

RENAN VOLNER RODRIGUEZ

Efeitos da toxina TsTX-I isolada do veneno do
escorpião *Tityus serrulatus* sobre o
hipocampo de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Toxinologia do Instituto
Butantan, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

RENAN VOLNER RODRIGUEZ

Efeitos da toxina TsTX-I isolada do veneno do
escorpião *Tityus serrulatus* sobre o
hipocampo de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Toxinologia do Instituto
Butantan, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Ana Leonor Abrahão
Nencioni

São Paulo
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodriguez, Renan Volner
Efeitos da toxina TsTX-I isolada do veneno do escorpião
Tityus serrulatus sobre o hipocampo de ratos / Renan Volner
Rodriguez; Ana Leonor Abrahão Nencioni. – São Paulo, 2012.
76.fl.s. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
em Toxinologia, Instituto Butantan, 2012.

1. TsTX-I. 2. Hipocampo. 3. Convulsão
4. Escorpião. 5. Citocinas. I. Orientador (Nencioni,
Ana Leonor, orient.). II. Programa de Pós-Graduação em
Toxinologia. Instituto Butantan. III.Título.

CDD 615.9

Eu Renan Volner Rodriguez, através dessa declaração autorizo a divulgação da tese por mídia impressa, eletrônica ou outra qualquer, após a defesa.

De acordo,

Orientador: Ana Leonor Abrahão Nencioni

Renan Volner Rodriguez

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO(A):.....

DATA DO EXAME:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado(a)	Reprovado(a)
_____	_____	()	()
(Presidente)			
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()

DECISÃO FINAL: APROVADO(A) () REPROVADO(A) ()

Comentários da Banca (opcional):



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

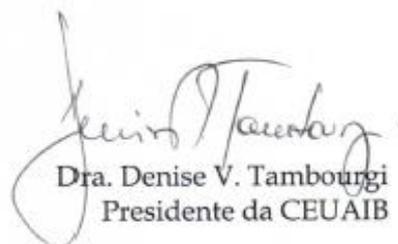
Certificamos que o Projeto intitulado “Efeitos da toxina TsTx-I isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o hipocampo de ratos” protocolo nº 554/08, sob a responsabilidade de Ana Leonor Abrahão Nencioni e Renan Volner Rodriguez, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/12/2008.

We certify that the research entitled “Effects of TsTx-I toxin isolated from *Tityus serrulatus* venom in hippocampus of rats”, protocol nº 554/08, under the responsibility of Ana Leonor Abrahão Nencioni and Renan Volner Rodriguez, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 12/10/2008.

A CEUAIB autorizou as mudanças solicitadas pela pesquisadora, ou seja, alteração no prazo de vigência.

Vigência do Projeto: 02/2009 -12/2012 Laboratório de Farmacologia	Nº de animais/espécie 36 ratos Wistar Machos
---	---

São Paulo, 19 de abril de 2011.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

A existência dessa tese só foi possível graças a um “exército” de pessoas (e de ratos) que contribuíram direta ou indiretamente para sua confecção, descrever todos eles seria uma missão impossível, de forma que aqui cito apenas alguns deles:

- As Dras. Ana Leonor Nencioni e Valquiria Coronado Dorce, por terem dado a oportunidade de realizar o mestrado, pela paciência budista ao longo dos anos e por terem ajudado nos experimentos além da função de orientadoras;
- Ao Dr. Ivo Lebrun e sua equipe, pelas inúmeras tentativas de purificação da toxina e pelas dosagens dos aminoácidos neurotransmissores;
- Ao Dr. Isaltino Conceição e Bianca Casasco, por terem concedido a toxina no qual foi realizado parte desse trabalho;
- A Dra. Fernanda Portaro e sua equipe, pela purificação da toxina no qual foi realizado parte desse trabalho;
- Ao Dr. Jorge Camilo, pela tentativa na dosagem das aminas biogênicas;
- A CAPES e ao programa de pós-graduação pelo auxílio financeiro;
- Aos assistentes de pesquisa Ana Claudia Sobral e Eduardo Frare, por terem auxiliado, respectivamente, na purificação da toxina e na padronização das dosagens de citocinas;
- Aos funcionários do laboratório, pela manutenção e ajuda em tudo que for preciso;
- Aos animais, que de forma involuntária “ajudaram” nos resultados dessa tese;

- Aos amigos e colegas do laboratório, pela ajuda em diversos momentos do mestrado, pelo apoio “moral” e pela lealdade adamantina nos momentos de adversidade. Um agradecimento especial a Lucas Alves, Andria De Paula, Ana Letícia Dorce e Adriana Mezini, se justiça fosse feita, seus nomes também deveriam ser citados como autores desse trabalho;

- E por fim, aos meus familiares, que ofereceram todo o apoio e suporte necessários durante o mestrado (e também durante toda minha vida antes disso).

A todos esses (e ainda a muitos mais), os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito Obrigado!!!

“As convicções são inimigas da verdade bem mais perigosas que as mentiras”

Friedrich Nietzsche

*“A esperança não murcha, ela não cansa, também como ela não sucumbe a crença.
Vão-se sonhos nas asas da descrença, voltam sonhos nas asas da esperança.”*

Augusto dos Anjos

RESUMO

Efeitos da toxina TsTX-I isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o hipocampo de ratos. 2012. 76 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan. São Paulo, 2012.

Os venenos escorpiônicos são compostos, entre outras substâncias, por neurotoxinas, polipeptídios básicos de baixo peso molecular que atuam sobre canais iônicos alterando a liberação de mediadores químicos. O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* tem sido extensamente estudado e muitas de suas toxinas já foram bem caracterizadas e sequenciadas. Entre as mais importantes se encontra a TsTX-I, uma toxina que se liga ao sítio 4 do canal de sódio, que já foi bem estudada quanto a seus efeitos periféricos, embora seus efeitos centrais sejam pouco conhecidos. Alguns estudos têm mostrado que as toxinas escorpiônicas são capazes de produzir alterações eletrográficas e comportamentais em ratos por modificar as concentrações cerebrais de neurotransmissores. Além disso, há alterações nos níveis de certos fatores inflamatórios, capazes de promover convulsões em ratos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo verificar possíveis alterações em mediadores químicos, particularmente os aminoácido neurotransmissores e as citocinas, além de avaliar a integridade das células neuronais, após injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I. Para tanto, ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas e/ou eletrodos no hipocampo. Os animais foram submetidos ao registro da atividade elétrica cerebral e observação comportamental após injeção da toxina. A dose de toxina a ser utilizada foi determinada através de uma curva dose-resposta. A coleta dos neurotransmissores foi realizada por microdiálise e suas dosagens foram realizadas em HPLC. Os níveis de citocinas após injeção de toxina, salina ou ácido caínico foram determinados por ensaios imunoenzimáticos. Para a avaliação histológica, os animais foram perfundidos uma semana após a microdiálise, seus cérebros foram removidos, fatiados e analisados em microscópio óptico para quantificação das células nas áreas CA1, CA3 e CA4 do hipocampo. Os resultados mostraram que a TsTX-I não foi capaz de alterar os níveis de aminoácidos neurotransmissores e o número de células integras do hipocampo, embora tenha desencadeado sintomas como “WDS”, prostração, dispneia e alterações eletroencefalográficas. Quanto às citocinas, foi observada uma diminuição nos níveis de IL-1 β e IL-10 no cérebro total, embora não haja alteração significativa no tecido hipocampal para nenhuma das citocinas analisadas. Com esses resultados podemos concluir que os aminoácidos neurotransmissores não participam dos efeitos desencadeados pela toxina, já que esses não se mostraram alterados no hipocampo. A ausência de lesão neuronal provavelmente se deve a não elevação dos níveis de glutamato, um neurotransmissor que pode ocasionar a morte neuronal por um mecanismo de excitotoxicidade. Também concluímos que as citocinas analisadas tem uma participação nos efeitos desencadeados pela toxina apesar de seu local de ação principal não ser o hipocampo e sim alguma outra região cerebral uma vez que há

alteração no tecido cerebral processado sem o hipocampo. É possível que outros neurotransmissores ou citocinas sejam responsáveis pelos efeitos desta toxina e trabalhos futuros poderão confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: TsTX-I, hipocampo, convulsão, escorpião, citocinas

ABSTRACT

Effects of TsTX-I toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom on the hippocampus of rats. 2012. 75 p. Master Thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

Scorpion venoms are composed mainly by neurotoxins that are basic peptides with low molecular weight acting on ionic channels, mainly sodium channel, changing the release of chemical mediators. Crude venom of *Tityus serrulatus* scorpion, as well its toxins, has already been extensively studied. Many of the venom toxins were well characterized and sequenced. TsTX-I is one of the most important toxin present in the venom. This toxin acting by binding on site 4 of sodium channel, its peripheral effects have been well studied but its central effects are not well known. Some studies have been shown that scorpion toxins caused electrographic and behavioral effects in rats due to the release of neurotransmitters from central nervous system areas. Further, the toxins may change the levels of inflammatory mediators. These mediators also may cause convulsions in rats. Thus, the aim of the present work was verify if TsTX-I injection may change the level of chemical mediators mainly in amino acids neurotransmitters and cytokines and the integrity of neuronal cells. Cannulas and electrodes were implanted in the hippocampus of Wistar male rats by stereotaxic surgery. The electrographic record and behavioral analyze were made after toxin injection. A dose-response curve was constructed and then the dose used in the study was determined. The levels of neurotransmitters were determined in rats by microdialysis and HPLC. Cytokines were determined after toxin, kainic acid or saline by immunoenzymatic assays. For histological evaluation seven days after toxin injection animals were perfused the brain was removed, fixed, sliced and then stained for optical microscopy analyze of hippocampal CA1, CA3 and CA4 areas. The TsTX-I do not changed amino acids neurotransmitters levels neither the number of intact neurons in the hippocampus. However it caused wete dog shakes, prostration, dyspnea and electrographic record changes. The toxin decreased IL-1 β and IL-10 levels in the brain but do not caused significant alterations of the cytokines in the hippocampus. In conclusion, the hippocampal amino acids neurotransmitters did not participated of the effects of the toxin and there is no damage of hippocampal cells because glutamate, that causes toxicity, was not altered. It was also concluded that cytokines participated of the toxin effect. Although its site of action is in other brain regions, not in the hippocampus. It is possible that other neurotransmitters or cytokines in the brain are the responsible by the effects of the toxin.

Key words: TsTx-1, hippocampus, seizures, scorpions, cytokines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfologia do escorpião.....	15
Figura 2. Representação linear de um arranjo do canal de sódio.....	20
Figura 3. Corte coronal da região hipocampal (CA1, CA3 e CA4).....	26
Figura 4. Cromatografia do veneno do escorpião de <i>T. serrulatus</i> em coluna de gel filtração.....	31
Figura 5. Cromatografia da fração II do veneno de <i>T. serrulatus</i> em HPLC.....	32
Figura 6. Recromatografia em HPLC do pico P1 da fração II do veneno do escorpião <i>T. serrulatus</i>	33
Figura 7. Probe para microdiálise.....	35
Figura 8. Parâmetros observados no registro eletrográfico do córtex (C) e hipocampo (H) de ratos.....	43
Figura 9. Cortes histológicos de cérebros de ratos (10 µm).....	44
Figura 10. Variação percentual dos níveis hipocâmpais de glutamato (A), GABA (B) e glicina (C).....	46
Figura 11. Dosagem do nível de IL-1β em hipocampo (A) e cérebro (B) de ratos adultos.....	48
Figura 12. Dosagem do nível de IL-10 em hipocampo (A) e cérebro (B) de ratos adultos.....	48
Figura 13. Dosagem do nível de IL-6 em hipocampo (A) e cérebro (B) de ratos adultos.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2. Drogas e reagentes	30
3.3. Metodologia	31
3.3.1. Obtenção da toxina purificada do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> ...	31
3.3.2. Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas e eletrodos.....	34
3.3.3. Injeção intracerebral.....	34
3.3.4. Microdiálise.....	35
3.3.5. Registro da atividade elétrica cerebral (AEC) e observação comportamental.....	36
3.3.6. Perfusão dos animais e retirada dos cérebros.....	36
3.3.7. Preparação das lâminas histológicas e análise tecidual.....	36
3.3.8. Dosagem dos níveis cerebrais de aminoácidos neurotransmissores por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).....	37
3.3.9. Preparação das amostras para dosagem de citocinas.....	37
3.3.10. Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA).....	38
3.4. Delineamento experimental	39
Experimento 1: Efeitos eletrográficos e comportamentais da injeção de diferentes doses da toxina TsTX-I em ratos.....	39
Experimento 2: Efeitos da injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I sobre os níveis extracelulares de aminoácidos neurotransmissores em ratos.....	39
Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I sobre os níveis extracelulares de citocinas em ratos	40
4. RESULTADOS	41
Experimento 1.....	41

Experimento 2.....	45
Experimento 3.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões são artrópodes, pertencentes à classe dos aracnídeos, ordem Scorpiones. São divididos em 19 famílias com centenas de gêneros descritos, totalizando mais de 1600 espécies conhecidas (PRENDINI; WHEELER, 2005).

Apresentam uma carapaça (prossoma) contendo um par de quelíceras, um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de pernas. O abdômen (opistossoma) é dividido entre o tronco (mesossoma) e a cauda (metassoma). No primeiro se encontram o opérculo genital, os apêndices sensoriais (pentas) e os espiráculos (aberturas externas do pulmão), no segundo localiza-se, ao final de sua extremidade, o telson, que termina em um ferrão usado para inocular o veneno, servindo-lhe tanto para a caça como para defesa de possíveis predadores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

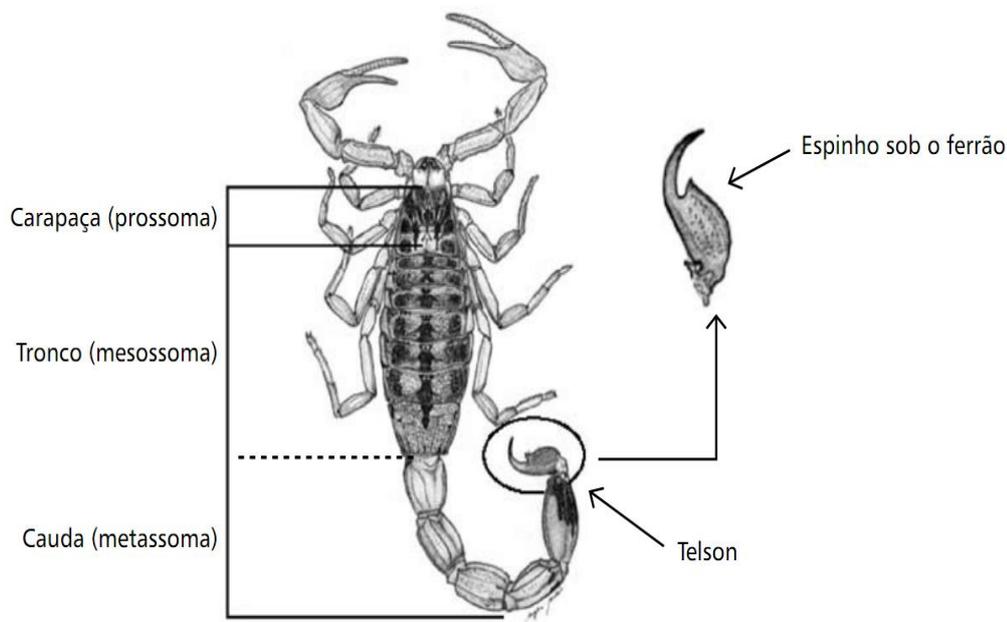


Figura 1. Morfologia do escorpião. Fonte: Manual de Controle de Escorpiões, 2009.

Possuem uma ampla distribuição ao redor do globo, podendo habitar regiões de clima tropical, subtropical e temperado (CENDRERO, 1971), cobrindo uma ampla variedade de habitats como florestas, pastagens, savanas e cavernas (LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 2003; COLOGNA et al., 2009). Durante o dia procuram se esconder debaixo de rochas, pedaços de madeira, dentro de tronco de árvores, no solo úmido ou sob as areias do deserto (CANDIDO, 1999). Durante a noite, período em que se encontram mais ativos, saem à procura de alimento como grilos e baratas (INCEOGLU et al., 2003).

