aumento nos níveis cerebrais de GABA poderia ter sido encontrado mais tardiamente a fim de conter a convulsão e retornar a atividade neuronal normal.

Em relação aos níveis glutamatérgicos, verificamos um sutil aumento não significativo após a administração da toxina. De fato, isto pode ser devido, mais uma vez, ao efeito “tudo ou nada” onde alguns animais apresentaram aumento considerável nos níveis de glutamato enquanto que outros não tiveram aumento aparente, como mostra a análise individual dos resultados. Sabemos que as toxinas escorpiônicas, de modo geral, promovem aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente glutamato (Coutinho-Neto *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 1997; Nencioni *et al.*, 2003). Este aumento relaciona-se com o início da atividade eletrográfica elipeptiforme no hipocampo e córtex entorrinal (Medina-Cejal *et al.*, 2000) podendo piorar ou prolongar a atividade convulsiva pré-existente e, ainda, resultar em excitotoxicidade (Meldrum, 1994). Nencioni *et al.* (2003) mostraram que a TsTX, quando injetada inrahipocampalmente, também eleva os níveis de glutamato e afirmam, ainda, que seus resultados concordam com a hipótese de que o aumento da liberação de aminoácidos excitatórios deve-se à ação em canais de sódio. Estes mesmos elevados níveis de glutamato levam a um aumento exagerado de cálcio, o que ocasiona a morte celular (Choi, 1995).

Com bases nestes conhecimentos, a toxina Tb 4-V também foi submetida à microscopia confocal para verificar a mobilização de cálcio citoplasmático promovida. Os dados obtidos revelaram que a toxina teve potente efeito mobilizador de cálcio chegando até a 110% de mobilização a partir dos valores iniciais e mesmo nos últimos tempos o aumento decaiu para 60 a 90%. Estes resultados mostram que a ação da toxina se deve à este

efeito, porém o mesmo não se repete em todas as fatias hipocâmpais. Algumas amostras não apresentaram efeito mobilizador, variando apenas entre 0,5 e 6%. A presença de mobilização e não mobilização de cálcio encontrada na microscopia confocal concorda com os resultados obtidos com a Tb 4-V nos experimentos anteriores.

O valor basal do cálcio intracelular, geralmente em torno de 100nm, é aproximadamente 10000 vezes menor do que a concentração do cálcio extracelular, que é cerca de 1mM (Miyashiro e Hauache, 2002). Durante a convulsão, quando há excessiva liberação de glutamato, há condução de cálcio para o interior das células após ativação de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA localizados na membrana celular. A disfunção na homeostase de cálcio citoplasmático ativa diversas vias de geração de radicais livres (Valencia *et al.*, 2006), altera lipídios de membrana, produz falha nos sistemas de segundos mensageiros e proteínas quinases, eventos estes que têm efeito tóxico para o neurônio culminando em sua morte (Meldrum e Garthwaite, 1990; Kumlien, 1994; Choi, 1995; Pelletier *et al.*, 1999).

Alguns estudos têm demonstrado que uma toxina isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, a TsTx, promove liberação de glutamato de sinaptossomas corticais (Fletcher *et al.*, 1996; Massensini *et al.*, 1998) ou em microdiálise no hipocampo (Nencioni *et al.*, 2003) estando o cálcio envolvido nessa liberação. Com a Tb 4-V é de se pensar uma ação semelhante à TsTX, onde há ligação aos canais de sódio prolongando a despolarização e promovendo liberação de neurotransmissores, porém um outro mecanismo pode estar envolvido, visto que o mesmo efeito não é observado em todos os animais.

As neurotoxinas escorpiônicas são úteis para o entendimento da neurotransmissão e as toxinas do veneno do *Tityus bahiensis* mostraram ser ótimas ferramentas tanto para esta finalidade quanto para o estudo da circuitaria neuronal envolvida nos processos epileptogênicos do envenenamento. O desenvolvimento de drogas também é promissor, pois,

sabendo que toxinas escorpiônicas atuam com grande afinidade e seletividade em canais iônico, estas poderiam ser melhor estudadas para o tratamento de desordens neurológicas, em particular, aquelas que envolvem o hipocampo. É importante a realização de estudos referentes ao efeito “tudo ou nada” bastante observado com toxinas escorpiônicas e que, neste estudo, também esteve presente. A existência de subtipos específicos de canais em certas regiões hipocampais ou até mesmo uma maior afinidade das toxinas por estes subtipos pode influenciar no efeito. O presente trabalho respondeu à questões impostas inicialmente e também forneceu novas diretrizes para futuros estudos.

## 6. Conclusão

- As toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* provocam alterações comportamentais e eletrográficas e lesão neuronal na região CA4 ipsi e contralateral quando injetadas no hipocampo de ratos;
- Embora sem apresentar convulsão tônico e/ou clônica, as alterações comportamentais observadas relacionam-se com o processo convulsivo;
- As toxinas Tb 3-IV, Tb 4-V Tb 5-V e Tb 14-VI parecem seguir o efeito “tudo ou nada” em relação à lesão neuronal;
- A ação da toxina Tb 4-V, de modo geral, parece ser devido ao aumento na liberação de glutamato. A ação lesiva desta decorreria do aumento da mobilização de cálcio promovido pelo excesso de liberação destes aminoácidos.
- O efeito “tudo ou nada” da Tb 4-V foi observado tanto nas análises comportamentais, eletrográficas, e de lesão neuronal quanto na dosagem de aminoácidos neurotransmissores e mobilização de cálcio citoplásmico;
- As toxinas estudadas podem ser importantes ferramentas para o estudo dos canais iônicos e, principalmente, para o entendimento da circuitaria neuronal.

## 7. Referências bibliográficas

Alves RS, Nascimento NRF, Barbosa PSF, Kerntopf MR, Lessa LMA, Sousa CM, Martins RD, Sousa DF, Queiroz MGR, Toyama MH, Fonteles MC, Martins AMC, Monteiro HSA. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*. 2005; 46: 271-276.

Amaral CF, de Rezende NA, Freire-Maia L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *American Journal of Cardiology*. 1993; 71: 242-245.

Amaral CF, Dias MB, Campolina D, Proietti FA, de Rezende NA. Children with adrenergic manifestations of envenomation after *Tityus serrulatus* scorpion sting are protected from early anaphylactic antivenom reactions. *Toxicon*. 1994; 32: 211-215.