São considerados animais de origem muito antiga, provavelmente um dos primeiros aracnídeos a colonizar o ambiente terrestre, durante o período Siluriano, há aproximadamente 400 milhões de anos (LUCAS et al., 1992). Embora poucas alterações tenham ocorrido em sua morfologia básica ao longo do tempo, suas dimensões eram consideravelmente maiores. Em 2008 foi encontrada uma quelícera de “escorpião-marinho”, um ancestral dos escorpiões atuais, com 46 cm, sugerindo que este animal possuía aproximadamente 2,5 m (BRADDY et al., 2008).

Sua relação com o homem também é antiga. Em diversos povos da antiguidade os escorpiões fizeram parte de suas crenças e mitologias, representados em cultos ou santuários, muitas vezes simbolizando a morte, sofrimento ou traição. Na antiga religião mitraica, por exemplo, Ahriman, um gênio maligno, envia um escorpião para atacar um touro sagrado nos testículos, com a finalidade de destruir a fonte da vida. Em outras regiões, como no Egito antigo, os escorpiões já eram descritos nos papiros de Ebers e no livro da morte, com numerosos encantamentos para prevenção de suas picadas. Também aparecem nas lendas gregas quando, em uma das versões das histórias de Orion, este é morto por um escorpião gigante enviado por Artemis, após Orion desafiá-la quanto às suas habilidades de caça. Esses mitos exemplificam o medo e a atenção que esses animais despertaram ao longo da história (BÜRCHERL, 1971).

Muitas dessas lendas e crendices provavelmente têm sua origem no fato desses animais serem peçonhentos, ou seja, possuem um aparelho inoculador de veneno associado à glândula produtora, contendo substâncias tóxicas capazes de atuar sobre as pessoas (CANDIDO, 1999). No entanto, vale ressaltar que apenas uma minoria das espécies representa um risco significativo para humanos, uma vez

que das mais de 1600 espécies conhecidas espalhadas pelo globo, apenas 25 são consideradas de relevância médica (PRENDINI; WHEELER, 2005).

No Brasil, o escorpiônismo é considerado um problema de saúde pública, uma vez que os acidentes provocados por escorpiões representam o maior número de casos notificados, superando a partir do ano de 2004, o número de acidentes ofídicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Atualmente os acidentes causados por escorpiões atingem cerca de 51 mil casos/ano conforme dados do Sistema de Informações de Acidentes por Animais Peçonhentos, cujos registros relatam que houve um aumento de 4 vezes no número de casos e 5 vezes o número de óbitos entre o período de 2000 e 2010 (SINAN – Animais Peçonhentos/ SVS/ MS, 2011; dados sujeitos a revisão).

Todas as espécies consideradas de relevância médica no Brasil fazem parte do gênero *Tityus*, compreendendo as espécies *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus obscurus* e *Tityus stigmurus* como as mais significativas (WEN; SANTALUCIA, 2005). Entre as 4 espécies citadas, o *Tityus serrulatus* é considerado o mais perigoso, devido tanto à maior toxicidade do seu veneno como à maior frequência de acidentes causados por ele (DORCE; SANDOVAL, 1992; WEN; SANTALUCIA, 2005; COLOGNA et al., 2009). A alta adaptação em ambientes urbanos (onde esses animais encontram abrigo e alimento com facilidade) e sua reprodução partenogenética (a fêmea é capaz de se reproduzir sem a presença do macho) são fatores que contribuem para sua dispersão e explica o aumento no número de acidentes (WEN; SANTALUCIA, 2005).

Os acidentes podem ser classificados, de acordo com sua gravidade, em leves, moderados ou severos, dependendo da sintomatologia apresentada pelos pacientes. Nos casos de envenenamento leve, os pacientes podem apresentar parestesia ou dor local, que pode variar de leve a intensa. Nos casos moderados, além de uma forte dor local, os pacientes também apresentam sintomas sistêmicos como sudorese, náuseas, vômitos, arritmias, dispneia e hipertensão. Nos casos severos, os pacientes apresentam, além de uma exacerbação dos sintomas anteriores, manifestações como falência cardíaca, edema pulmonar, choque, convulsões e coma (CUPO et al., 2007; COLOGNA et al., 2009; DORCE; SANDOVAL, 1992; GUIDINE et al., 2008; FREIRE-MAIA, 1978).

Quando há necessidade de tratamento, a escolha deve ser feita baseada no quadro sintomatológico manifestado pelo paciente. Na maioria dos casos, onde ocorre apenas dor local, o tratamento indicado é a administração de anestésico local (lidocaína) e dipirona (na presença de febre); derivados de morfina não são indicados devido aos efeitos depressores no sistema nervoso central. A utilização de soroterapia só é indicada em casos de envenenamento moderado (de 2 a 3 ampolas) ou severo (de 4 a 6 ampolas) e devem ser administradas nas primeiras horas após a picada, já que o veneno se difunde rapidamente (CUPO et. al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A gravidade do envenenamento pode variar de acordo com fatores como idade da vítima, sua condição física e emocional, quantidade de veneno inoculada, a região do corpo atingida e a espécie do animal. Nos casos onde o acidente evolui para óbito, as vítimas são geralmente crianças, numa faixa etária que varia entre 0 e 14 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A peçonha dos escorpiões é constituída principalmente por um conjunto de neurotoxinas peptídicas, que formam o principal componente tóxico do veneno. Essas toxinas apresentam propriedades farmacológicas heterogêneas, com algumas sendo mais ativas em mamíferos, outras mais ativas em artrópodes e outras que podem atuar sobre ambos (COURAUD et al., 1984; PINTAR et al., 1999; GUREVITZ et al., 2007). Além das neurotoxinas, o veneno escorpiônico também apresenta uma ampla diversidade de moléculas como mucopolissacarídeos, hialuronidases, fosfolipases, serotonina, inibidores de proteases e liberadores de histaminas, que exercem uma ação local como coadjuvantes no envenenamento, ajudando a aumentar a absorção e disseminação do veneno (COURAUD; JOVER, 1984; POSSANI et al., 1999; PESSINI et al., 2001).

Cada escorpião possui várias neurotoxinas diferenciadas no conjunto de seu veneno, que compartilham entre si a característica de atuarem sobre canais iônicos de células excitáveis (GARCIA et al., 1984; DE LA VEGA; POSSANI, 2005). Estima-se existir, no total de espécies conhecidas pelo mundo, cerca de 100.000 toxinas. Desse número, apenas 1% já foram isoladas e caracterizadas quanto a sua constituição química (GAZARIAN et al. 2005).

Entre as toxinas escorpiônicas já descritas, foram encontradas toxinas capazes de atuar de maneira específica sobre os canais iônicos seletivos para sódio

(CATTERALL, 1980; ROCHAT et al., 1979), potássio (CARBONE et al. 1982; MILLER et al. 1985), cloreto (DE BIN et al. 1993) e cálcio (VALDIVIA et al., 1992; VALDIVIA; POSSANI, 1998). Em virtude da especificidade de ligação em seus respectivos sítios, essas toxinas têm sido bastante utilizadas no estudo e caracterização desses canais.

Canais iônicos sensíveis à voltagem são componentes cruciais para a atividade das células. Trata-se de proteínas integrantes de membrana que permitem a passagem seletiva de íons (Na^+ , K^+ , Ca^+ , Cl^-), e são responsáveis pela geração e propagação de sinais elétricos em neurônios e outras células excitáveis. A ligação das toxinas em seus sítios receptores desencadeia uma série de eventos que resulta em uma liberação alterada de mediadores químicos, promovendo um desequilíbrio na homeostase corporal. As manifestações sistêmicas observadas nos envenenamentos de maior gravidade são o resultado desse desequilíbrio (PETRICEVICH et al., 2007).

Os canais de sódio são considerados os mais importantes na fisiopatologia do escorpiônismo, já que as principais neurotoxinas presentes em seus venenos possuem afinidade por eles (DE LA VEGA; POSSANI, 2005). Pelo menos 6 sítios receptores que servem de ligantes para toxinas extraídas de diversas fontes já foram identificados. Como exemplos podem ser citadas a tetrodotoxina (presentes em algumas espécies de peixes) e a saxitoxina (obtida de dinoflagelados) que se ligam ao sítio 1, a veratridina (alcalóide extraído das plantas *Liliaceae*) e a batracotoxina (presentes na pele de algumas espécies de anfíbios) que se ligam ao sítio 2, toxinas escorpiônicas do tipo α e de anêmonas do mar que se ligam ao sítio 3, toxinas escorpiônicas do tipo β que se ligam ao sítio 4, a brevetoxina e ciguatoxina (ambas extraídas de alguns dinoflagelados) que se ligam ao sítio 5 e as δ -conotoxinas (extraída de moluscos marinhos) que se ligam ao sítio 6 (CESTÈLE; CATTERALL, 2000; CATTERALL et al., 2007).

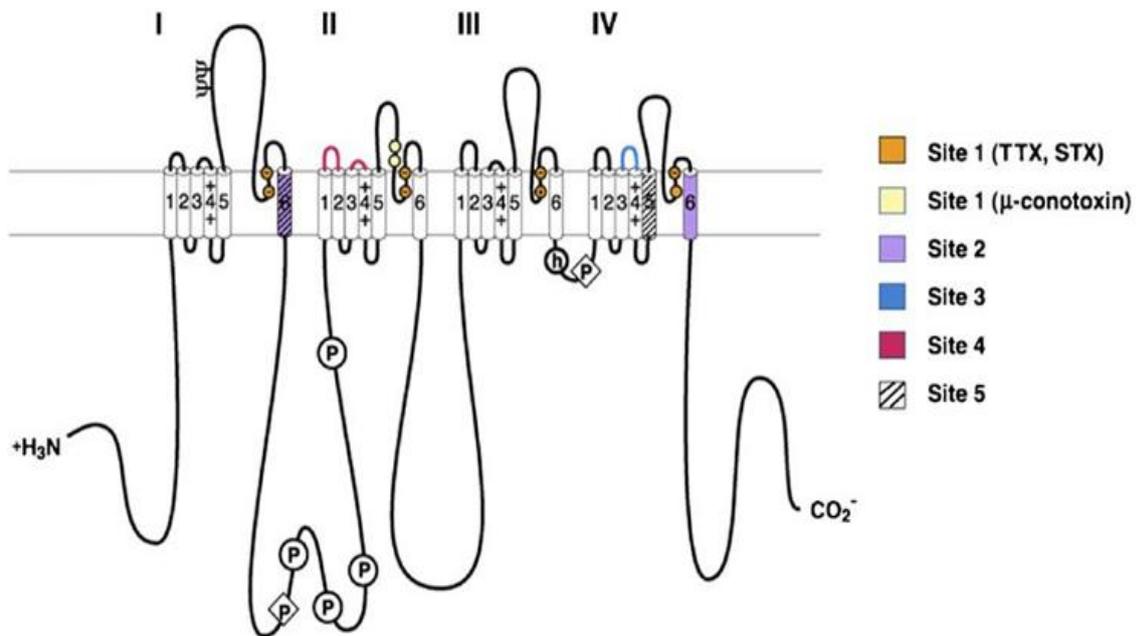


Figura 2. Representação linear de um arranjo do canal de sódio dependente de voltagem. Os números em algarismos romanos na parte superior da figura mostram a divisão dos domínios formadores do poro. Na legenda à direita, os sítios de ligação onde atuam toxinas de diversas fontes (retirado de CATTERALL et al., 2007).

As toxinas escorpiônicas que possuem afinidade por canais de sódio podem ser classificadas em α ou β dependendo do sítio de ligação no qual atuam. As toxinas do tipo α se ligam ao sítio 3 do canal e inibem ou retardam o tempo de sua inativação, ou seja, são capazes de prolongar o período de abertura do canal. As toxinas do tipo β , por sua vez, se ligam ao sítio 4 e promovem uma alteração na conformação da estrutura do canal capaz de diminuir o limiar de ativação para valores mais negativos, o que facilita sua abertura (CESTÈLE; CATTERALL, 2000; LEE; ADAMS, 2000; DE LA VEGA; POSSANI, 2007; CAMPOS et al., 2008; TIAN et al., 2008). Em ambas as circunstâncias, o resultado final será um maior influxo de sódio no interior da célula, um aumento de sua despolarização e, como consequência, uma liberação maciça de neurotransmissores.

Além de sua ação sobre os neurotransmissores, o veneno escorpiônico também pode estimular a liberação de citocinas e prostaglandinas, fato observado principalmente em casos de envenenamento severo (CHAUDRY et al., 1989; MEKI; MONHEY-EL-DEAN, 1998).

As citocinas são liberadas por macrófagos em resposta inflamatória ao envenenamento (PETRICEVICH, 2004). Autores como Sofer et al. (1996); Barbouche et al. (1996), Barraviera (1997), Meki; Mohey-el-Dean (1998) e Magalhães et al. (1999) demonstraram um aumento de interleucinas (IL-6, IL-1 α e IL-1 β), óxido nítrico (NO), interferon gama (IFN- γ) e fator estimulante de colônias monocíticas granulocíticas (GM-CSF) após a picada de escorpiões do gênero *Leiurus*, *Buthotus* e *Tityus* no sangue de pacientes. Estas citocinas podem contribuir para o choque e disfunção cardíaca e pulmonar (PETRICEVICH, 2004, PETRICEVICH et al., 2007). A resposta infamatória sistêmica com subsequente liberação de citocinas (CHAUDRY et al., 1989) pode mobilizar leucócitos e causar a liberação de fatores de ativação de plaquetas (PAF), leucotrienos e prostaglandinas (MAGALHÃES et al., 1999; DE MATOS et al., 2001; SOFER et al., 1996; MEKI; MONHEY EL-DEAN, 1998; DE MATOS et al., 1999; PETRICEVICH; PENA, 2002; D'SUZE et al., 2003; FUKUHARA et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

A falência respiratória que se manifesta após a picada escorpiônica é uma das principais causas de morte entre os pacientes como resultado de edema pulmonar agudo (ANDRADE et al., 2007). O edema pulmonar causado pela administração do veneno ou de toxinas em ratos pode ser devido à ativação da cascata inflamatória e liberação de mediadores lipídicos inflamatórios, incluindo o fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrienos e prostaglandinas (DE MATOS et al., 1997). Os mastócitos podem ser importantes tipos celulares intermediários entre a liberação/ação de neuropeptídios e ativação da cascata inflamatória (DE MATOS et al., 2001). Além disso, o sistema complemento está envolvido no processo inflamatório induzido pelo veneno ou pela toxina TsTX-I e conseqüentemente no edema pulmonar, na hemólise, leucocitose, entre outras manifestações clínicas do envenenamento severo (BERTAZZI et al., 2003).

Sintomas como convulsão e mioclônias são algumas vezes reportados em casos de envenenamentos de maior gravidade. Em trabalho publicado por Carvalho et al. (1998) a injeção da toxina TsTX, isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, diretamente no hipocampo de ratos (região escolhida por ser sensível a convulsões) causou alterações no registro da atividade elétrica cerebral dos animais, com presença de traçado epileptiforme caracterizado por múltiplas espículas e descargas elétricas de curta e longa duração. Também foram observadas alterações

comportamentais como “wet dog shake” (um comportamento semelhante ao chacoalhar de um cachorro molhado, que indica uma manifestação convulsiva em ratos) logo após a inoculação, com uma frequência mais intensa nas duas primeiras horas, diminuindo após esse período. Em experimentos semelhantes Teixeira e seu grupo (2010) observaram, após administração da toxina TsTX-I, do mesmo veneno também por via intra-hipocampal, sintomas semelhantes aos desencadeados pela TsTX, porém com manifestações mais duradouras, sem perda de sua frequência e intensidade.

As convulsões podem ser definidas como um evento anormal onde descargas elétricas excessivas (FONSECA et al., 2005) estão sincronizadas e presentes de forma localizada ou distribuída por populações de neurônios no cérebro (LOTHMAN et al., 1991). Distúrbios dessa natureza geralmente são explicados por um desequilíbrio entre as atividades excitatórias e inibitórias no cérebro, no qual há uma prevalência da excitação sobre a inibição na atividade neuronal (GERFIN-MOSER et al., 1995). A origem desses distúrbios pode ser proveniente de uma variedade de insultos como toxinas, drogas, distúrbios metabólicos, traumas e patologias adjacentes (ENGEL, 1989).

O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios do cérebro (CUNNINGHAM et al., 1994) e tem uma participação importante em processos convulsivos. Praticamente todos os neurônios do sistema nervoso central podem ser estimulados por glutamato, que age em uma variedade de receptores de superfície celular (LEESON; IVERSEN, 1994) mediando direta ou indiretamente à transmissão sináptica (NEDERGAARD et al., 2002). Uma desordem na neurotransmissão excitatória mediada por glutamato é considerado o fator central na etiologia de algumas formas de epilepsias humana e experimental. Em 1954, Hayashi mostrou que injeções intracerebrais de glutamato produziam convulsões. Outras evidências, como a observação de lesão neuronal após administração de agonistas glutamatérgicos, e efeitos neuroprotetores após administração de antagonistas, também favorecem a idéia de que receptores dessa via são importantes na neurotoxicidade (MELDRUM, 2000).

O glutamato atua em receptores ionotrópicos como NMDA, AMPA e cainato, e em receptores metabotrópicos (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 receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G ligados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares (MICHAELIS, 1998; TAPIA *et al.*, 1999). A ação do glutamato sobre os seus receptores pode contribuir para o dano cerebral que ocorre após “status epilepticus”, isquemia cerebral ou injúria cerebral traumática (MELDRUM, 2002).

Além do glutamato, o GABA também está envolvido em processos epiléticos. Considerado o principal neurotransmissor inibitório (VORNOV, 1991), foi demonstrado que uma diminuição na sua função elicia convulsões, enquanto que drogas que aumentam sua ação, como benzodiazepínicos e barbitúricos, são usadas com sucesso no tratamento da epilepsia (FARIELLO *et al.*, 1991). Embora essas sejam evidências que sugerem o envolvimento do GABA na epilepsia, alguns estudos não encontraram alterações em populações de interneurônios GABAérgicos em hipocampo epilético de humanos (BABB *et al.*, 1989; KUMLIEN, 1994).

A glicina é outro importante aminoácido neurotransmissor encontrado no sistema nervoso central, desempenhando tanto uma função inibitória na medula espinhal (HERNANDES; TRONCONE, 2009), como de intermediário na função glutamatérgica como co-agonista dos receptores do tipo NMDA (LEESON; IVERSEN, 1994).

A maioria dos estudos sobre convulsão baseia-se nos mecanismos glutamatérgico e GABAérgico, mas estudos diversos têm sido feitos a fim de descobrir outros mecanismos envolvidos nos processos convulsivos.

Desta maneira, a acetilcolina é um neurotransmissor excitatório clássico (SEGAL, 1991) extensamente difundido no sistema nervoso central, autônomo e entérico (AMENTA; TAYEBATI, 2008). O aumento dos níveis deste neurotransmissor pode alterar dramaticamente a função neuronal (FRANTSEVA *et al.*, 2000). Estudos bioquímicos propõem que um dos papéis da acetilcolina no cérebro é o desenvolvimento do “status epilepticus” (FREITAS *et al.*, 2006), assim como altas doses de pilocarpina, um agonista de receptores muscarínicos colinérgicos, também induz tal efeito (TURSKI *et al.*, 1983). Agonistas muscarínicos, além de serem usados para produzir abrasamento químico (fenômeno onde repetidos estímulos subconvulsivantes são capazes de desencadear crises

progressivamente mais intensas ao longo das aplicações), produzem convulsão límbica acompanhada por lesão cerebral quando injetados por via intra-hipocampal em ratos (BEN-ARI et al., 1980). O aumento do número de receptores muscarínicos tem sido visto no córtex, hipocampo e estriado após o tratamento com antagonistas muscarínicos (BEN-BARAK; DUBAI, 1980). Da mesma forma, também pode ser vista a diminuição do número destes receptores centrais em ratos após episódios convulsivos (SEGAL, 1991).

As citocinas são classicamente relacionadas com a resposta inflamatória em processos patológicos no sistema nervoso central e periférico, mas vem crescendo as evidências que estas moléculas estão diretamente envolvidas, também, na função neural (SCHAFERS; SORKIN, 2008; VIVIANI et al., 2007). Nos últimos anos veem se acumulando evidências de que as citocinas pró-inflamatórias atuam em virtualmente todos os tipos de canais iônicos contribuindo com alterações na excitabilidade neuronal (SCHAFERS; SORKIN, 2008). Tem se dado muita atenção ao entendimento que as citocinas são substâncias mediadoras da função do sistema nervoso durante vários processos inflamatórios relacionados com variados tipos de doenças sendo que na maioria dessas patologias tem como característica comum o aparecimento de comorbidades comportamentais e aumento da excitabilidade do tecido nervoso que se manifestam como convulsões ou epilepsia adquirida (GALIC et al., 2012). De fato, praticamente todas as citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas em tecido neural e no líquido de pacientes com desordens convulsivas (revisado por ARÔNICA; CRINO, 2011); em amostras de tecido nervoso de pacientes com epilepsia do lobo temporal que apresentam esclerose hipocampal caracterizada por perda neuronal e gliose há aumento de citocinas (RAVIZZA et al., 2008). Ainda há um correlacionamento entre os níveis de citocinas com a ocorrência e a duração de convulsões (LEHTIMAKI et al., 2010; LEHTIMAKI et al., 2011; PELTOLA et al., 2000). Em condições experimentais em roedores foi mostrado um forte relação entre a elevação dos níveis de citocinas ou a expressão de RNA mensageiro para citocinas e o aumento da susceptibilidade convulsiva (BALOSSO et al., 2008; DE SIMONI et al., 2000, VOUTSINOS-PORCHEDE et al, 2004) e em modelos de “status epilepticus” em ratos induzidos por estimulação elétrica do hipocampo (DE SIMONI et al., 2000) ou por processo de abrasamento por

estimulação prolongada da amígdala (PLATA-SALAMAN et al., 1994) há aumento da expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

Anatomicamente, a formação hipocampal, assim como a amígdala, está intimamente relacionada com o hipotálamo e regiões corticais associativas, participando também das respostas emocionais. Está relacionada com a navegação espacial e a memória de curto prazo, além de ser uma região muito rica em sinapses glutamatérgicas e ser extremamente suscetível à lesão neuronal (CARPENTER, 1978).

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. O subiculum, presubiculum e parasubiculum são algumas vezes agrupados, recebendo a denominação de “complexo subicular” (AMARAL; LAVENEX, 2007).

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

O corno de Ammon 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), podendo ser dividido nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 (ROGACHESKI et al., 1998).

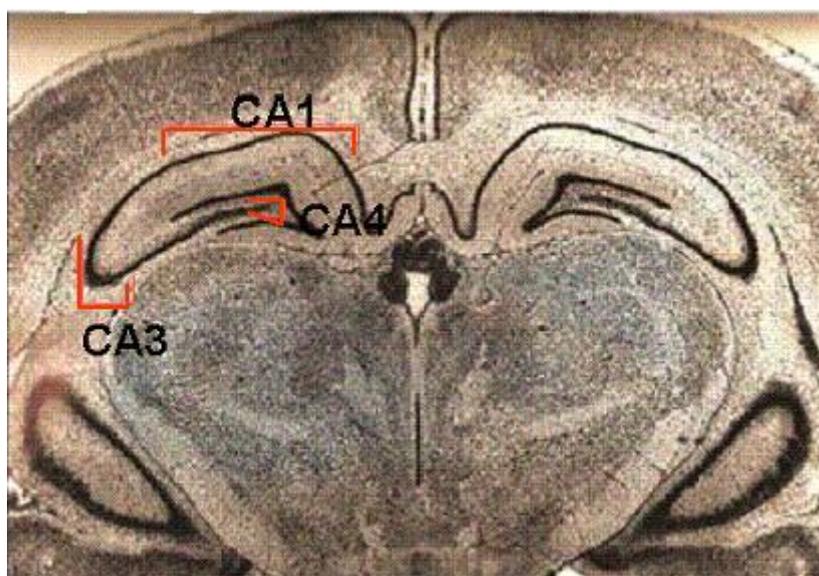


Figura 3. Corte coronal da região hipocampal mostrando as subregiões: CA1, CA3 e CA4.
Fonte: Atlas estereotático de Paxinos e Watson, 1998.

A região CA1, também chamada de setor Sommer (ROGACHESKI et al., 1998), possui células piramidais pequenas com uma média de comprimento de cerca de 13mm (AMARAL; WITTER, 1995) e a densidade celular é maior que em outras regiões hipocampais (LOTHMAN et al., 1991). Nas regiões CA2 e CA3, 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 e comprimento dendrítico total de 16mm (AMARAL; WITTER, 1995). Outra região do corno de Ammon é o CA4, ou setor Bratz (ROGACHESKI et al., 1998), termo utilizado para designar a porção final da camada de células piramidais hipocampais. Esta região insere-se dentro do “V” (ou “U”) formado pelas camadas molecular e de células granulares do GD (AMARAL; WITTER, 1995).

Em virtude de sua maior importância clínica, o veneno do *Tityus serrulatus* é o mais estudado entre os escorpiões do Brasil, com 14 toxinas descritas (COLOGNA, 2009). O primeiro fracionamento foi realizado por Gomez e Diniz em 1966, obtendo uma fração denominada “Tityustoxina” (“TsTX”). Essa fração foi considerada uma

toxina purificada até que Arantes et al. (1992), aperfeiçoando o método de Gomez e Diniz (1966), constataram que essa fração era, na realidade, uma semi-purificação do veneno, formada por mais de um componente em sua constituição. Esses autores passaram então a denominar a fração descrita por Gomez e Diniz de “tityustoxina”, com aspas, para diferenciá-la de outra toxina purificada descrita por seu grupo, a tityustoxina (TsTX) sem aspas. Atualmente, essa toxina também é conhecida como Ts3, Ts IV-5, Toxina-4 (COLOGNA, 2009).

Devido à falta de padronização na nomenclatura adotada para essas toxinas, houve uma grande desordem na designação de seus nomes e símbolos havendo nomes diferentes para expressar a mesma toxina e nomes iguais para designar toxinas diferentes. Por este motivo, Sampaio et al. (1991) propuseram uma nomenclatura baseada em artigo publicado por Toledo; Neves (1976), no qual utilizaram o termo TsTX, seguido de um número romano, para designar cada toxina que fosse isolada subsequentemente (TsTX-I, TsTX-II etc). Posteriormente, Becerril et al. (1996) adotaram uma nomenclatura similar, utilizando a abreviação do nome *Tityus serrulatus* (Ts) seguido por um numeral, para diferenciação de cada toxina (Ts1, Ts2, etc). A nomenclatura adotada nesse trabalho segue a proposta sugerida por Sampaio et al. (1991).

Dentre as principais toxinas extraídas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e uma das mais bem estudadas está a TsTX-I, também conhecida como Ts1, toxina-γ, toxina-VII. É a toxina mais abundante e também a mais tóxica (BECERRIL et al., 1997; CORRÊA et al., 1997; CONCEIÇÃO et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2005), capaz de se ligar ao sítio 4 do canal de sódio de mamíferos e insetos com grande estabilidade e alta afinidade (BARHANIN et al., 1982, 1983a, 1983b, 1985; MARCOTTE et al., 1997). Apresenta 61 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária, com peso molecular de 6890.1 daltons (COLOGNA, 2009). Sua estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia de Raio X e revelou um domínio bem conservado formado por uma alfa-hélice e folhas beta estabilizados por pontes dissulfeto (POLIKARPOV et al., 1999). Através de estudos eletrofisiológicos, demonstrou-se que essa toxina altera o funcionamento do canal de sódio de um modo bastante complexo e peculiar (BARHANIN et al., 1985; VIJVERBERG et al., 1984; YATANI et al., 1988; MARCOTTE et al., 1997) provocando um deslocamento da dependência de voltagem para a ativação dos

canais de sódio em direção a potenciais mais negativos em diversas preparações (VIJVERBERG et al., 1984; BARHANIN et al., 1985; MARCOTTE et al., 1997). Demonstrou-se que essa toxina é capaz de aumentar a liberação de acetilcolina em terminais de nervos motores (OLIVEIRA et al., 1989), que é capaz de aumentar o volume, a acidez e a liberação de pepsina em estômagos de ratos (CUNHA-MELO et al., 1991), que reduz a força de contração em átrios isolados (SAMPAIO et al., 1991), que aumenta a liberação de secreções pancreáticas (POSSANI et al., 1991; FLETCHER et al., 1996), que libera seletivamente ATP em ducto deferente de rato (CONCEIÇÃO et al., 2005) além de exercer um efeito modulatório sobre a resposta inflamatória alterando o balanço entre as citocinas pro e anti-inflamatórias (PETRICEVICH et al., 2007)

Para tentar entender o mecanismo por traz das alterações causadas pela TsTX-I, o presente trabalho procurou avaliar possíveis alterações nos níveis de aminoácidos neurotransmissores (glutamato, glicina e GABA) e de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10) no quadro sintomatológico apresentado pelos animais após injeção intra-hipocampal da toxina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Verificar os efeitos da toxina TsTX-I sobre o sistema nervoso central de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar os efeitos de diferentes doses da toxina TsTX-I (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 µg) sobre o comportamento, a atividade eletroencefalográfica e a integridade das células neuronais após a injeção intrahipocampal;
- Verificar os níveis de aminoácidos neurotransmissores (glutamato, glicina e GABA) após injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I;
- Verificar os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10) após injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 240 e 260g mantidos em biotério com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz ligada às 7 horas), temperatura mantida constante em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, água e comida fornecidas *ad libitum*.

3.2. Drogas e reagentes

Acetonitrila - J.T. Baker

Ácido caínico - RCF

Ácido glutâmico - RBI

Ácido trifluoracético (TFA) - Merck

Álcool absoluto - Synth

Bicarbonato de amônio - Merck

Citrato de sódio - Sigma

Fenilisotiocianato - Sigma

Formaldeído - Synth

GABA - Sigma

Glicina - Sigma

Hidrato de cloral - Merck

Propilenoglicol - Nuclear

Ringer - Aster

Solução de NaCl 0,9% - Dinâmica

Sulfato de magnésio - Synth

Tampão fosfato-salina (PBS)

Tiopental - Cristália

Toxina TsTX-I purificada do escorpião *Tityus serrulatus* - Instituto Butantan

Violeta de cresil - Merck

3.3. Metodologia

3.3.1. Obtenção da toxina purificada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

O fracionamento foi realizado empregando-se a técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC - Size Exclusion Chromatography) a partir do veneno total liofilizado do escorpião *Tityus serrulatus* empregando-se uma coluna de vidro da marca G&E Lifescience modelo XK de 70 centímetros de comprimento e 1,6 centímetros de diâmetro interno preenchida com Sephadex G50 medium. Como fase móvel foi utilizada uma solução de bicarbonato de amônio obtido na concentração de 50 mM em pH 8,0. A vazão da fase móvel foi de 7,2 ml/h e o tempo de corrida foi de 72 horas, sendo a sala mantida em 19 C° durante todo o período. A coluna cromatográfica foi equilibrada previamente à aplicação da amostra por 48 horas. As frações foram coletadas em um coletor de frações automático marca Pharmacia Biotech modelo RediFrac, por um período de 72 horas, sendo que cada tubo continha 2 mL da solução. Estas foram lidas em espectrofotômetro empregando-se comprimento de onda de 280 nm obtendo-se o cromatograma apresentado na figura 4. Após a obtenção do cromatograma, as frações foram separada em 5 pools e os mesmos foram liofilizados e estocados a -20 °C.

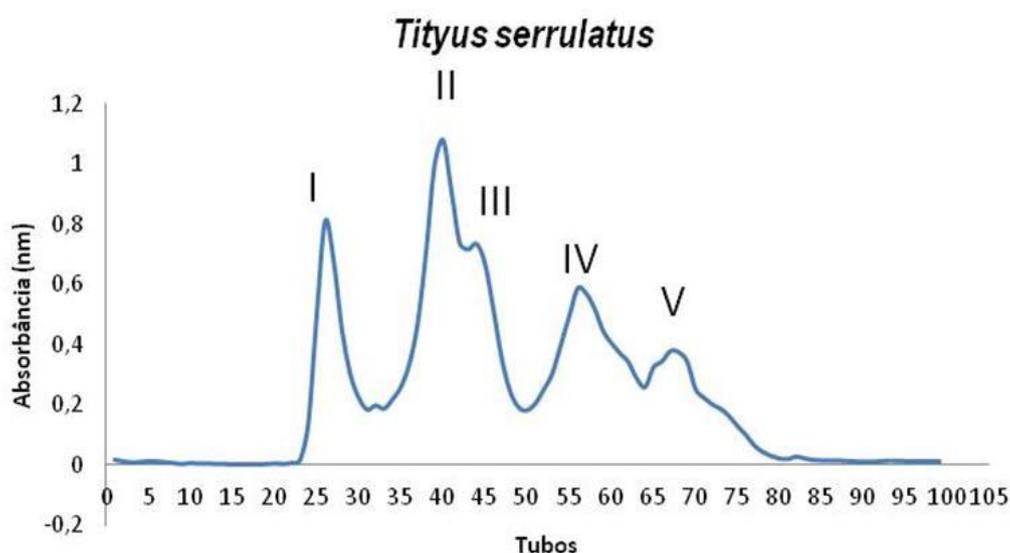


Figura 4. Cromatografia em coluna de gel filtração do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* mostrando 5 frações semi-purificadas (pools) denominadas de I a V.