Amaral DG, Ishizuka N, Clairbone B. Neurons, numbers and the hippocampal net work. In: *Progress in Brain Research: Understanding the brain through the hippocampus: The hippocampal region as a model for studying structure an function* (J. storm – Mathisen, J.Zimmer e Ottersen, Eds). 1990. p. 1-11

Amaral DG, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (Eds). *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press. 2007. p. 37-114.

Amaral DG, Witter MP. Hippocampal formation. In: Paxinos G (Ed.) *The rat Nervous System* (second edition). Academia Press, Sydney. 1995. p. 443-493.

Amenta F, Tayebati SK. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15: 488 - 498.

Amitai Y. Clinical manifestation and management of scorpion envenomation. *Public Health Reviews*. 1998; 26: 257-263.

Anderson OAV, Greenberg RM. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2001; part B 129: p. 17-28.

Andrade MV, Lisboa FA, Portugal AL, Arantes RME, Cunha-Melo JR. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2007; 146: 581–587.

Argiolas A, Melis MR. The neuropharmacology of yawning. *European Journal of Pharmacology*. 1998; 343: 1-16.

Askenasy JJM. Is yawning an arousal defense reflex? *Journal of Psychology*. 1989; 123: 609-621.

Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Grandall PH. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurones are preserved in human epileptic hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 1989; 9: 2562-2574.

Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 100: 857-873.

Barone P, Palma V, DeBartolomeis A, Tedeschi E, Muscettola G, Campanella G. Dopamine D1 and D2 receptors mediate opposite functions in seizures induced by lithium-pilocarpine. *European Journal of Pharmacology*. 1991; 195: 157-162.

Becerril B, Corona M, Coronas FIV, Zamudio F, Calderon-Aranda ES, Fletcher PL, Martin BM, Possani LD. Toxic peptides and genes encoding toxin  $\alpha$  of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochemical Journal*. 1996; 313: 753-760.

Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. 1997; 35(6): 821-835.

Bergman CJ, Dubois JM, Rojas E, Rathmayer W. Decreased rate of sodium conductance inactivation in the nodes of Ranvier induced by polypeptide toxin from sea anemone. *Biochemistry and Biophysiology*. 1976; 455: 173-184.

Bertolini A, Gessa GL. Behavioral effects of ACTH and MSH peptides. *Journal of Endocrinological Investigation*. 1981; 4(2): 241-251.

Betz H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends in Neurosciences*. 1991; 14: 458-461.

Bicalho AF, Guatimosi C, Prado MA, Gomez MV, Romano-Silva MA. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. *Neuroscience*. 2002; 113(1):115-123.

Borges A, Rojas-Runjaic FJM. *Tityus perijanensis* González-Sponga (Scorpiones, Buthidae): Molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. *Toxicon*. 2007; 50: 1005-1010.

Bouaziz M, Guetat N, Chelly, H, Triki, S, Jeddi, HM. Electrocardiogram (ECG) after severe scorpion sting (104 cases). *Toxicon*. 1996; 34: 157-158.

Braddy SJ, Aldridge RJ, Gabbott SE, Theron JN. Lamellate book-gills in a late Ordovician eurypterid from the Soom Shale, South Africa: support for a eurypterid-scorpion clade. *Lethaia*. 1999; 32: 72-74.

Braddy SJ, Poschmann M, Tetlie E. Giant claw reveals the largest ever arthropod. *Biology Letters*. 2008; 4:106-109.

Bradford HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress in neurobiology*. 1995; 47(6): 477-551.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (Artrópodos e Peixes). Brasília, 1992.

Brasil. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Butantan. Manual de Vigilância Epidemiológica. Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento. São Paulo, 1993.

Bressan RA, Pilowski LS. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2003; 25(3): 177-183.

Bristow LJ, Young L. Chromodacryorrhoea and repetitive hind paw tapping: models of peripheral and central tachykinin NK1 receptor activation in gerbils. *European Journal of Pharmacology*. 1994; 253: 245-252.

Bucarechi F, Baracat ECE, Nogueira RJN, Chaves A, Zambrone FAD, Fonseca MRCC, Tourinho FS. A comparative study of severe envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, 1995; 37(4): 331-336.

Bucarechi F. Análise das principais diferenças clínicas e epidemiológicas dos acidentes por escorpiões das espécies *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* e, por aranhas do gênero *Phoneutria*, atendidos no CCI-HC-UNICAMP, no período de janeiro de 1984 a julho de 1988. [mestrado]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 1990.

Bücherl W. Escorpiões e escorpionismo no Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*. 1956; 27: 121-153.

Bürchel W. Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In: Bürchel W; Buckley E. (Eds) *Venomous Animal and Their Venoms*. New York – London, Academic Press: 1971. p. 317 – 347.

Campos FV, Chanda B, Beirão PS, Bezanilla F. Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. *The Journal of General Physiology*. 2008; 132(2): 251-263.

Canas N, Vale J, Lima C, Leitão O. Perda neuronal e gliose na esclerose do hipocampo humana: evidência para uma comunicação neurônio-glia? *Sinapse*. 2004; 4(2): 15-20.

Candido DM. Escorpiões. In: Joly CA, Dicubo CEM (Eds) *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*. São Paulo. 1999: 25-34.

Caputa M. Selective brain cooling: an important component of thermal physiology. In: Szeleny Z, Szekely M (Eds). *Contributions to thermal physiology*. 1981. p. 183-192.

Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent  $K^+$  channels by a novel scorpion toxin. *Nature*. 1982; 296(5852): 90-91.

Carmignoto G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62: 561-581.

Carpenter MB. Vias olfatórias, estruturas hipocámpicas e amígdala. In: Carpenter MB (Ed). *Neuroanatomia humana, Interamericana*. 1978. p. 492-515.

Carvalho FF, Nencioni ALA, Lebrun I, Sandoval MRL, Dorce VAC. Behavioral, electroencephalographic and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1998; 60(1): 7-14.

Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends in Neuroscience*. 1989; 12(2): 59-66.

Catterall WA, Hartshorne RP, Beneski DA. Molecular properties of neurotoxin receptor site associated with sodium channels from mammalian brain. *Toxicon*. 1982; 20(1): 27-40.

Catterall WA. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *American Review of Biochemistry*. 1986; 55: 953-985.

Catterall WA. Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1980; 20:15-43.

Catterall WA. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*. 1988; 241: 50-61.

Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah-Mazzacoratti MG. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia*. 1994; 35: 1-11.

Caviness JN, Brown P. Myoclonus: current concepts and recent advances. *Lancet Neurology*. 2004; 10: 598-607.

Caviness JN. Parkinson and related disorders. Myoclonus. *Parkinsonism and related disorders*. 2007; 13 (Suppl 3): S375-384.

Cecchini AL, Vasconcelos F, Amara SG, Giglio JR, Arantes EC. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTX-V on neurotransmitter uptake in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; 217: 196–203.

Cendrero L. *Zoología hispanoamericana – Invertebrados (vol. I)*. México: Editorial Porrúa; 1971.

Cestèle S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. 2000; 82: 883-92.

Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T, Catterall WA. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(30): 21332-21344.

Champetier de Ribez G. Scorpion poisoning in children. *Annales de pédiatrie (Paris)*. 1985; 32(4): 399-404.

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*. 1991; 6: 983–992.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623-634.

Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 1987; 7: 369-379.

Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. Trends in Neuroscience. 1995; 18: 58-60.

Choursousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis immune-mediated to inflammation. New England Journal of Medicine. 1995; 332: 1351-1362.

Clot-Faybesse O, Guieu R, Rochat H, Devaux C. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. Life Science. 2000; 66: 185-192.

Conceição IM, Lebrun I, Cano-Abad M, Gandia L, Hernandez-Guijo JM, Lopez MG, Villarroya M, Jurkiewicz A, Garcia AG. Synergism between toxin-gamma from Brazilian scorpion *Tityut serrulatus* and veratridine in chromaffin cells. American Journal of Physiology. 1998; 274(6 Pt 1): C1745-C1754.

Corcoran ME. Characteristics of accelerated kindling after depletion of noradrenaline in adults rats. Neuropharmacology. 1988; 27: 1081-1084.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signaling. Science. 1990; 247: 470-473.

Corsellis JAN, Bruton CJ. Neuropathology of status epilepticus in humans. In: Delgado-Exueta AV, Westerlain CG, Treiman DM, Porter RJ (Eds). Status epilepticus: mechanisms of brain damage and treatment. New York: Raven Press. 1983. p. 129-39. (Advances in neurology, vol 34).

Couraud F, Jover E. Mechanism of action of scorpion toxins. In: Tu AT (Ed). Handbook of natural toxins: Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms, 2ed. New York: Marcel Dekker. 1984. p. 659-678.

Coutinho-Netto J, Abdul-Ghani AS, Norris PJ, Thomas AJ, Bradford HF. The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro. Journal of Neurochemistry. 1980; 35 (3): 558-565

Cruz EFS. Biologia dos Escorpiões. In: Barraviera B. Venenos Animais – Uma visão integrada. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas; 1994. p.135-150.

Cunningham MD, Ferkany JW, Enna SJ. Amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. Life Science. 1994; 54: 135-148.

Dagci T, Tan M, Koylu EO, Tan U, Pogun S. The effect of octreotide on kainate-induced wet dog shakes and seizure activity in male and female rats. *International Journal of Neuroscience*. 2002; 112(7): 829-839.

Daquin G, Micallef J, Blin O. Yawning. *Sleep Medicine Reviews*. 2001; 5(4): 299-312.

Dargent B, Arsac C, Tricaud N, Couraud F. Activation of voltage-dependent sodium channels in cultured cerebellar granule cells induces neurotoxicity that is not mediated by glutamate release. *Neuroscience*. 1996; 73(1): 209-216.

Dauplais M, Gilquin B, Possani LD, Gurrola-Briones G, Roumestand C, Menez A. Determination of the three-dimensional structure of noxistoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. *Biochemistry*. 1995; 34: 16563-16573.

De Azevedo MMM. Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopórtulas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas. [doutorado]. Campinas: Departamento de Físico-Química da Universidade Estadual de Campinas; 2005.

De Bin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology*. 1993; 264: 361-369.

De La Vega RC, Possani LD. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon*. 2007; 49: 171-180.

De La Vega, RCR, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 2004; 43: 865-875.

De La Vega, RCR, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. 2005; 46: 831-844.

De Matos IM, Talvani A, Rocha OO, Freire-Maia L, Teixeira MM. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon*. 2001; 39: 863-867.

De Rezende NA, Chávez-Olortegui C, Amaral CF. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? *Toxicon*. 1996; 34(7): 820-823.

De Souza CAR, Candido DM, Lucas SM, Brescovit AD. On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). Zootaxa. 2009; 1987: 1-38.

Donnat JF, Wright FS. Unusual variants of infantile spasms. Journal of Child Neurology. 2000; 6(4): 313-318.

Dorce VAC, Sandoval MRL. Brazilian scorpions venoms: pharmacological aspects. Ciência e Cultura. 1992; 44: 187-191.

D'Suze G, Salazar V, Diaz P, Sevcik C, Azpurua H, Bracho N. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. Toxicon. 2003; 44: 851-860.

Duarte FS. Avaliação dos efeitos centrais da substância P *free acid*, dos inibidores de peptidases e das seqüências C- e N-terminal da substância P no labirinto em cruz elevado. [mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.

Ebert RF. Amino Acid Analysis by HPLC: Optimized Conditions for Chromatography of Phenylthiocarbamyl Derivatives. Analytical Biochemistry. 1986; 154: 431-435.

Eeg-Olofsson O. Virological and immunological aspects of seizure disorders. Brain & Development. 2003; 25: 9-13.

Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. Neuroimmunomodulation. 2005, 12: 255-269.

Ellenbroek BA, Cools AR. Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. Behavior Genetics. 2002; 32(5): 349-361.

Elliot PJ, Mason GS, Graham EA, Turpin MP, Hagan RM. Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins. Behavioural Brain Research. 1992; 51: 77-82.

Espinosa E, Bermudez-Rattoni F. Behavior-Immunity relationship: the role of cytokines. Revista de Investigación Clínica. 2001, 53: 240-253.

Falk D. Brain evolution in Homo: the "radiator" theory. Behavioural Brain Science. 1990; 13: 333-381.