O extrato aplicado na coluna foi obtido a partir de 50 mg de veneno liofilizado diluído em 500 μ L de solução tampão de bicarbonato de amônio, homogeneizado e centrifugado a 8452 G por 10 minutos em uma centrífuga da marca Eppendorf modelo 5415 D. Após a centrifugação o sobrenadante foi estocado e armazenado em geladeira e o processo foi repetido por mais três vezes obtendo-se um volume final de 2,0 mL.

Para extração da toxina TsTX-I purificada, a fração II (região aonde se localiza a toxina de interesse) foi liofilizada, ressuspensa em 1,0 mL de água ultrapura (milliQ) e aplicada em um sistema de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) equipado com uma coluna analítica C18 Nucleosil (15,0 x 4,0 mm) com detecção em espectrofotômetro em comprimento de onda de 214 nm. O gradiente inicial utilizado foi de 10-60% de solvente B em 40 min (solvente A: H₂O/TFA 0.01% e solvente B: Acn/solvente A 9:1) sob fluxo de 1.0 mL/min. Assim, a velocidade de troca de B/min foi de 1,2% B/min. Os diferentes picos de material (figura 5) foram coletados e liofilizados, sendo estocados, a seguir, a -20°C até sua utilização.

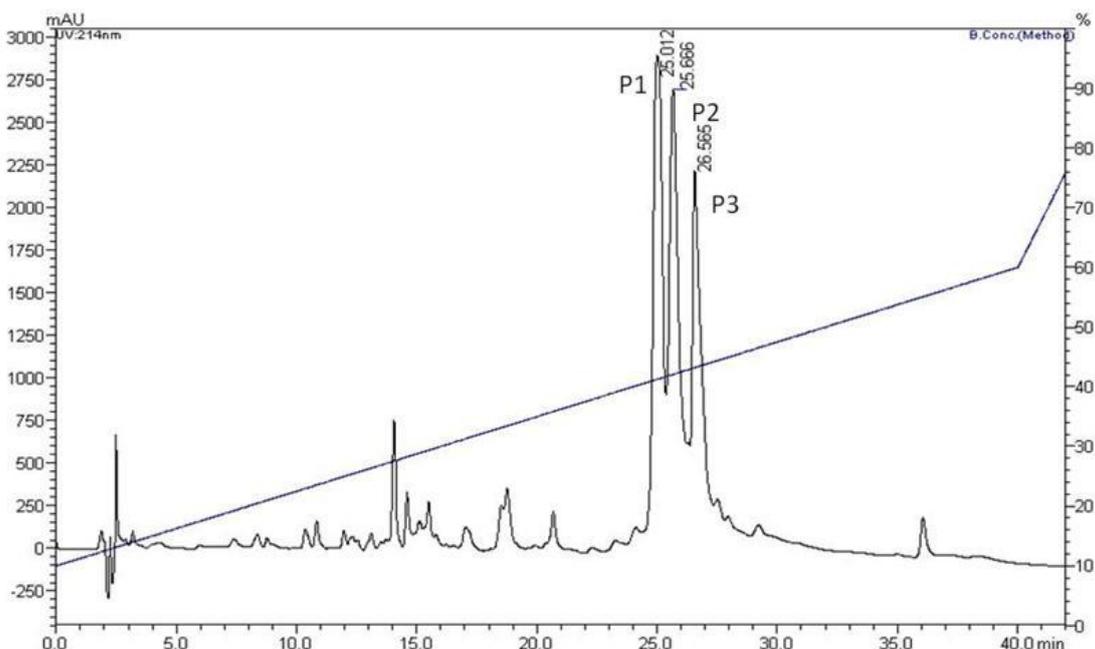


Figura 5. Cromatografia em HPLC da fração II do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Na figura estão representados os 3 picos coletados, denominados P1, P2 e P3.

O pico que aparece no tempo de retenção em 25,012 minutos (denominado P1) foi re-cromatografado para obter-se um pico mais homogêneo e isolado (figura 6). Esse pico foi escolhido, pois, em trabalho prévio realizado em nosso laboratório (CONCEIÇÃO, 1999), esta fração foi sequenciada e se mostrou homóloga à toxina TsTX-I.

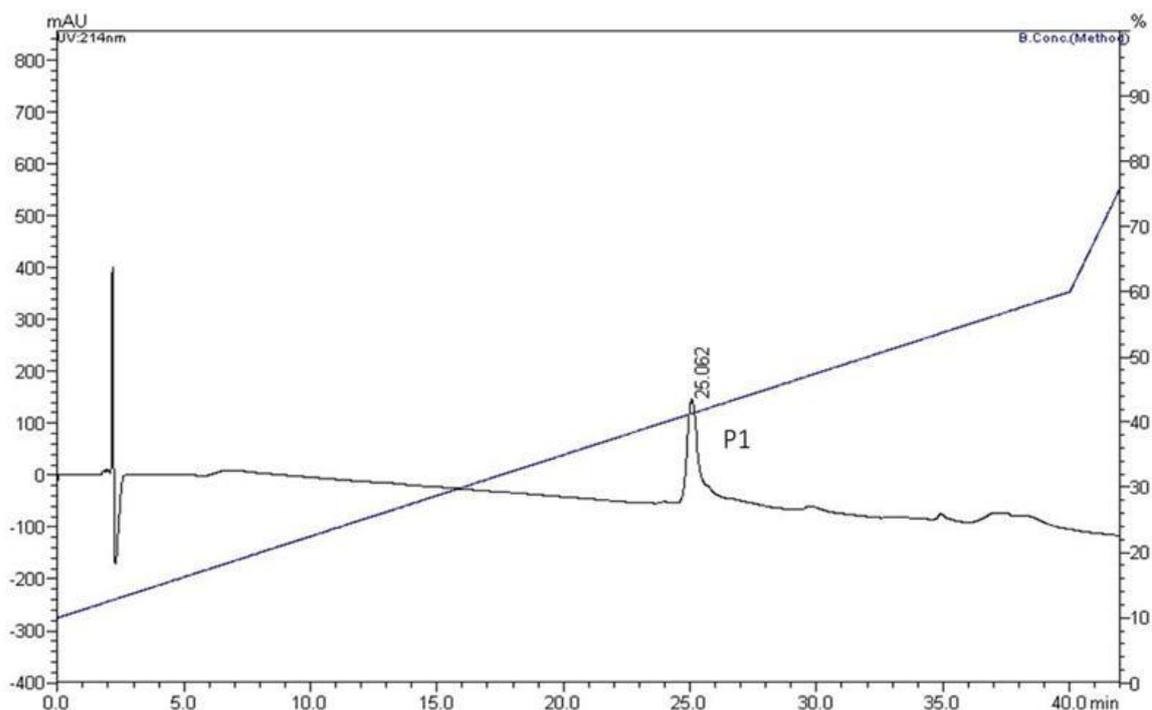


Figura 6. Recromatografia em HPLC do pico P1 da fração II do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*.

Para estimativa da concentração proteica das amostras foi utilizado uma curva padrão de albumina (Calbiochem, EUA) como referência. A leitura da placa foi realizada em leitor de placas de 96 poços transparentes (Perkin Elmer) e a absorbância foi determinada utilizando o comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA).

As purificações foram realizadas pelo Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica e pela doutora Fernanda Portaro do Laboratório de Imunoquímica, ambos do Instituto Butantan.

3.3.2. Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas e eletrodos

Os animais foram anestesiados com uma mistura de hidrato de cloral (4,25 g), tiopental (0,66 g), sulfato de magnésio (2,16 g), álcool absoluto (10,35 mL), propilenoglicol (42,8 mL) e água destilada (q.s.p. 100 mL) por via intraperitoneal (4,0 mL/kg) e fixados em aparelho estereotáxico. Após assepsia local com álcool a 70%, houve exposição da caixa craniana.

As coordenadas de implante foram estabelecidas através do Atlas Estereotáxico de Paxinos e Watson (1998), usando-se o bregma como ponto zero. De acordo com o experimento a ser realizado foram implantados, no hipocampo dorsal, cânula guia para “probe” de microdiálise, cujas coordenadas foram AP -5,3; LAT -4,0; ALT -2,0, ou cânula guia para injeção intracerebral (AP -4,8; LAT -3,2; ALT 2,8) e eletrodo para registro da atividade elétrica cerebral (AP -4,8; LAT 3,2; ALT -3,0).

O sistema foi fixado à caixa craniana por parafusos de relojoeiro em aço inox e polímero de acrílico adicionado a acrílico auto-polimerizante. Em seguida, a pele foi suturada e as cânulas e/ou eletrodos ficaram expostos. Após a cirurgia os animais foram deixados em recuperação em gaiolas individuais, com água e comida à vontade por um período mínimo de 24 horas.

3.3.3. Injeção intracerebral

A injeção foi feita utilizando-se um sistema constituído por uma agulha 30G conectada, através de um cateter de polietileno de aproximadamente 5 cm, a uma microseringa de 5 μ L. O cateter foi preenchido com a solução de toxina e a microseringa com água destilada. Os animais foram imobilizados manualmente e a agulha foi inserida na cânula guia. A injeção foi feita lentamente (0,5 μ L/min) e após seu término a agulha permaneceu no local por mais 30 segundos para evitar o refluxo do material.

3.3.4. Microdiálise

Os animais, já recuperados da cirurgia, foram colocados em gaiolas plásticas individuais onde permaneceram por cerca de 30 minutos para habituação. As “probes” para microdiálise (CMA/11 – Cut-off 6000D) foram conectadas (pelo canalículo de entrada) através de cateteres de polietileno de 40 cm de comprimento a microseringas (Hamilton) com capacidade para 250 μL preenchidas com Ringer e inseridas em uma bomba de infusão regulada para um fluxo de 2,13 $\mu\text{L}/\text{min}$. Cateteres de saída com 30 cm de comprimento também foram conectados às “probes” (pelo canalículo de saída) e através destes foram coletados os perfusatos em tubos tipo Eppendorf. Após o preenchimento de todo o sistema com solução Ringer, as “probes” foram inseridas através da cânula guia, de forma a deixar a membrana de diálise em contato com o tecido cerebral. A coleta das amostras foi iniciada após aproximadamente 45 minutos de fluxo, tempo necessário para o líquido percorrer o cateter de saída (volume morto). Passado esse período, os perfusatos foram coletados nos tubos a cada 60 minutos, sendo trocados após esse período pelo tubo seguinte. Após a coleta das primeiras três amostras para análise basal, os animais foram submetidos à injeção intracerebral. Para isso, a “probe” foi retirada, sem interromper o fluxo no sistema, a toxina foi injetada e a “probe” foi inserida, dando continuidade à coleta até um total de 9 amostras por animal. Imediatamente depois de cada coleta, as amostras foram congeladas e armazenadas em freezer -80°C até o momento das dosagens.

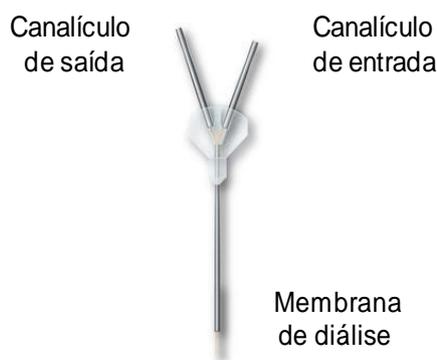


Figura 7. Probe para microdiálise.

3.3.5. Registro da atividade elétrica cerebral (AEC) e observação comportamental

Os animais, já recuperados da cirurgia estereotáxica, foram colocados em caixas individuais de acrílico (30X20X30 cm), dentro de uma gaiola de Faraday. Após cerca de 30 minutos de habituação os eletrodos hipocâmpais foram conectados, através de cabos flexíveis, a um registrador computadorizado (BIOPAC System Inc., modelo MP150) e procedeu-se ao registro da atividade elétrica cerebral. O registro foi ampliado e a velocidade da leitura fixada em 5 mm/segundo. Verificou-se o traçado basal por aproximadamente 30 minutos e, em seguida, procedeu-se à injeção intra-hipocâmpal. Terminada a injeção os animais retornaram às gaiolas de acrílico e iniciou-se o registro da AEC e a concomitante observação comportamental por 4 horas ininterruptas. Considerou-se como atividade eletrográfica epileptiforme o aparecimento de espículas isoladas ou agrupadas e descargas moderadas e intensas. Em relação ao comportamento foram observados os parâmetros locomoção, presença de “wet dog shake” (WDS), frequência respiratória e aumento de secreção.

3.3.6. Perfusão dos animais e retirada dos cérebros

Uma semana após a injeção, os animais foram anestesiados com CO₂ e suas caixas torácicas foram abertas de forma a deixar o coração exposto. Foram perfundidos com solução de tampão fosfato-salina (PBS), através de punção no ventrículo esquerdo, durante 3 minutos. Logo após, foi passada solução de formol a 10% dissolvido em sacarose, também por 3 minutos. Ao término desse processo, os animais foram decapitados e seus cérebros retirados e mantidos em formol por no mínimo 7 dias.

3.3.7. Preparação das lâminas histológicas e análise tecidual

Os tecidos cerebrais obtidos da perfusão foram retirados do formol, submetidos a banhos sucessivos em álcool 100% durante uma semana, emblocados em Paraplast® e submetidos a cortes histológicos, em sentido coronal, na espessura de 10 µm. Os cortes foram feitos na área de implante das cânulas e nas regiões

imediatamente adjacentes. Depois de montadas, as lâminas foram coradas com violeta de cresil e submetidas à observação em microscópio óptico, com aumento de 40X, nas regiões CA1, CA3 e CA4 do hipocampo ipsi e contra lateral à injeção. Para delimitação da área analisada, foi usado um retículo de 100 X 100 µm colocado na ocular, subdividido em 10 fileiras com 10 quadrados cada. Foram analisados 5 cortes por cérebro, com uma distancia de 100 µm entre eles. Apenas as células íntegras, com núcleo e nucléolo nítidos, foram contabilizadas.

3.3.8. Dosagem dos níveis cerebrais de aminoácidos neurotransmissores

As alíquotas obtidas pelo procedimento descrito no item 3.3.4. foram descongeladas e analisados os níveis de 3 aminoácidos neurotransmissores (glutamato, glicina e GABA) comparando-os com seus respectivos padrões com concentração conhecida. Nesta análise, foi utilizado um aparelho de UFLC, Shimadzu, acoplado com uma coluna C18, fase reversa (ACE 3 C18-300®, 150X3.0 mm), com detector UV variável, ajustado no comprimento de onda de 254 nm, utilizando solução A e B, sendo a A composta por 94% solução mãe com 6% acetonitrila, já a solução B é composta por 80% acetonitrila, 20% água milli-Q e 0,02% EDTA. A análise foi realizada em 46 minutos, fluxo 0,3 mL/min, Os resultados da análise foram dados em comparação com a análise do padrão, para calcular a concentração dos aminoácidos.

As dosagens de aminoácidos foram realizadas pelo doutor Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

3.3.9. Preparação das amostras para dosagem de citocinas

Os animais foram operados para implantação de cânulas conforme descrito no item 3.3.2. Após 4 dias de recuperação, os animais foram injetados e sacrificados por inalação de CO₂ 4 horas após injeção.

Os cérebros foram retirados e o hipocampo foi separado do restante do tecido cerebral. Todo o procedimento foi realizado sobre uma bolsa de gelo. Os tecidos foram colocados em solução inibidora de protease, preparada a partir de uma solução de tampão fosfato com adição de coquetel inibidor de proteases Sigma

P8340 (100 µL de coquetel para 34 mL de PBS). As amostras foram maceradas por um homogeneizador de tecidos (Polytron) com 3 pulsos de 10 segundos cada e o homogenato foi centrifugado a 23.478 G por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -80°C até o momento dos ensaios.

O sangue foi coletado, por punção cardíaca, em seringas plásticas e transferido para tubos plásticos contendo citrato de sódio (3,8%) como anticoagulante e centrifugado a 23.478 G por 15 minutos a 4°C. O plasma obtido foi armazenado a -80°C até o momento dos ensaios.

3.3.10. Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10) foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o fabricante dos Kits (Immunoassay System, Promega, Madison, WI).