Fan HW, Cardoso JLC, Araújo FAA. Epidemiology of scorpion envenomations in Brazil. *Toxicon*. 1996; 34: 160-161.

Faraci FM, Choi J, Baumbach GL, Mayhan WG, Heistad DD. Microcirculations of the area postrema: permeability and vascular responses. *Circulation Research*. 1989; 65: 417-425.

Farghly WMA, Ali FA. A clinical and neurophysiological study of scorpion envenomation in Assiut, Upper Egypt. *Acta Paediatrica*. 1999; 88: 290-294.

Fariello RG, Forchetti CM, Fisher RS. GABAergic function in relation to seizure phenomena. In: Fisher RS, Coyle JT (Eds). *Neurotransmitters and epilepsy*. New York: Wiley-Liss; 1991. p.77-93.

Fernandez-Bouzas A, Morales-Resendiz ML, Llamas-Ibarra F, Martinez-Lopez M, Ballesteros-Maresma A. Brain infarcts due to scorpion stings in children: MRI. *Neuroradiology*. 2000; 42: 118–120.

Fet V, Sissom WD, Lowe G, Braunwalder ME. *Catalog of the scorpions of the world (1758-1998)*. New York Entomological Society: New York; 2000.

Filiat P, Pernot-Marino I, Boubichun D, Lallement G: Behavioral effects of NBQX, a competitive antagonist of the AMPA receptors. *Pharmacology Biochemistry*. 1998; 59: 1087-1092.

Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Research Reviews*. 1989; 14: 245-278.

Fletcher PL, Fletcher M, Fainter LK, Terrian DM. Action of New World scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon*. 1996; 34(11-12): 1399-1411.

Fonseca LC, Tedrus GMAS, Lalloni DT, Tella LMG, Maluf P, de Sousa VD. Distúrbio cognitivo transitório associado a atividade epileptiforme generalizada ou difusa durante o eletrencefalograma. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 2005; 63 (3-B): 817-824.

Freire-Maia L, Campos JA, Amaral CFS. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*. 1994; 32:1009-1014.

Freire-Maia L, Campos JA. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: Ownby CL, Odell GV. (Eds). *Natural Toxins. Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. Oxford: Pergamon Press; 1989. p. 139-159.

Freitas RM, Souza FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Acute alterations of neurotransmitters levels in striatum of young rat after pilocarpine-induced status epilepticus. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 2003; 61: 430-433.

Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*. 2000; 98(1): 41-53.

Fujikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy Behavior*. 2005; 3: 3-11.

Fukuhara YD, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ, Donadi EA. Increased plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*. 2003; 41: 49-55.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos: 1998. Brasília; 2001. 2<sup>a</sup> ed.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999; 340: 448-454. Voronov E, Apte RN, Sofer S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 1999; 5(1): 25-53.

Gale K. GABA in epilepsy: the pharmacologic basis. *Epilepsy*. 1989; 30: 1-11.

Gallup AC, Gallup Jr GG. Yawning and thermoregulation. *Physiology and Behavior*. 2008; 95: 10-16.

Gallup AC, Gallup Jr GG. Yawning as a brain cooling mechanism: nasal breathing and forehead cooling diminish the incidence of contagious yawning. *Evolutionary Psychology*. 2007; 5: 92-101.

Gerfin-Moser A, Grogg F, Rietschin L, Thompson SM, Streit P. Alterations in glutamate but not GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression as a consequence of epileptiform activity in vitro. *Neuroscience*. 1995; 67(4): 849-865.

Giorgi FS, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2004; 28(5): 507-524.

Gomez MV, Farrell N. The effect of tityus toxin and ruthenium red on the release of acetylcholine from slices of cortex of rat brain. *Neuropharmacology*. 1985; 24: 1103-1107.

Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MAM. Effects of tityustoxin on central nervous system. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*. 1995; 14: 437- 456.

Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: cGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p. 270-294.

Griffiths T, Evans MC, Meldrum BS. Status epilepticus: The reversibility of calcium loading and acute neuronal pathologic changes in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 1984; 12 (2): 557-567.

Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Rotin D. Activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter during cell volume regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 23823-23828.

Guedes FA, Galvis-Alonso OY, Leite JP. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humano e em modelos animais. *Journal of Apilepsy and Clinical Neuropharmacology*. 2006; 12: 10-17.

Guidine PA, Mesquita MB, Moraes-Santos T, Massensini A, Moraes MF. Electroencephalographic evidence of brainstem recruitment during scorpion envenomation. *Neurotoxicology*. 2009; 30(1): 90-96.

Guidine PAM, Moraes-Santos T, Massensini AR, Moraes MFD. Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation. *Neurotoxicology*. 2008; 29: 136-142.

Gurevitz M, Karbat I, Cohen L, Ilan N, Kahn R, Turkov M, Stankiewicz M, Stuhmer W, Dong K, Gordon D. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon*. 2007; 49: 473-489.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19(2): 520-528.

Gwee MC, Nirthanan S, Khoo HE, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Cheah LS. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2002; 29(9): 795-801.

Hassinger TD, Gathrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93 (23): 13268-13273.

Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio Journal of Medicine*. 1954; 3: 192–193.

Heinrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136: 66-74.

Hering SE, Azevedo-Marques MM, Menezes JB, Cupo P. Características clínicas e epidemiológicas de 967 casos de escorpionismo. In: *Anais do V Congresso Brasileiro de Toxicologia*; 1980; Bahia. Salvador; 1987. p. 23.

Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Dibbens LM, Mulley JC. Channelopathies in idiopathic epilepsy. *American Society for Experimental Neurotherapeutics*. 2007; 4: 294-304

Hertz L. Glutamate, a neurotransmitter – And so much more A synopsis of Wierzba III. *Neurochemistry International*, 2006; 48: 416-425.

Hille B. *Ion channels of excitable membranes*. 3<sup>rd</sup> ed. Sunderland: Sinauer; 2001.

Hilton GD, Nunez JL, Bambrick L, Thompson SM, McCarthy MM. Glutamate-mediated excitotoxicity in neonatal hippocampal neurons is mediated by mGluR-induced release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores and is prevented by estradiol. *European Journal of Neuroscience*. 2006; 24: 3008-3016.