Para a realização dos ensaios imunoenzimáticos foram utilizados o sobrenadante dos tecidos macerados (cérebro e hipocampo) e o plasma.

As placas de microtitulação foram revestidas com as amostras e com as concentrações do padrão (foram realizadas diluições seriadas de 1:2), de IL-1 β , IL-6, IL-10. As placas foram lavadas e um anticorpo monoclonal para cada citocina (biotina) foi adicionado a cada poço. Foi feita a incubação durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas e a enzima estreptavidina foi adicionada a cada poço. Foi realizada uma nova incubação por 1 hora em temperatura ambiente. Após a adição da enzima estreptavidina, substrato e solução de parar, a quantidade de cada citocina foi determinada por absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica (OD) observada durante a leitura e a concentração de citocina presente em cada poço.

3.4. Delineamento experimental

Experimento 1: Efeitos eletrográficos e comportamentais da injeção de diferentes doses da toxina TsTX-I em ratos.

Quatro grupos de animais (entre 4 e 12 animais por grupo) foram submetidos à cirurgia estereotáxica (3.3.2.) para implante de cânulas e/ou eletrodos no hipocampo. Após o período de recuperação os animais foram injetados com 1,0; 0,5; 0,25 ou 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da toxina (3.3.3.), respectivamente, e observados quanto ao aparecimento de alterações comportamentais e letalidade. Os animais injetados com 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foram submetidos também ao registro da AEC (3.5.5.). Uma semana depois os cérebros foram retirados e processados para a verificação do posicionamento das cânulas e/ou eletrodos ou para a análise histopatológica de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.3.6. e 3.3.7. Foram utilizados o teste de Fisher para a análise das alterações comportamentais e a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para a análise da contagem celular, com um nível de significância de $p < 0,05$ para as duas análises.

Experimento 2: Efeitos da injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I sobre os níveis extracelulares de aminoácidos neurotransmissores em ratos.

Um grupo de oito animais foi submetido à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas de microdiálise, conforme descrito no item 3.3.2. Após a recuperação, os animais foram submetidos à microdiálise, de acordo com a descrição do item 3.3.4, e receberam injeção intra-hipocampal (item 3.3.3) de TsTX-I (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Imediatamente após cada coleta, as amostras foram congeladas e armazenadas em freezer -80°C até o momento das dosagens (item 3.3.8). Uma semana depois os cérebros foram retirados e processados para a verificação do posicionamento das cânulas e/ou eletrodos ou para a análise histopatológica de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.3.6. e 3.3.7.

Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida de teste de Tukey, com um nível de significância de $p < 0,05$.

Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I sobre os níveis extracelulares de citocinas em ratos.

Três grupos de cinco animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia, conforme descrito no item 3.3.2. Após um período de recuperação de 4 dias, os animais receberam uma injeção intra-hipocampal (item 3.3.3) de TsTX-I (0,125 µg/µL), ou de 1 µL de solução salina (controle negativo), ou de 1,5 µg/µL de ácido caínico (controle positivo). Quatro horas depois da injeção, os animais foram sacrificados para extração dos tecidos cerebrais e do sangue (item 3.3.10).

Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, com um nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Experimento 1: Efeitos eletrográfico, comportamental e histológico da injeção de diferentes doses da toxina TsTX-I em ratos.

As alterações comportamentais observadas foram prostração, dispneia, dificuldade respiratória, dificuldade de locomoção, secreção lacrimal aumentada e “wet dog shakes” (WDS) na maioria dos animais. A intensidade destas alterações foi dependente da dose (Tabela 1). A ocorrência de morte também foi mais frequente com as doses mais elevadas (Tabela 1).

Em relação às alterações eletrográficas, a TsTX-I, na dose de 0,125µg, foi capaz de desencadear descargas epileptiformes intensas (figura 8) de curta ou longa duração (variavam de 15 a 45 segundos de duração aproximadamente). Também foram observadas espículas agrupadas (figura 8), com um tempo de duração semelhante ao das descargas intensas. Essas manifestações se iniciaram aproximadamente 30 minutos depois da injeção e se mantiveram ao longo de todo o período do registro, embora com uma diminuição de sua intensidade aproximadamente 2 horas após injeção.

Apesar das alterações descritas acima, não houve lesão neuronal em nenhuma das regiões hipocâmpais investigadas (figura 9).

Os animais injetados com solução Ringer não apresentaram nenhum tipo de alteração comportamental (Tabela 1), eletrográfica (figura 8) ou histopatológica (figura 9).

Tabela 1. Efeitos comportamentais observados após injeção intra-hipocampal de doses crescentes da toxina TsTX-I

	N	Prostração	Dispneia	Dificuldade respiratória	Dificuldade locomotora	Secreção lacrimal	WDS	Morte
Toxina 0,125 µg/µl	8	25%	87,5%*	-	50%	25%	37,5%	-
Toxina 0,25 µg/µl	12	66,6%*	83,8%*	66,6%*	50%	25%	25%	33,3%
Toxina 0,50 µg/µl	4	100%*	100%*	100%*	100%*	-	-	50%
Toxina 1,0 µg/µl	5	100%*	100%*	100%*	-	-	-	60%*
Ringer	5	-	-	-	-	-	-	-

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

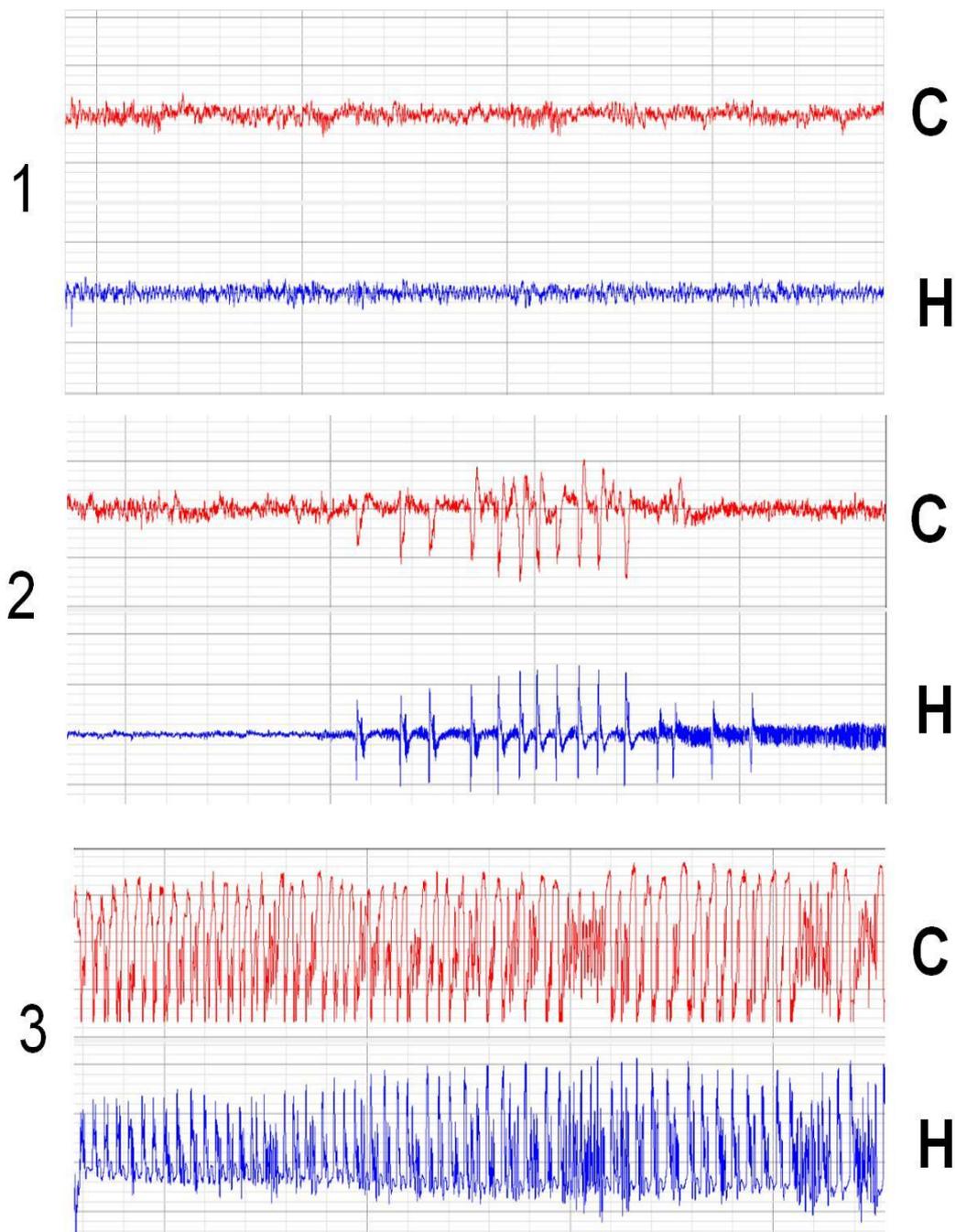


Figura 8. Parâmetros observados no registro eletrográfico do córtex (C) e hipocampo (H) de ratos. Em (1) registro de traçado sem alteração, (2) alteração elétrica com formação de espículas agrupadas e (3) alteração elétrica com formação de descargas intensas de longa duração.

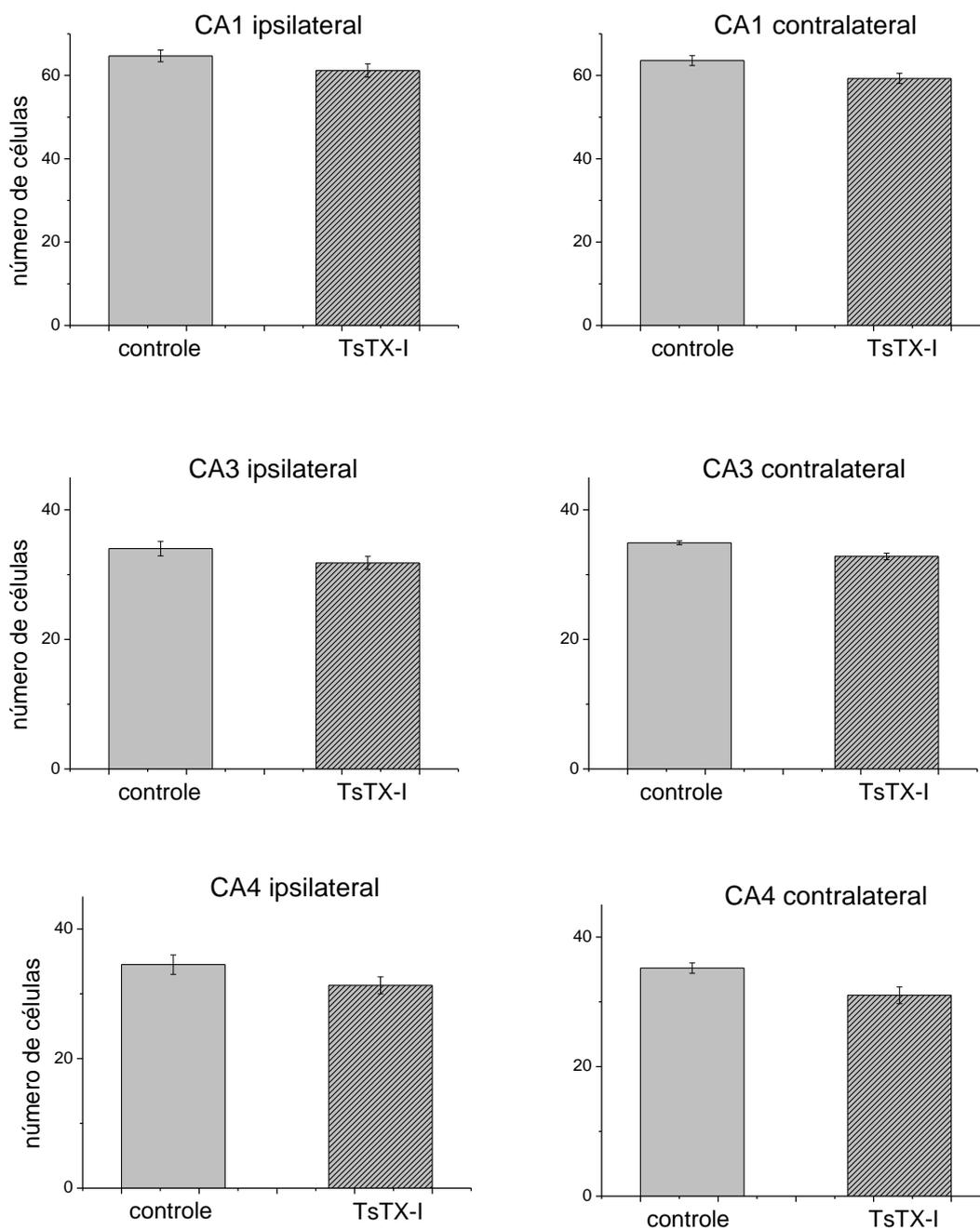


Figura 9. Cortes histológicos de cérebros de ratos (10 μ m) foram analisadas por microscopia ótica. A análise se refere à camada piramidal das áreas hipocâmpais CA1, CA3 e CA4 dos lados tratado (ipsilateral) e não tratado (contralateral). Os dados estão representados como as médias \pm erro padrão da média. ANOVA seguida do teste de Tukey. * $p < 0,05$.

Experimento 2: Efeitos da injeção intra-hipocampal da toxina TsTX-I sobre os níveis extracelulares de aminoácidos neurotransmissores em ratos.

No que se refere à dosagem dos aminoácidos neurotransmissores, a análise individual de cada animal mostrou que não houve diferenças significativas entre as amostras basais (as três primeiras amostras coletadas) e aquelas coletadas após a injeção da toxina TsTX-I, na dose de 0,125 µg (Figura 10). Durante a coleta os animais apresentaram o mesmo padrão de alterações comportamentais descritas na tabela 1.

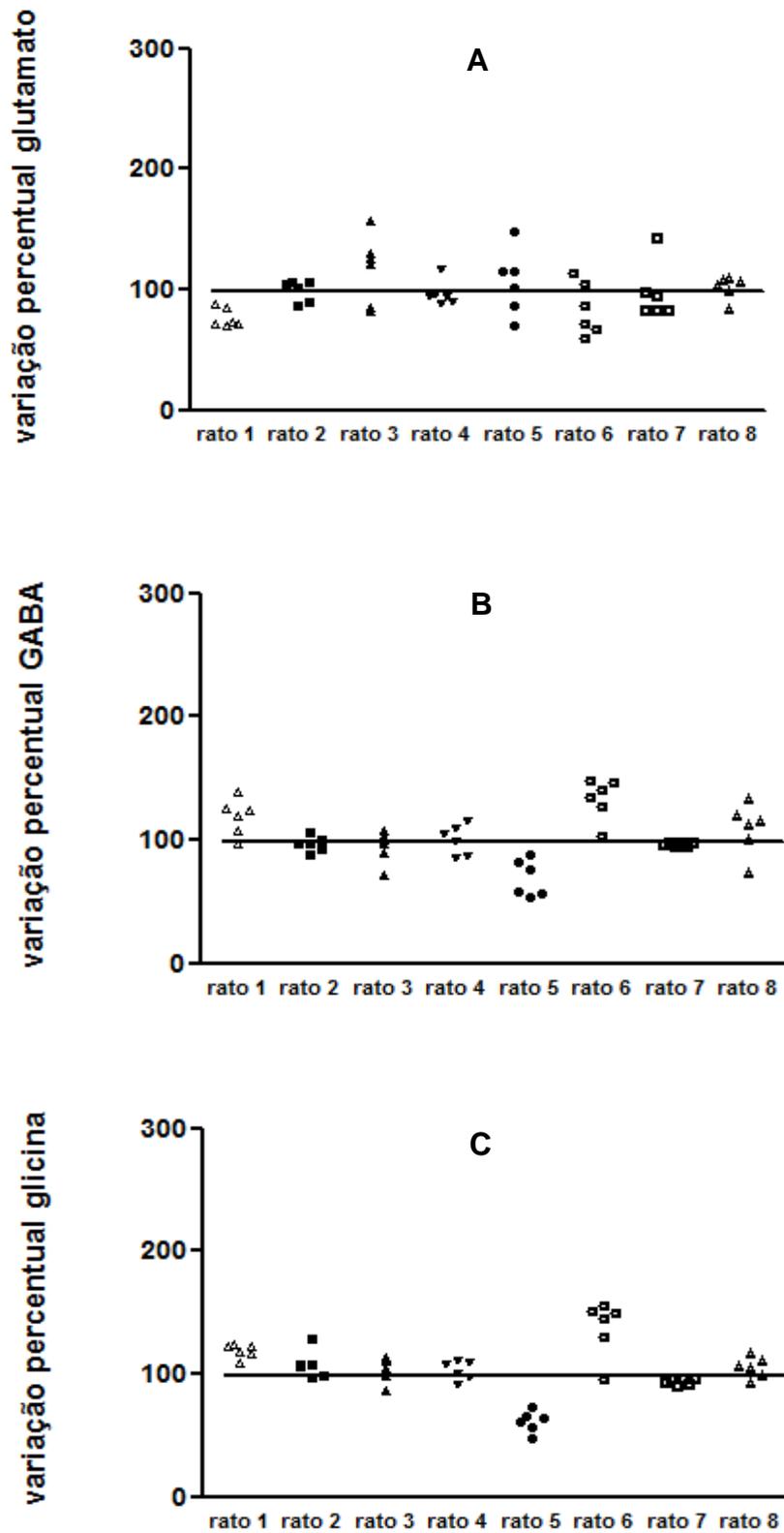


Figura 10. Variação individual em relação aos valores basais hipocampais de glutamato (A), GABA (B) e glicina (C) em ratos submetidos à injeção intracerebral da toxina TsTX-I (0,125 µg/µl). ANOVA seguida de teste de Tukey.

Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal da toxina TsTX-I sobre os níveis extracelulares de citocinas em ratos.

Quatro horas depois da injeção intrahipocampal da TsTX-I na dose de 0,125 µg, foi observado uma diminuição significativa nos níveis de IL-1β no cérebro (figura 11) quando comparado aos grupos controle (injetados com salina ou ácido caínico), ocorrendo o mesmo com a citocina IL-10 (figura 12). Em ambos os casos não houve diferença significativa entre o grupo tratado com salina e o grupo injetado com ácido caínico. No hipocampo verificou-se uma tendência à diminuição dos níveis de IL-1β (figura 11) enquanto que os níveis de IL-10 (figura 12) não sofreram alteração.

Quanto a IL-6, não foi observada diferença nos seus níveis no cérebro (figura 13). Contudo, houve uma diminuição significativa do grupo tratado com ácido caínico (controle positivo) quando comparado com o grupo injetado com salina (controle negativo) na região do hipocampo. Houve uma diferença significativa do grupo desafiado com a toxina quando comparado ao grupo tratado com ácido caínico, também na região do hipocampo.

No que se referem aos valores sanguíneos, seus níveis não foram detectados pelos testes para nenhuma das citocinas (dados não mostrados).

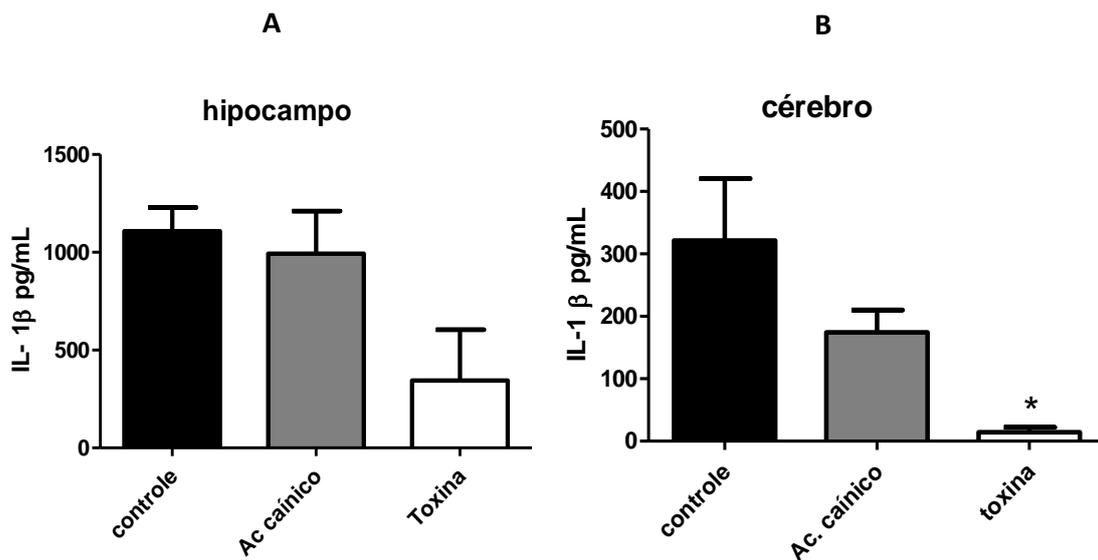


Figura 11. Dosagem do nível de IL-1 β em hipocampo (A) e cérebro (B) de ratos adultos, injetados com toxina TsTX-I do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, por via hipocampal, na dose de 0,125 μ g. Os dados se referem à média \pm erro padrão da média. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

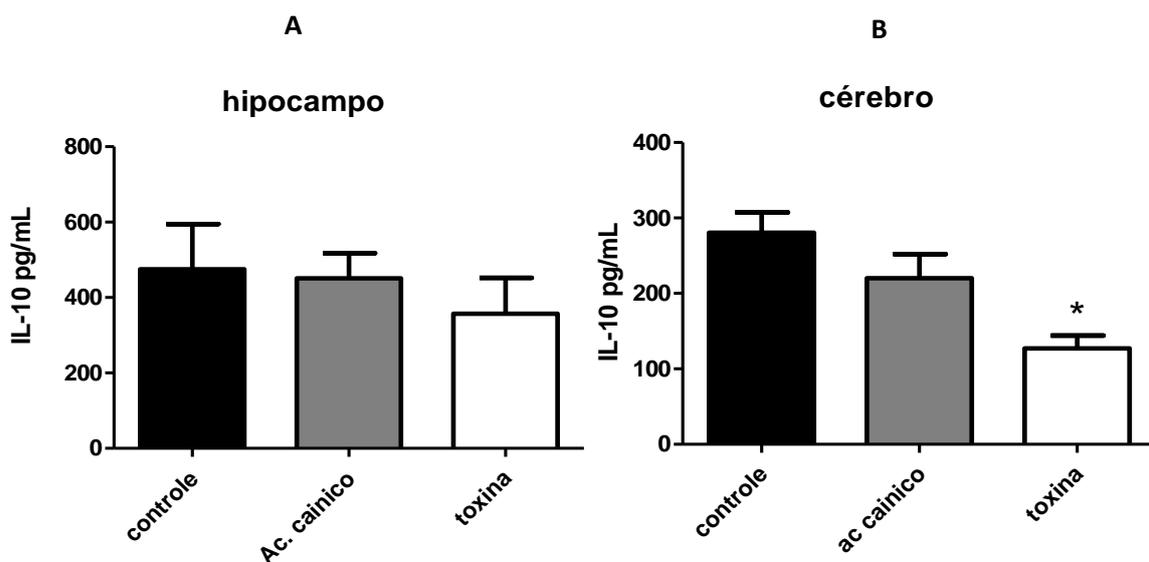


Figura 12: Dosagem do nível de IL-10 em hipocampo (A) e cérebro (B) de ratos adultos, injetados com a toxina TsTX-I do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, por via hipocampal, na dose de 0,125 μ g. Os dados se referem à média \pm erro padrão da média. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

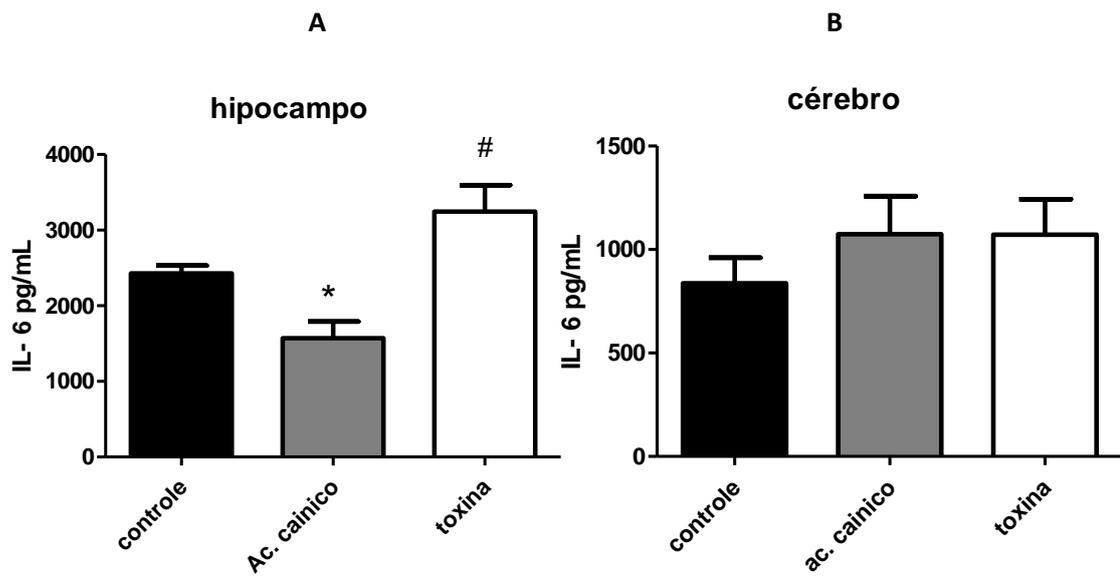


Figura 13: Dosagem do nível de IL-6 em hipocampo (A) e cérebro (B) de ratos adultos, injetados com toxina TsTX-I do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, por via hipocampal, na dose de 0,125 µg. Os dados se referem à média ± erro padrão da média. Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente grupo de ácido caínico ($p < 0,05$) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

5. DISCUSSÃO

A TsTX-I é uma das toxinas mais importantes e bem estudadas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, já que é a mais tóxica e abundante da peçonha dessa espécie (COLOGNA et al., 2009).

Vários estudos tem demonstrado sua ação periférica (OLIVEIRA et al., 1989; CUNHA-MELO et al., 1991; SAMPAIO et al., 1991; POSSANI et al., 1991; FLETCHER et al., 1996; CONCEIÇÃO et al., 2005). Entretanto são poucos os estudos sobre seus efeitos no sistema nervoso central (TEIXEIRA et al., 2010).

Efeitos convulsivos podem ser observados em alguns casos de envenenamento severo por escorpiões (DORCE; SANDOVAL, 1992) e já foi demonstrado que a injeção intra-hipocampal de toxinas isoladas do veneno dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis* pode causar alterações eletrográficas e comportamentais em ratos (CARVALHO et al. 1998; LOURENÇO et al., 2002; NENCIONI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2010; OSSANAI et al., 2012).

Em virtude disso, nesse trabalho foi escolhida a via intra-hipocampal para administração da toxina, já que essa região é particularmente sensível às convulsões (LOTHMAN et al., 1991).

Foram realizadas várias purificações do veneno para obtenção da toxina isolada, uma vez que depois de purificada essa toxina se mostrava inativa (ou perdia parte de sua atividade) quando testadas in vivo. Portanto, para poder determinar a dose mais adequada para se dar continuidade aos experimentos, foi realizada uma curva dose-efeito na concentração inicial de 1µg/µL da toxina (esse valor foi baseado em estudos anteriores com a toxina TsTX). Essa concentração, além de causar alterações muito pronunciadas como dificuldade respiratória intensa e prostração, levou a maioria dos animais a óbito (60%). De forma a atenuar esses sintomas, foram realizadas diluições sucessivas até que fosse encontrado um valor que, embora capaz de desencadear as alterações comportamentais e eletroencefalográficas esperadas (TEIXEIRA et al., 2010), mantinha os animais vivos. A dose escolhida para os testes posteriores foi de 0,125 µg/µl da toxina TsTX-I.

Após a injeção intra-hipocampal da toxina TsTX-I, observamos os mesmos sintomas comportamentais descritos anteriormente (TEIXEIRA et al., 2010) como prostração, dificuldade respiratória, dificuldade de locomoção, aumento de secreções salivar e lacrimal.

Em nossas condições experimentais foram observadas, nos animais desafiados com a toxina, alterações elétricas cerebrais caracterizadas por espículas agrupadas e descargas epileptiformes, além de alterações comportamentais relacionadas com manifestações convulsivas. Distúrbios dessa natureza geralmente são explicados por um desequilíbrio entre as atividades excitatórias e inibitórias no cérebro, no qual há uma prevalência da excitação sobre a inibição na atividade neuronal (GERFIN-MOSER et al., 1995). O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios do cérebro (CUNNINGHAM et al., 1994) e aparece em grande quantidade no hipocampo (uma região importante em processos convulsivos), sendo considerado um neurotransmissor importante na etiologia da epilepsia. O GABA, por sua vez, é considerado o principal neurotransmissor inibitório (VORNOV, 1991) e uma diminuição na sua atividade é capaz de eliciar convulsões. A glicina pode desempenhar tanto uma função inibitória na medula espinhal (HERNANDES; TRONCONE, 2009), como de intermediário na função glutamatérgica como co-agonista dos receptores do tipo NMDA (LEESON; IVERSEN, 1994).

Para investigar um possível envolvimento desses aminoácidos neurotransmissores nas manifestações apresentadas pelos animais, foram realizadas dosagens intra-hipocampais dos mesmos, e constatou-se que seus níveis não se mostravam alterados quando comparados aos valores basais. É interessante de se observar que esse resultado difere do obtido em um trabalho semelhante, realizado por Nencioni et al (2003), no qual foram avaliados os níveis desses mesmos neurotransmissores depois do desafio com outra toxina do escorpião *T. serrulatus*, a TsTX. Esta toxina causou alterações eletrográficas caracterizadas por descargas curtas e intensas com início imediato após a injeção e tornando-se menos intensas duas horas depois, e não promoveu alterações respiratórias ou morte (CARVALHO et al., 1998). Estes efeitos foram atribuídos a um aumento dos níveis de glutamato em relação aos seus valores basais, fato que foi confirmado com a

utilização de antagonistas glutamatérgicos que se mostraram eficientes em bloquear os efeitos da toxina (NENCIONI et al., 2003).

Outra diferença importante entre essas duas toxinas diz respeito à capacidade de promover lesão das células hipocâmpais. Nesse caso, enquanto a TsTX promoveu degeneração celular nas porções CA1, CA3, e CA4 do hipocampo ipsi e contralateral à injeção (CARVALHO et al., 1998), com a TsTX-I isso não ocorreu. Essa diferença histológica pode ser atribuída a um aumento na liberação de glutamato promovido pela TsTX, o que não ocorre em animais injetados com a TsTX-I. Nessa condição, a ligação do glutamato aos receptores do tipo AMPA promove uma despolarização da célula que é iniciada pela entrada de íons no meio intracelular que, por sua vez, promove a abertura de canais de sódio dependentes de voltagem. O aumento da despolarização decorrente do influxo de sódio torna o receptor NMDA receptível ao glutamato ainda disponível na fenda, promovendo uma entrada descontrolada de cálcio (DOBLE et al., 1999) que inicia uma complexa cascata de eventos bioquímicos que podem danificar neurônios distantes do foco isquêmico ou da lesão primária por mecanismos secundários não relacionados com o insulto inicial (SCATTON, 1994). Esse mecanismo é conhecido como excitotoxicidade (DARGENT et al, 1996; OBRENOVITCH et al, 1996).

Esses dados demonstram que, apesar das duas toxinas atuarem sobre o mesmo tipo de canal iônico e serem testadas na mesma região, o fato de interagirem em sítios de ligação distintos já é suficiente para desencadear respostas fisiológicas também distintas.

Além de sua ação sobre os neurotransmissores, já foi demonstrado que o veneno escorpiônico pode estimular a liberação de citocinas, principalmente em casos de envenenamento severo (MEKI; MONHEY-EL-DEAN, 1998; ZOCCAL et al., 2011). Níveis elevados de IL-6 foram encontrados no plasma de pacientes picados pelo escorpião *T. serrulatus* (MAGALHÃES et al., 1999; FUKUHARA et al., 2003) e ocorreu aumento de IL-6 e IL-1 em camundongos expostos aos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *Centruroides noxius* (PETRICEVICH e PEÑA 2002; PESSINI et al., 2003; PETRICEVICH et al., 2006). Da mesma forma, foi verificado um aumento dos níveis da IL-10 no plasma de camundongos envenenados por *Androctonus australis hector* (ADI-BESSALEM et al., 2008).