Hsiao MC, Chan CH, Srinivasan V, Ahuja A, Erinjilppurath G, Zanos TP, Gholmieh G, Song D, Wills JD, Lacoss J, Courellis S, Tanguay AR, Granacki JJ, Marmarelis VZ, Berger TW. VLSI Implementation of a Nonlinear Neuronal Model: A “Neural Prosthesis” to Restore Hippocampal Trisynaptic Dynamics. *Proceedings of the 28th IEEE. EMBS Annual International Conference*. New York City. 2006; 1: 4396-4399.

Inceoglu B, Lango J, Jing J, Chen L, Doymaz F, Pessah IN, Hammock BD. One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(3): 922-927.

Ismail M, Abd-Elsalam MA, Morad AM. Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leirus quisquestratus* influence the course of toxicity? *Toxicon*. 1990; 28(11):1265-1284.

Ismail M, Osman OH, El Asmar MF. Pharmacological studies of the venom from the scorpion *Buthus minax* (L. Koch). *Toxicon*. 1973; 11(1): 15-20.

Ismail M, Osman OH, Gumaa KA, Narrar MA. Some pharmacological studies with scorpion (*Pandinus exitialis*) venom. *Toxicon*. 1974; 12(1): 75-82.

Ismail M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*. 1995; 33(7): 825-858.

Januário MC, Campolina D. Acidentes por animais peçonhentos. In: Pires, M.T.B. (Ed.). *Erazo Manual de Urgências em Pronto Socorro*, MEDSI. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1996. p. 740–752.

Jefferys JG, Williams SF. Physiological and behavioural consequences of seizures induced in the rat by intrahippocampal tetanus toxin. *Brain*. 1987; 110 (Pt 2): 517-532.

Jiang CL, Zhang WQ. Effect of scorpion venom on the release of GABA in hippocampus of epileptic rats induced by kainic acid. *Sheng Li Xue Bao*. 1999; 51 (6): 609-614.

Jimenez-Rivera CA, Waterhouse BD. The role of central noradrenergic systems in seizure disorders. In: Fisher RS, Coyle JT (Eds). *Neurotransmitters and Epilepsy*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 109-129.

Jover E, Couraud F, Rochat H. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1980; 95(4): 1604-1614.

Kalapothakis E, Olórtogui CC. Venom Variability among several *Tityus serrulatus* specimes. *Toxicon*. 1997; 35(10): 1523-1529.

Kamenz C, Dunlop JA, Scholtz G, Kerp H, Hass H. Microanatomy of Early Devonian book lungs. *Biology Letters*. 2008; 4: 212-215.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Mecanismos celulares da aprendizagem e as bases biológicas da individualidade. Trad. de ACG Pereira *et al.* In: *Princípios da Neurociência*. 4ª ed. Barueri: Manole; 2003. p. 36-62. a

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Mecanismos celulares da aprendizagem e as bases biológicas da individualidade. Trad. de ACG Pereira *et al.* In: Princípios da Neurociência. 4ª ed. Barueri: Manole; 2003. p. 1259-1278. b

Khalikov I, Holmes GL, Ben-Ari Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nature Neuroscience*. 2003; 6(10): 1079-1085.

King GF, Escoubas P, Nicholson GM. Peptide toxins that selectively target insect Na(V) and Ca(V) channels. *Channels (Austin)*. 2008 Mar 9; 2(2).

Knöpfel T, Kuhn R, Allgier H. Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995; 38: 1417-1426.

Kocsis B, Thinschmidt JS, Kinney GG, Vertes RP. Separation of hippocampal theta dipoles by partial coherence analysis in the rat. *Brain Research*. 1994; 660(2): 341-345.

Kokaia M, Kalen P, Bengzon J, Lindvall O. Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine release in the hippocampus during seizures induced by hippocampal kindling stimulation: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*. 1989; 32: 647-656.

Kumaria A, Tolias CM, Burnstock G. ATP signalling in epilepsy. *Purergic Signalling*. 2008; 4: 339-346.

Kumlien E. *In vitro* and *in vivo* studies on epileptogenesis tissue in temporal lobe epilepsy. [mestrado] Uppsala: Faculdade de Medicina de Uppsala; 1994.

Láson W. Genetic aspects of epilepsy. *Pharmacol Rep*. 2006, 58: 137-150.

Lee BK, Lee DH, Park S, Park SL, Yoon JS, Lee MG, Lee S, Yi KY, Yoo SE, Lee KH, Kim YS, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS. Effects of KR-33028, a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 inhibitor, on glutamate-induced neuronal cell death and ischemia-induced cerebral infarct. *Brain Research*. 2009; 1248: 22-30.

Lee D, Adams ME. Sodium channels in central neurons of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*: basic properties and modification by scorpion toxins. *Journal of Insect Physiology*. 2000; 46: 499-508.

Leeson PD, Iversen LL. The glycine site of the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1994; 37: 4053-4067.

Leipold E, De Bie H, Zorn S, Borhes A, Oliveira BM, Terlau H, Heinemann SH.  $\mu$ O-Conotoxins inhibit  $\text{Na}_v$  channels by interfering with their voltage sensors in domain-2. *Channels*. 2007; 1(4): 253-262.

Li MH, Zhang NX, Chen XQ, Wu G, Wu HM, Hu GY. BmKK4, a novel toxin from the venom of Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch, inhibits potassium currents in rat hippocampal neurons in vitro. *Toxicon*. 2003; 42(2): 199-205.

Lippens G, Najib J, Wodak SJ, Tatar A. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry*. 1995; 34(1):13-21.

López-Meraz ML, González-Trujano ME, Neri-Bazán L, Hong E, Rocha LL. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology*. 2005; 49(3): 367-375.

Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal of Psychology and Neurology*. 1934; 46: 113-117.

Lothman EW, Bertram ED, Stringer JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Progress in Neurobiology*. 1991; 37: 1-82

Lourenço GA, Lebrun I, Dorce VAC. Neurotoxic effects of fractions isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1984). *Toxicon*. 2002; 40: 149-157.

Lourenço WR. Reproduction in scorpion, with special reference to parthenogenesis. In: Toft S, Scharff N (Eds). *European Arachnology*. Aarhus: Aarhus University Press; 2000. p. 71-85.

Lucas SM, Silva Júnior PI. Acidentes por escorpiões - Escorpiões de interesse médico no Brasil. In: Schvartsman S (Ed). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 1992. p. 211-227.