Sabendo que os venenos e toxinas escorpiônicas causam aumento na liberação de citocinas e que algumas destas estão envolvidas com processos convulsivos, procuramos testar a possibilidade de as convulsões eletrográficas observadas em nossos animais serem causadas por alterações nos níveis de citocinas. Assim nos propusemos a avaliar os níveis intra-cerebrais de algumas delas.

As citocinas são geralmente descritas como mediadores inflamatórios, embora existam vários trabalhos mostrando que essas moléculas são importantes também para a neuromodulação (MTODZIKOWSKA-ALBRECHT et al., 2007; GALIC et al. 2012;). Há evidências de que as citocinas agem sobre os canais iônicos interferindo de forma direta na função neuronal e, conseqüentemente, na liberação de neurotransmissores (SCHÄFERS; SORKIN, 2008; RIAZI et al., 2010). Os mecanismos pelos quais fazem isto ainda são pouco conhecidos (SCHÄFERS; SORKIN, 2008). Foi demonstrado que as citocinas inibem a recaptação de glutamato pelos astrócitos em cultura de células de rato (YE; SONTHEIMER, 1996), diminuem a neurotransmissão GABAérgica em neurônios hipocâmpais (WANG et al., 2002) e aumentam a função do receptor NMDA em células hipocâmpais de rato (VIVIANI et al., 2003). Dessa forma, pode haver uma ligação entre a ação das toxinas escorpiônicas e das citocinas sobre os canais iônicos. Zoccal et al. (2011) sugerem que esta liberação independe do tipo de canal iônico ao qual a toxina se liga.

As citocinas são um grupo de proteínas muito importantes nos processos de comunicação entre as células. Constituem uma classe de compostos diferentes em termos de origem e função e são fundamentais para o funcionamento adequado da resposta imune inata e adaptativa (MTODZIKOWSKA-ALBRECHT et al.,2007). Apesar de terem um importante papel no funcionamento normal do sistema nervoso central (GALIC et al., 2012), estão também envolvidas no funcionamento alterado deste sistema durante os processos inflamatórios causados por infecções no cérebro ou na periferia e doenças inflamatórias (GALIC et al., 2012).

Achados experimentais e clínicos recentes sustentam um papel fundamental dos processos inflamatórios na epilepsia (VEZZANI; GRANATA, 2005). Tem sido sugerido o envolvimento das citocinas na patogênese das convulsões límbicas porque os níveis de seus mRNA estão aumentados durante este processo

(RAVIZZA; VEZZANI, 2006). Moléculas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 são expressos em níveis muito baixos em cérebros normais e seus níveis de mRNA e de proteínas aumentam rapidamente (menos de 30 minutos) após a indução da convulsão, voltando aos níveis basais em 48-72 horas do início da convulsão (DE SIMONI et al., 2000). O mecanismo pelo qual a convulsão induz a síntese de citocinas ainda é desconhecido, mas receptores para várias citocinas podem ser encontrados em neurônios e células da glia (BENVENISTE, 1998). A desregulação e/ou produção excessiva de citocinas pode levar à degeneração de neurônios devido aos seus efeitos neurotóxicos e à indução de convulsões (BENVENISTE, 1998).

Em modelos de “status epilepticus” induzido em ratos por estimulação elétrica De Simoni et al. (2000) verificaram que a convulsão induziu um aumento dependente do tempo no conteúdo das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipocampo. O tempo de indução destas 3 citocinas foi semelhante, com um aumento rápido atingindo a expressão máxima em 6 horas e voltando aos valores basais em 1 semana. As análises imunocitoquímicas mostraram que as citocinas foram produzidas por células gliais. Dados semelhantes foram obtidos em ratos tratados com ácido caínico (VEZZANI et al., 1999).

Os mecanismos pelos quais as convulsões aumentam os níveis de citocinas ainda são indefinidos e não explicam porque estas estão aumentadas na glia apenas depois das fases agudas de convulsão e não em ratos com convulsões espontâneas (DE SIMONI et al., 2000). É possível que a degeneração neuronal seja um primeiro sinal para a indução das citocinas e para a ativação da micróglia e que este sinal acabaria após a degeneração completa, 60 dias após o “status epilepticus” (DE SIMONI et al., 2000).

Vezzani et al. (1999) demonstraram que a injeção intra-hipocampal de ácido caínico induzindo convulsão eletrográfica e lesão neuronal está associada a um rápido aumento nos níveis de IL-1 β no hipocampo possivelmente nas células microgliais. Entretanto, usando bicuculina como modelo de convulsão não lesivo, os autores encontraram aumento de IL-1 β no hipocampo, mas esta alteração foi induzida em menor extensão e por uma duração menor do que a causada pelo ácido caínico, apesar do tempo de descarga ser mais longo. Estes achados mostram que a estimulação direta dos receptores glutamatérgicos do tipo cainato não é um pré-requisito para o aumento da IL-1 β na glia e que a atividade convulsiva por si só é

suficiente para desencadear este efeito. Os autores não encontraram evidências histológicas de perda neuronal no hipocampo após injeção da bicuculina. Estes resultados estão de acordo com os nossos dados em que, apesar da toxina causar o aparecimento de convulsão, não houve lesão neuronal.

Tem sido demonstrado que algumas citocinas afetam profundamente a convulsão em roedores, em particular a IL-1 β , que tem atividade pró-convulsivante em uma grande variedade de modelos de convulsão (VEZZANI et al., 2008) e a IL-6 cujos níveis estão aumentados em fatias de hipocampo após convulsão (VEZZANI et al., 2002). Pesquisas com animais tem mostrado um aumento significativo na concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α no hipocampo após convulsões tônico-clônicas (MTODZIKOWSKA-ALBRECHT et al.,2007). Por outro lado, a IL-10 é uma proteína anti-inflamatória capaz de inibir os agentes pró-inflamatórios (MTODZIKOWSKA-ALBRECHT et al.,2007). A produção de moléculas pró-inflamatórias é acompanhada pela síntese concomitante de mediadores anti-inflamatórios e de proteínas capazes de modular a resposta inflamatória evitando a ocorrência de efeitos deletérios (VEZZANI; GRANATA 2005).

Em vista disso, analisamos os níveis cerebrais destas citocinas para verificar se estas poderiam contribuir para as alterações convulsivas observadas após a injeção de TsTX-I.

Utilizamos o macerado do hipocampo dissecado porque é uma estrutura de fácil acesso e relacionada a processos convulsivos, além de ser uma região já utilizada em trabalhos anteriores em nosso laboratório (CARVALHO et al., 1998; NENCIONI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2010). Também verificamos, no macerado do cérebro restante, os níveis de citocinas para conferir se outras áreas poderiam ser influenciadas após uma injeção “in loco” no hipocampo.

O ácido caínico foi utilizado como controle positivo para indução da liberação de citocinas por acreditarmos que esse modelo mimetizaria de forma mais autêntica a condição que queríamos reproduzir. Ele é um agonista glutamatérgico com afinidade por receptores do tipo cainato e tem sido usado em diversos trabalhos como um modelo animal de epilepsia (WILLIAMS et al., 2007). Além de ser capaz de aumentar os níveis extracelulares de glutamato, alguns estudos também mostram que ele é capaz de aumentar os níveis de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e INF- γ em varias regiões do cérebro, inclusive no hipocampo (MINAMI et al,

1991; OPRICA et al, 2006) e que esse aumento pode contribuir para o início e manutenção de processos epiléticos (OPRICA et al, 2006).

Em nossas condições experimentais encontramos uma diminuição nos níveis da IL-1 β e da IL-10 no parâmetro “cérebro total”, quando comparado ao controle (injeção de salina), embora isso não tenha sido encontrado no hipocampo. Uma das explicações para esse resultado seria um efeito “rebote” com um aumento das citocinas seguido de uma diminuição. Em trabalho realizado por Minami et al. (1991) foi observado um aumento na expressão do mRNA para a IL-1 β em áreas como o córtex cerebral, o tálamo e o hipotálamo em 2 horas após uma injeção intraperitoneal de ácido caínico, e que esses valores haviam decaído após 4 horas. Esse mesmo efeito também poderia estar refletido no caso da toxina TsTX-I. Por outro lado a IL-10 poderia ter aumentado na mesma velocidade que a IL-1 β , na tentativa de manter a homeostasia corporal, já que esta se trata de uma citocina anti-inflamatória e, da mesma forma que a IL-1 β , ter diminuído após 4 horas. Em condições normais, é importante haver um equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, sendo que estas últimas são importantes para neutralizar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias (VEZZANI; GRANATA 2005). Qualquer desarranjo existente entre elas pode desencadear processos patológicos distintos. Dessa forma, um aumento de citocinas pró-inflamatórias pode desencadear choque, falência múltipla dos órgãos e até a morte. Por outro lado, um excesso da resposta anti-inflamatória pode suprimir o sistema imune e facilitar infecções (PETRICEVICH, 2010).

Quanto à IL-6, embora não tenha sido observada diferença em relação ao controle negativo, houve uma tendência de aumento nos parâmetros “hipocampo” e “cérebro total”. Isso poderia estar ocorrendo, pois, ao contrário da IL-1 β , seu tempo de liberação é mais tardio, com níveis de mRNA mais elevados em 4 horas no córtex, hipocampo, tálamo e hipotálamo (MINAMI et al., 1991). Corroborando esta hipótese, há trabalhos de literatura com veneno bruto do escorpião *T. serrulatus* ou toxinas purificadas deste mostrando que o pico máximo de IL-1 β ocorre antes do pico máximo de IL-6 (PETRICEVICH; LEBRUN, 2005; PETRICEVICH et al., 2007).

Há também trabalhos na literatura com veneno bruto do escorpião *T. serrulatus* ou toxinas purificadas mostrando uma cinética diferente para estas interleucinas (PESSINI et al., 2003; PETRICEVICH; LEBRUN, 2005; PETRICEVICH

et al., 2007; ZOCCAL et al., 2011). Trata-se, porém de preparações diferentes, a maioria delas in vitro, não servindo como comparação para os nossos dados. O ácido cáínico seguiu um padrão semelhante.

De um modo geral, podemos dizer que os efeitos da toxina TsTX-I são em parte devidos à ação das citocinas analisadas. Entretanto o hipocampo não parece ser seu principal local de ação uma vez que nesta região não houve alterações significantes mas apenas uma tendência. Mas, evidentemente, alguma outra região cerebral está bastante envolvida no processo uma vez que verificamos alterações importantes nos níveis de citocinas ao analisarmos o restante do tecido cerebral, sem o hipocampo. É possível que a área envolvida seja muito próxima ao hipocampo, que é o local de injeção da toxina, uma vez que a possibilidade de migração do local da injeção para as outras regiões é muito pequena. Segundo BEN-ARI et al. (1980) a injeção intracerebral aplicada lentamente e em volumes pequenos não deve difundir para outros locais distantes da injeção. Esta área provavelmente seria parte do sistema límbico, termo usado para designar várias estruturas cerebrais implicadas em funções cognitivas, emoções, comportamento e respostas neuroendócrinas e autonômicas. As principais áreas do sistema límbico são a formação hipocampal e o corpo amigdalóide, além de regiões mais antigas do cérebro como o rinencéfalo, o giro parahipocampal e o córtex entorrinal. Todas estas estruturas estão relacionadas umas com as outras por uma rede de fibras de projeção e tem um papel fundamental nos processos de neuroimunomodulação (HAAS; SCHAUENSTEIN, 1997).

Estudos futuros mais detalhados poderão esclarecer este fato como injeção da toxina na amígdala, dosagem de citocinas neste local, verificação de lesão cerebral em outras regiões hipocampais etc.

Além disso, outras citocinas, não quantificadas no presente trabalho, poderiam estar envolvidas. Como exemplo, pode-se citar o INF- γ e o TNF- α , que são citocinas pró-inflamatórias também envolvidas em processos convulsivos, cujos níveis estão aumentados após envenenamento escorpiónico (PETRICEVICH, 2004, PETRICEVICH et al., 2007).

Não podemos excluir também a participação de outros neurotransmissores. A acetilcolina é um importante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central e poderia influenciar nos efeitos desencadeados pela toxina. As catecolaminas

também poderiam estar envolvidas. Há trabalhos na literatura mostrando que o veneno bruto dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis* causa aumento nos níveis intracerebrais de HVA, um metabolito de dopamina (NENCIONI et al., 2009). O ATP também pode ser considerado um neurotransmissor excitatório no cérebro, envolvido com processos convulsivos, e foi demonstrado que a toxina TsTX-I é capaz de promover a sua liberação seletiva em ducto deferente de ratos (CONCEIÇÃO et al., 2005).

Embora estudos futuros devam ser realizados para uma melhor compreensão do mecanismo envolvido na fisiopatologia desencadeada pela TsTX-I, após administração direta no sistema nervoso central, nossos dados são claros em mostrar que essa toxina é capaz de atuar sobre esse sistema, e que as citocinas estão envolvidas com essa ação, fato até então não vislumbrado. Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que identifica alterações “in vivo” de citocinas no sistema nervoso central.

6. CONCLUSÃO

Dessa forma podemos concluir que a TsTX-I, na dose de 0,125 µg, quando injetada diretamente na região do hipocampo de ratos:

- Causa alterações eletrográficas e comportamentais;
- Não é capaz de induzir lesão neuronal das células hipocampais;
- Não altera os níveis hipocampais de glutamato, glicina e GABA;
- Induz alterações dos níveis de citocinas IL-1 β e IL-10 no cérebro;
- Não induz alterações dos níveis de citocinas IL-6, IL-1 β e IL-10 no hipocampo.

7. REFERÊNCIAS

ADI-BESSALEM, S. HAMMOUDI-TRIKI, D.; LARABA-DJEBARI, F. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damage and inflammatory response. **Exp. Toxicol Pathol.**, v. 60, p. 373-380, 2008.

AMARAL, D. G.; ISHIZUKA, N.; CLAIRBONE, B. Neurons, numbers and the hippocampal net work. In: MATHISEN, J.S; ZIMMER, J.; OTTERSEN, O. P. (Ed). **Progress in brain research: Understanding the brain though the hippocampus: The hippocampal region as a model for studying structure and function.** Amsterdam: Elsevier. 1990. p. 1-11.

AMARAL, D. G.; LAVENEX, P. Hippocampal neuroanatomy. In: ANDERSEN, P. MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. (Ed.) **The hippocampus book.** New York: Oxford University Press. 2007. p. 37-114.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system.** (2^a Ed.). Sydney: Academic press. 1995. p. 443-493.

AMENTA, F.; TAYEBATI, S. K. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as target for treatment f adult-onset cognitive dysfunction. **Curr. Med. Chem.**, v. 15, p. 488-498, 2008.

ANDRADE, M. V.; LISBOA, F. A.; PORTUGAL, A. L.; ARANTES, R. M. E.; CUNHA-MELO, J. R. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, v. 146, p. 581-587, 2007.

ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R. What is tityustoxin? **Toxicon**, v. 30, p.786-789, 1992.

ARONICA, E.; CRINO, P. B. Inflammation in epilepsy: clinical observations. **Epilepsia**, v. 52, p. 26–32, 2011.

BABB, T. L.; PRETORIUS, J. K.; KUPFER, W. R.; GRANDALL, P. H. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 2562-2574, 1989.

BALOSSO, S.; MAROSO, M.; SANCHEZ-ALAVEZ, M.; RAVIZZA, T.; FRASCA, A.; BARTFAI, T.; VEZZANI, A. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. **Brain**, v. 131, p. 3256-3265, 2008

BARBOUCHE, M. R.; HAGUIGA, H.; NOUIRA, S.; KRIFI, M. N.; ABROUG, F.; BOUCHOUCHA, S.; DELLAGI, K. Inflammatory cytokines and scorpion envenomation: analysis of serological levels in 46 Tunisian patients. **Toxicon**, v. 34, p. 156-157, 1996.

BARHANIN, J.; GIGLIO, J. R.; LÉOPOLD, P.; SCHIMD, A.; SAMPAIO, S. V. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12553-12558, 1982.

BARHANIN, J.; SCHIMID, A.; LOMBET, A.; WHEELER, K. P.; LAZDUNSKI, M. J. Molecular size of different neurotoxin receptors on the voltage sensitive sodium channel. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 700-702, 1983a.

BARHANIN, J.; PAURON, D.; LOMBET, A.; NORMAN, R. I.; VIJVERBERG, H. P. M.; GIGLIO, J. R.; LAZDUNSKI, M. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus*-gamma toxin receptor associated with the gating component of the sodium channel from rat brain. **Embo. J.**, v. 2, p. 915-920, 1983b.