Lucatero AGP. Mecanismos y circuitos neuronales Hipocámpicos involucrados en la acción anticonvulsivante de Dinorfina. [doutorado]. Colima: Universidad de Colima; 2002.

Machado RP, Cunha RO, Viera OJO, Ribeiro LA, Tanaus M. Epidemiologia do acidente escorpiônico em Uberaba e municípios próximos, 1995 a 1997. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2000; 33: 399-400.

Magalhães O. Escorpionismo IV. Memórias. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1946.

Magalhães MM, Pereira ME, Amaral CF, Rezende NA, Campolina D, Bucarechi F, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*. 1999; 37:1155-1164.

Marsden CD. The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartemberg Lecture. *Neurology*. 1982; 32: 514-539.

Martins PJF, Nobrega JN, Tufik S, Almeida VD. Sleep deprivation - induced gnawing - relationship to changes in feeding behavior in rats. *Physiology and Behavior*. 2008; 93: 229-234.

Massensini AR, Moraes-Santos T, Gomez MV, Romano-Silva MA. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on  $[Na^+]_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$ . *Neuropharmacology*. 1998; 37(3): 289-297.

Mathie A, Kennard LE, Veale EL. Neuronal ion channels and their sensitivity to extremely low frequency weak electric field effects. *Radiation Protection Dosimetry*. 2003; 106(4):311-315.

Matthiesen FA. Parthenogenesis in scorpions. *Evolution*. 1962; 16(2): 255-256.

McBain C, Dingledine R. Dual-component miniature excitatory synaptic currents in rat hippocampal CA3 neurons. *Journal of Neurophysiology*. 1992; 68: 16-27.

McBain CJ, Mayer ML. N-Methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiology Reviews*. 1994; 74: 723-760.

McIntyre DC. Amygdala kindling in rats: facilitation after local amygdala norepinephrine depletion with 6-hydroxydopamine. *Experimental Neurology*. 1980; 69: 395-407.

Medina-Ceja L, Morales-Villagrán A, Tapia R. Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats. *Brain Research Bulletin*. 2000; 53: 255-262.

Méier J, White. J. Biology and distribution of scorpions of medical importance. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. New York: CRC Press; 1995. p. 205-219.

Meldrum BS, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacology Science*. 1990; 11: 379-387.

Meldrum BS. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Research*. 1991; 10: 55-61.

Meldrum BS. GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *British Journal Clinical of Pharmacology*. 1989; 27(1): 3S-11S.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*. 2000; 130: 1007S-1015S.

Meldrum BS. Implications for neuroprotective. *Progress in Brain Research*. 2002; 135: 487-495.

Meldrum BS. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*. 1994; 44(11Suppl 8): 14-23.

Meldrum BS. Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsy*. 1995; 36(1): S30-35.

Mesquita MBS, Moraes-Santos T, Moraes MFD. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2003; 187: 58-66.

Mesquita MBS, Moraes-Santos T, Moraes MFD. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neuroscience Letters*. 2002; 332: 119-122.

Meurs A, Clinckers R, Ebinger G, Michotte Y, Smolders I. Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *Epilepsy Research*. 2008; 78: 50-59.

Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidatibe stress and aging. *Progress in Neurobiology*. 1998; 54: 369-415

Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 1985; 313(6000): 316-318.

Mitterdorfer J, Bean BP. Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22(23): 10106-10115.

Miyashiro K, Hauache OM. Mutações do gene do receptor sensível ao cálcio extracelular e suas doenças associadas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. 2002; 46(4): 412-418.

Molteni E, Perego P, Zanolra N, Reni G. Entropy analysis on EEG signal in a case of study of focal myoclonus. Conference proceedings, Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2008; 2008: 4724-4727.

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as neurotransmitter. *Nature*. 2002; 3: 748-755.

Nencioni ALA, Lebrun I, Dorce VAC. A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2003; 74: 455-463.

Nencioni AL, Lourenço GA, Lebrun I, Glorio JC, Dorce VAC. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. *Neuroscience Letters*. 2009; 463(3): 234-238.

Niebauer M, Gruenthal M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental *status epilepticus*. *Neuropharmacology*. 1999; 38:1343-1348.

Nishikawa AK, Caricati CP, Lima ML, Dos Santos MC, Kipnis TL, Eickstedt VR, Knysak I, Da Silva MH, Higashi HG, Da Silva WD. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*. 1994; 32(8): 989-998.

Nunan EA, Moraes MF, Cardoso VN, Moraes-Santos T. Effects of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sciences*. 2003; 73(3): 319-325.

Odberg FO. Abnormal behaviours: (stereotypies) In: Proc. Ist. World Congress on Ethology applies too zootechnics: Madrid: Industrias Graficas Espana; 1978. p. 475-480.

Olamendi-Portugal T, Gomez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD. A novel structural class of potassium-channel blocking toxin from the scorpion *Pandirus imperator*. *Biochemical Journal*. 1996; 315: 977-98.

Olney JW. Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Advances in Experimental in Medicine and Biology*. 1986; 203: 631-645.

Olney JW. Excitatory amino acids and epilepsy-related brain damage. *International Review of Neurobiology*. 1985; 27: 337-362.

Olsen RW. The GABA postsynaptic membrana receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Molecular Cell Biochemistry*. 1981; 39: 261-279.

Osnaya-Romero N, Jesus Medina-Hernandez T, Flores-Hernandez, SS, Leon-Rojas G. Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. *Toxicon*. 2001; 39: 781-785.

Otoom SA, Handu SS, Wazin JF, James H, Sharma P, Hasan ZA, Sequeira RP. Veratridine-induced wet dog shake behaviour and apoptosis in rat hippocampus. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2006; 98: 423-426.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4<sup>a</sup> ed. San Diego, California: Academic press; 1998.

Pelletier MR, Wadia JS, Mills LR, Carlen PL. Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores. *Journal of Neurophysiology*. 1999; 81(6): 3054-3064.

Perea G, Araque A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *Journal of Physiology (Paris)*. 2002; 96: 199-207.

Peterson SL, Albertson TE. Neurotransmitter and neuromodulator function in the kindled seizure and state. *Progress in Neurobiology*. 1982; 19: 237-270.

Petricevich VL. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy*. 2004; 3(3): 325-332.

Petricevich VL, Cruz AH, Coronas FIV, Possani LD. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*. 2007; 50: 666-675.

Pintar A, Possani LD, Delepierre M. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a  $\beta$ -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *Journal of Molecular Biology*. 1999; 287: 359-367.

Piot O, Betschart J, Grall I, Ravard S, Garret C, Blanchard JC. Comparative behavioural profile of centrally administered tachykinin NK1, NK2 and NK3 receptor agonists in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 116: 2496-2502.

Polis G A. The Biology of Scorpions. California: Stanford University Press; 1990. p. 247-293.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels. European Journal of Biochemistry. 1999; 264(2): 287-300.

Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie. 2000; 82(9-10): 861-868.

Ramón y Cajal S. Structure and connections of neurons. Bulletin of the Los Angeles Neurobiological Society. 1952; 17(1-2): 5-46.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Farmacologia. 6<sup>a</sup> ed. Nova York: Churchill/Livingstone; 2006.

Ravizza T, Vezzani A. Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. Neuroscience. 2006; 137: 301-308.

Reeves JJ. Scorpion envenomation. Clinical Toxicology Review. 1998; 20: 1-6.

Resmondes AMCP. Funções da via temporoamônica no hipocampo de rato: fisiologia e comportamento. [doutorado] Coimbra: Universidade de Coimbra; 2004.

Revelo MP, Bambilra EA, Ferreira AP, Diniz CR, Chávez-Olórtegui C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. Toxicon. 1996; 34(10): 119-125.

Roberts E. GABA-related phenomena, models of nervous system function, and seizures. Annals of Neurology. 1984; 16(Suppl.): 77-89.

Rochat H, Bernard P, Couraud F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: Ceccarelli B, Clementi F. Advances in Cytopharmacology. New York. Raven Press. 1979; 3: 325-334.

Rochat H, Darbon H, Jover E, Martin MF, Bablito J, Couraud F. Interaction of scorpion toxins with the sodium channel. Journal of Physiology. 1984; 79: 334-337.

Rogacheski E, Mazer S, Rodrigues D, Bittencourt PRM. Análises visual e volumétrica por ressonância magnética das formações hipocâmpais em um grupo de pacientes com diagnóstico clínico de epilepsia do lobo temporal. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 1998; 56(3-A): 419-428.

Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Gomez MV, Moraes-Santos T, Brammer MJ. Tityustoxin mediated  $\text{Na}^+$  influx is more efficient than KCL depolarization in promoting  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release from synaptosomes, *Neuroscience*. 1994; 169: 90-92.

Romero NO, Hernandez TJM. Cerebral edema associated to scorpion sting: a two case sting report. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2005; 11: 594-600.

Rondouin G, Lerner-Natoli M, Hashizume A. Wet dog shakes in limbic versus generalized seizures. *Experimental Neurological*. 1987; 95(2): 500-505.

Saldarriaga CM, Otero PR. Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos. *MedUNAB*. 2000; 3: 17-23.

Sampaio SV, Coutinho-Neto J, Arantes EC, Toyama MH, Novello JC, Giglio JR. TsTX-VII, a new toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom able to induce the release of neurotransmitters from brain synaptosomes not blocked by tetrodotoxin. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1997; 41(6): 1255-1263

Sandoval MRL, Dorce VAC. The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat: age and sex influence. *Memórias do Instituto Butantan*. São Paulo. 1993; 55: 5-10.

Scatton B. Pharmacology of excitatory amino acid receptors: novel therapeutic approaches in neurodegenerative disorders. In: Racagni G, Brunello N, Langer SZ (Eds). *Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders in cognitive dysfunction*. Vol 7. Capri: International Academy for Biomedical and Drug Research; 1994. p. 157-165.

Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H. Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB Journal*. 2002; 16(2): 255-257.

Schoepp DD, Johnson BG, Salhoff CR, Wright RA, Goldsworthy JS, Baker SR. Second-messenger responses in brain slices to elucidate novel glutamate receptors. *Journal of Neuroscience Methods*. 1995; 59: 105-110.

Scholtz G, Kamenz C. The book lung of Scorpiones and Tetrapulmonata (Chelicerata, Arachnida): Evidence for homology and a single terrestrialisation event of common arachnid ancestor. *Zoology (Jena)*. 2006; 109:2-13.

Sdzelenyi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Research Bulletin*. 2001, 54: 329-338.

Segal M. Acetylcholine and epilepsy. In: Fisher RS, Coyle JT. *Neurotransmitters and Epilepsy*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 95-101.

Severino DN, Pereira RL, Knysak I, Cândido DM, Kwasniewski FH. Edematogenic activity of scorpion venoms from the Buthidae family and the role of platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. *Inflammation*. 2009; 32 (1): 57-64.

Shahbazzadeh D, Srairi-Abid N, Feng W, Ram N, Borchani L, Ronjat M, Akbari A, Pessah IN, de Waards M, El Ayeb M. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochemical Journal*. 2007; 404: 89-96.

Shibasaki T. Stress and neuropeptides. *Nippon Ika Daigaku Zasshi*. 1998; 65: 2-6.

Shirokova N, Niggli E. Studies of RyR function in situ. *Methods*. 2008; 46: 183-193.

Silva AV, Cavalheiro EA. *Epilepsia: uma janela para o cérebro. A mente humana*. 2004: 3.

Simons RK, Hoyt DB. Immunomodulation. *Advanced Trauma and Critical Care*. 1994; 9: 135.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>

Smith BN, Shibley H. Pilocarpine-induced *status epilepticus* results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Research*. 2002; 49: 109-120.

Soleglad ME, Fet V. High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). *Euscopius*. 2003; 11: 1-175.

Starr MS. The role of dopamine in epilepsy. *Synapse*. 1996; 22: 159-194.

Stoessl AJ, Brackstone M, Rajakumar N, Gibson CJ. Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK1 tachykinin receptor agonist. *Brain Research*. 1995; 700: 115-120.

Stormer L. *Gigantoscrapio willsi*: a new scorpion from the lower Carboniferous of Scotland and its associated preying microorganism. *Skrifter utgit*, 1963.

Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neuroscience*. 1998; 1: 366-373.

Strong PN, Weir SW, Beech DJ, Hiestand P, Kocher HP. Effects of potassium channels toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalin in rabbit blood vessels. *British Journal of Pharmacology*. 1989; 98 (3): 817-826.

Surges R, Schukze-Bonhage A, Altenmüller DM. Hippocampal involvement in secondarily generalised seizures of extrahippocampal origin. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2008; 79: 924-929.

Sutula TP, Cavajos JE, Woodard AR. Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and development of epilepsy. *Hippocampus*. 1994; 4: 254-258.

Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1978; 181(4): 681-715.

Tamassone R, Vainstub V, Peirano S. Envenenamiento grave por escorpión en Pediatría. *Archivos Argentino de Pediatría*. 2007; 101: 392-397.

Tanaka K, Graham SH, Simon RP. The role of excitatory neurotransmitters in seizure-induced neuronal injury in rats. *Brain Research*. 1996; 737: 59-63.

Tapia R, Mecina-Ceja L, Peña F. On the relationship between extracellular glutamate hyperexcitation and neurodegeneration, *in vivo*. *Neurochemistry International*. 1999; 34: 23-31.

Tian C, Yuan Y, Zhu S. Positively selected sites of scorpion depressant toxins: possible roles in toxin functional divergence. *Toxicon*. 2008; 51: 555-562.

Torres JB, Marques MG, Martini RK, Borges CV. An accident involving *Tityus serrulatus* and its epidemiological implications in Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 2002; 36: 631-633.

Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*. 2001; 42 (Suppl 3): 8-12.

Trequattrini C, Zamudio FZ, Petris A, Prestipino G, Possani LD, Franciolini F. *Tityus bahiensis* toxin IV-5b selectively affects Na channel inactivation in chick dorsal root ganglion neurons. *Comparative Biochemical and Physiology*. 1995; 112: 21-28.

Troncon LEA, Santos AA, Garbacio VL, Secaf M, Verceze AV, Cunha-Melo JR. Inhibition of gastric emptying and intestinal transit in anesthetized rats by *Tityus serrulatus* scorpion toxin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000; 33 (9): 1053-1058.

Trudeau LE, Parpura V, Haydon PG. Activation of neurotransmitter release in hippocampal nerve terminals during recovery from intracellular acidification. *Journal of Neurophysiology*. 1999; 81: 2627-2635.

Tsacopoulos M. Metabotropic signalling between neurons and glial cells. *Journal of Physiology (Paris)*. 2002; 96: 283-288.

Turski WA, Cavaleiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*. 1983; 9: 315-336.

Umeda Y, Amano M, Suemaruk, Yamaguchi T, Kitamura Y, Gomita Y, Kawasaki H, Araki H. The influence of hyperactivity of the hypothalamic pituitary-adrenal axis and hyperglycemia on the 5HT<sub>2A</sub> receptor-mediated wet dog shakes responses in rats. *Acta Medica Okayama*. 2007; 61: 311-317.

Urbanska EM, Kleinrok Z. Immune response and epilepsy. *Polish Journal of Pharmacology*. 1998; 50: 86-85.

Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceeding of National Academy of Sciences of USA*. 1992; 89(24): 12185-12189.

Valencia I, Mishra OP, Zubrow A, Fritz K, Katsetos CD, Delivoria-Papadopoulos M, Legido A. The role played by calcium in neuronal injury following neonatal hypoxia or convulsions. *Revista de Neurologia*. 2006; 42 (Suppl 3): S11-15.

Van de Vrede Y, Fossier P, Baux G, Joels M, Chameau P. Control of IsAHP in mouse hippocampus CA1 pyramidal neurons by RyR3-mediated calcium-induced calcium release. *European Journal of Physiology*. 2007; 455: 297-308.

Vazquez A, Tapia JV, Eliason WK, Martin BM, Lebreton F, Delepierre M, Possani LD, Becerril B. Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na<sup>+</sup> channel specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*. 1995; 33: 1161-1170.

Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, Behavior and Immunity*. 2008; 22: 797-803.

Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*. 2005; 46: 1724-1743.

Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*. 2009; 158 (1): 309-323.

Vornov JJ. Mechanisms of neurotransmitter receptor actions. In: Fisher RS, Coyle JT (Eds). *Neurotransmitters and epilepsy*. New York: Wiley-Liss; 1991. p.17-31.

Voronov E, Apte RN, Sofer S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J Venom Anim Toxins*. 1999; 5(1): 25-53.

Wasterlain CG, Fujikawa DG, Penix L, Sankar R. Pathophysiological mechanisms of brain damage. *Epilepsia*. 1993; 34(Suppl. 1): S37-S53.

Waterhouse BD. Electrophysiological assessment of monoamine synaptic function in neuronal circuits of seizure susceptible brains. *Life Science*. 1986; 39(9): 807-818.

Wen FH, Santalucia M. Vigilância dos acidentes por animais peçonhentos. *Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilancia em Saúde*. 2005.

Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Science*. 1990; 48: 469-498.

Witter MP, Amaral DG. Hippocampal formation. In: Paxinos G (Ed). *The rat nervous system*. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 635-704.

Wu ML, Chen JH, Chen WH, Chen YJ, Chu KC. Novel role of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase in NMDA-induced intracellular acidification. *American Journal of Physiology*. 1999; 277: C717-C727.

Yankovsky AE, Andermann F, Dubeau F. Post-ictal forceful yawning in a patient with nondormant hemisphere epilepsy. *Epileptic Disorders*. 2006; 8: 65-69.

Zaleski M, Morato GS, da Silva, VA, Lemos T. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do álcool. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2004; 26(supl I): 40-42.

Zeghal K, Sahnoun Z, Richer C, Giudicelli JF. Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2000; 14(4): 351-361.

Zhu X, Zamudio FZ, Olbinski BA, Possani LD, Valdívia HH. Activation of skeletal ryanodine receptors by two novel scorpion toxins from *Buthotus judaicus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (25): 26588-26596.

Zimmerman G, Njunting M, Ivens S, Tolner EA, Behrans CJ, Gross M, Soreq H, Heinemann U, Friedman A. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience*. 2008; 27(2): 965-975.

Ziz AP, Nomikos GG, Brown EE, Damsma G, Fibiger HC. Neurochemical effects of electrically and chemically induced seizures: an in vivo microdialysis study in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 1992; 7: 189-195.