BARHANIN, J.; MEIRI, H.; PAURON, D.; LAZDUNSKI M. A monoclonal immunotoxin acting on the sodium channel, with properties similar to those of a scorpion toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 1842-1846, 1985.

BARRAVIERA, B. Systemic inflammatory response syndrome in envenoming. **Toxicon**, v. 3, p. 13-14, 1997.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F. I. V.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANDA, E. S.; FLETCHER, P. L.; MARTINS, B. M.; POSSANI, L. D. Toxic peptides and genes encoding toxin γ of the brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem. J.**, v. 313, p. 753-760, 1996.

BECERRIL, B.; MAONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon**, v. 35, p. 821-835, 1997.

BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O. P.; MELDRUM, B. S. The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesion induced by kainic acid. **Brain Res.**, v.191, p.79-97, 1980.

BEN-BARAK, J.; DUBAI, Y. Scopolamine induces an increase in muscarinic receptor level rat hippocampus. **Brain Res.**, v. 13, p. 193-390, 1980.

BENVENISTE E.N.. Cytokine and Growth Factor Reviews. **Cytokine Actions in the Central Nervous System.**, v. 9, p. 259-275, 1998.

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

BRADY, S. J.; POSCHMAN, M.; TETLIE, E. Giant claw reveals the largest ever arthropod. **Biol. Lett.**, v.4, p. 106-109, 2008.

BÜCHERL, W. Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. **Venomous Animals and Their Venoms.** (Ed.). New York-London: Academic Press, 1971. p. 317-347.

CAMPOS, F. V.; CHANDA, B.; BEIRÃO, P. S.; BEZANILLA, F. Alpha-scorpion toxin imparis a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. **J. Gen. Physiol.**, v. 132, p. 251-263, 2008.

CANDIDO, D. M. Escorpiões. In: BRANDÃO, C. F, CANCELO, E. M. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao final do Século XX. **Invertebrados Terrestres.** São Paulo: FAPESP, 1999. p. 23-34.

CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D.; MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. **Nature**, v. 296, p. 90-99, 1982.

CARPENTER, M. B. Vias olfatórias, estruturas hipocámpais e amígdala. In: CARPENTER, M. B. (Ed.). **Neuroanatomia humana, interamericana**, 1978. p. 492-515.

CARVALHO, F. F.; NENCIONI, A. L. A.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. Behavioral, electroencephalographic and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 60, p. 7-14, 1998.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 20, p. 15-43, 1980.

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

CENDRERO, L. **Zoologia Hispanoamericana Invertebrados**. México: Editorial Porrúa, S.A., 1971.

CESTÉLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanism of neurotoxin action on voltage-gated sodium channel. **Biochimie**, v. 82, p. 883-892, 2000.

CHAUDRY, I. H.; STEPHAN, R. N.; HARKEMA, J. M.; DEAN, R. E. Immunological alterations following simple hemorrhage. In: FAIST, F.; NINNEMAN, J.; GREEN, D. (Ed.). **Immune Consequences of Trauma**. Springer Berlin: Shock and Sepsis, 1989. p. 363-373.

COLOGNA, C. T.; MARCURSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* Venom and Toxins: An Overview. **Protein. Pept. Lett.**, v.16, p. 920-932, 2009.

CONCEIÇÃO, I. M.; LEBRUN, I.; CANO-ABAD, M.; GANDÍA, L.; HERNÁNDEZ-GUIJO, J. M.; LOPEZ, M. G.; VILLARROYA, M.; JURKIEWICZ, A.; GARCIA, A. G. Synergism between toxin- γ from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and veratridine in chromaffin cells. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 1745-1754, 1998.

CONCEIÇÃO, I. M. **Efeitos da toxina TsTX-I do escorpião *Tityus serrulatus* sobre a neurotransmissão simpática no ducto deferente de rato e célula cromafim bovina**. 133 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1999.

CONCEIÇÃO, I. M.; JURKIEWICZ, A.; FONSECA, D. R.; OPPERMAN, A. R.; FREITAS, T. A.; LEBRUN, I.; GARCEZ-DO CARMO, L. Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 144, p. 519-527, 2005.

CORRÊA, M. M.; SAMPAIO, S. V.; LOPES, R. A.; MANCUSO, L. C.; CUNHA, O. A. B.; FRANCO, J. J.; GIGLIO, J. R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin *tityustoxin-I*. **Toxicon**, v.35, p. 1053-1067, 1997.

COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J. M.; ROCHAT, H. Two types of toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. **Toxicon**, v. 20, p. 9-16, 1984.

CUNHA-MELO, J. R.; TOPPA, N. H.; MARTINS, P.; COLARES, C. N.; CASTRO, Y. S.; FREIRE-MAIA, L. Accute gastric mucosal injury induced by toxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom: a novel experimental model in the rat. **Toxicon**, v. 29, p. 1395-1401, 1991.

CUNNINGHAM, M.D.; FERKANY, J.W.; ENNA, S.J. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Life Sci.**, v. 54, p. 135-148, 1994.

CUPO, P.; FIGUEIREDO, A. B.; FILHO, A. P.; PINTYA, A. O.; TAVARES JÚNIOR, G. A.; CALIGARIS, F.; MARIN-NETO, J. A.; HERING, S. E.; SIMÕES, M. V. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. **Int. J. Cardiol.**, v. 116, p. 98-106, 2007

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**, v. 73, p. 209-216, 1996.

DE BIN, J. A.; MAGGIO, M. F.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 361-369, 1993.

DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Novel Paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. **Toxicon**, v.49, p. 171-180, 2007.

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

DE MATOS, I. M.; ROCHA, O. A.; LEITE, R.; FREIRE-MAIA, L. Lung edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 118, p. 143-148, 1997.

DE MATOS, I. M.; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, R.; FREIRE-MAIA, L. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 368, p. 231-236, 1999.

DE MATOS, I. M.; TALVANI, A.; ROCHA, O. O.; FREIRE-MAIA, L.; TEIXEIRA, M. M. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. **Toxicon**, v. 39, p. 863-867, 2001.

DE SIMONI, M. G.; PEREGO, C.; RAVIZZA, T.; MONETA, D.; CONTI, M.; MARCHESI, F.; DE LUIGI, A.; GARANTTINI, S.; VEZZANI, A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 2623–2633, 2000.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative diseases: implications for therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 81, p. 163-221, 1999.

DORCE, V. A. C.; SANDOVAL, M. R. L. Brazilian scorpion venoms: pharmacological aspects. **Ciênc. Cult.**, v. 44, p. 187-191, 1992.

D'SUZE, G.; MONCADA, S.; GONZÁLES, C.; SAVCIK, A.; AGULAR, V.; ALAGÓN, A. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, p. 367-375, 2003.

ENGEL, J. J. R. **Seizures and epilepsy**. Philadelphia: FA Davis, 1989.

FALQUETO, E. B.; MASSENSINI, A. R.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA M. A. Modulation of Na⁺-channels by neurotoxins produces different effects on [3H] ACh release with mobilization of distinct Ca²⁺-channels. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 22, p. 819-826, 2002.

FARIELLO, R.G.; FORCHETTI, C.M.; FISHER, R.S. GABAergic function in relation to seizure phenomena. In: FISHER, R.S.; COYLE, J.T. (Ed). **Neurotransmitters and epilepsy**. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 77-93.

FLETCHER, P. L.; FLETCHER, M.; FAINTER, L. K.; TERRIAN, D. M. Action of the new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. **Toxicon**, v. 34, p. 1399-1411, 1996.

FONSECA, L. C.; TEDRUS, G. M. A. S.; LALLONI, D. T.; TELLA, L. M. G.; MALUF, P.; DE SOUSA, V. D. Distúrbio cognitivo transitório associado a atividade epileptiforme generalizada ou difusa durante o eletroencefalograma. **Arqu. Neuropsiquiatr.**, v. 63, p. 817-824, 2005.

FRANTSEVA, M. V.; PEREZ, V. J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P. L. Free radical production correlates with cell death in an vitro model of epilepsy. **Europ. J. Neurosc.**, v. 12, p. 1431-1439, 2000.

FREIRE-MAIA, L.; ALMEIDA, H. O.; CUNHA-MELO, J. R.; AZEVEDO, A. D.; BARROSO, J. Mechanism of the pulmonary edema induced by intravenous injection of scorpion toxins in the rat. **Agents Actions**, v.8, p.113-8, 1978.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of wistar rats after pilocarpine induced status epilepticus. **Neurosc. Lett.**, v. 399, p. 76-78, 2006.

FUKUHARA, Y. D.; REIS, M. L.; DELLALIBERA-OVILIANO, R.; CUNHA, F. Q.; DONADI, E. A. Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severaly envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v.41, p. 49-55, 2003.

GALIC, M. A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q. J. Cytokines and brain excitability. **Front Neuroendocrinol.**, v. 33, p. 116-125, 2012.

GARCIA, M. L.; TRUMBLE, M. S.; REUBEN, J. P.; KACZOROWSKI, G. S.; Characterization of verapamil binding sites in cardiac membrane vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 15013-15016, 1984.

GAZARIAN, K. G.; GAZARIAN, T.; HERNANDEZ, R.; POSSANI, L. D. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti venoms vaccines. **Vaccine**, v.26, p. 3357- 3368, 2005.

GERFIN-MOSER, A.; GROGG, F.; RIETSCHIN, L.; THOMPSON, S.M.; STREIT, P. Alterations in glutamate but not GABAa receptor subunit expression as a consequence of epileptiform activity in vitro. **Neuroscience**, v. 67, p. 849-865, 1995.

GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion – *Tityus serrulatus* – venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 899-902, 1966.

GUIDINE, P. A.; MORAES-SANTOS, T.; MASSENSINI, A. R.; MORAES, M. F. Carbamazepine protects the CNS of Wister rats against the central effects of scorpion envenomation. **Neurotoxicology**, v. 1, p. 136-142, 2008.

GUREVITZ , M.; KARBATH, 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**, v. 49, p. 473-489, 2007.

HAAS, H.S.; SCHAUENSTEIN, K. Neuroimmunomodulation via limbic structures - the neuroanatomy of psychoimmunology. **Progress in Neurobiology**, v. 51, p. 195-222, 1997.

HAYASHI, T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. **Keio J. Med.**, v. 3, p. 192-193, 1954.

HERNANDES, M. S.; TRONCONE, L. R. P. Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *J. Neural Transm.*, v. 116, p. 1551-1560, 2009.

INCEOGLU, B.; LANGO, J.; JING, J.; CHEN, L.; DOYMAZ, F.; PESSAH, L. N.; HAMMOCK, B. D. One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 922–927, 2003.

KNÖPFEL, T.; KUHU, R.; ALLGLIA, H. Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 1417-1426, 1995.

KUMLIEN, E. In vitro and in vivo studies on epileptogenic tissue in temporal lobe epilepsy. **Acta Univ. U.**, Uppsala, p. 45, 1994.

LEE, D.; ADAMS, M. E. Sodium channels in central neurons of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*: basic properties and modification by scorpion toxins. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p. 499-508, 2000.

LEESON, P. D.; IVERSEN, L. L. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 4053-4067, 1994.

LEHTIMAKI, K. A.; KERANEN, T.; PALMIO, J.; PELTOLA, J. Levels of IL-1beta and IL-1ra in cerebrospinal fluid of human patients after single and prolonged seizures. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, p. 19–22, 2010.

LEHTIMAKI, K. A.; LIIMATAINEN, S.; PELTOLA, J.; ARVIO, M. The serum level of interleukin-6 in patients with intellectual disability and refractory epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 95, p. 184–187, 2011.

LOTHMAN, E. W.; BERTRAM, E. H.; STRINGER, J. L. Functional anatomy of hippocampal seizures. **Progr. Neurobiol.**, v. 37, p. 1-82, 1991.

LOURENÇO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. Escorpiões de Importância Médica. In: Cardoso, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p.182-197.

LOURENÇO, G. A.; LEBRUN, I.; DORCE, V. A. C. Neurotoxic effects of fractions isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1834). **Toxicon**, v. 40, p. 149-157, 2002.

LUCAS, S.; DA SILVA JR, P. I. Escorpiões de interesse médico no Brasil. In: SCHVARTSMAN, S (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 211-215.

MAGALHÃES, M. M.; PEREIRA, M. E.; AMARAL, C. F.; REZENDE, N. A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI F.; GAZZINELLI, R. T.; CUNHA-MELLO, J. R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 37, p. 1155-1164, 1999.

MARCOTTE, P.; CHEN, L.; KALLEN, R. G.; CHAHINE, M. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on voltage-gated sodium channels. **Circ. Res.**, v. 80, p. 363- 369, 1997.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The J. Nutri.**, p. 1007S-1015S, 2000.

MELDRUM, B. S. Implications for neuroprotective. **Prog. Brain Res.**, v. 135, p. 487-495, 2002.

MEKI, A. R.; MONHEY EL-DEAN, Z. M. Serum interleukin-1 beta, interleukin-6, nitric oxide and alfa1-antitrypsin in scorpion envenomed children. **Toxicon**, v. 36, p. 1851-1859, 1998.

MESQUITA, M. B. S.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M. F. D. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 187 p. 58-66, 2003.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progr. Neurobiol.**, v. 54, p. 369-415, 1998.

MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channel from mammalian skeletal muscle. **Nature**, v. 313, p. 316-318, 1985.

MINAMI, M.; KURAISHI, Y.; SATOH, M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 176, p. 593-598, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico e tratamento de Acidentes por animais Peçonhentos**. Brasília, Brasil. p.37-44, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação-Geral das Doenças Transmissíveis por Vetores e a Antropozoonoses / CGDT / Devep / SVS / MS. **Manual de Controle de Escorpões**. Brasília. p. 2-70, 2009.

MTODZIKOWSKA-ALBRECHT, J.; STEINBORN, B.; ZAROWSKI, M. Cytokines, epilepsy and antiepileptic drugs – is there a mutual influence? **Pharmacol Rep.**, v. 59. p. 129-138, 2007.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as neurotransmitter. **Nature**, v. 3, p. 748-755, 2002.

NENCIONI, A. L. A.; CARVALHO, F. F.; LEBRUN, I.; DORCE, V. A. C.; SANDOVAL, M. R. L. Neurotoxic effects of three fractions isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 86, p.149-155, 2000.

NENCIONI, A. L. A.; LEBRUN, I.; DORCE, V. A. C. A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 74, p. 455-463, 2003.

NENCIONI, A. L. A.; LOURENÇO, G. A.; LEBRUN, I.; FLORIO, J. C.; DORCE, V. A. C. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 463, p. 234–238, 2009.

OBRENOVITCH, T. P.; URENJAK, J.; ZILKHA, E. Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. **J. Neurochem.**, v. 66, p. 2446-2454, 1996.

OLIVEIRA, M. J.; FONTANA, M. D.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; CORRADO, A. P.; PRADO W. A. Effects of the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and two of its fractions on the isolated diaphragm of the rat. **Gen. Pharmacol – Vasc. S.**, v. 20, p. 205-210, 1989.

OPRICA, M.; SPULBER, S. D.; ARONSSON, A. F.; POST, C.; WINBLAD, B.; SCHULTZBERG, M. The influence of kainic acid on core temperature and cytokine levels in the brain. **Cytokine**, v. 35, p. 77-87, 2006.

OSSANAI, L. T.; LOURENÇO, G. A.; NENCIONI, A. L.; LEBRUN, I.; YAMANOUYE, N.; DORCE, V. A. Effects of a toxin isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom on the hippocampus of rats. **Life Sci.**, v. 91, p. 230-236, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sydney: Academic Press, 1998.

PELTOLA, J.; PALMIO, J.; KORHONEN, L.; SUHONEN, J.; MIETTINEN, A.; HURME, M.; LINDHOLM, D.; KERANEN, T. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. **Epilepsy Res.**, v. 41, p. 205–211, 2000.

PESSINI, A. C.; TAKAO, T. T.; CAVALHEIRO, E. C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, p. 1495-1504, 2001.

PESSINI, A. C.; SOUZA, A. M.; FACCIOLI, L. H.; GREGÓRIO, Z. M. O.; ARANTES, E. C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 765-774, 2003.

PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm.**, v. 1, p. 39-49, 2005.

PETRICEVICH, V. L.; PENA, C. F. The dynamics of cytokine and oxide nitric secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Mediators Inflamm.**, v. 11, p. 173-180, 2002.

PETRICEVICH, V. L.; Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 3, p. 325-332, 2004.

PETRICEVICH, V. L. Balance between pro-and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. **Mediators of Inflamm.**, v. 6, p. 1-11, 2006.

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

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

PINTAR, A.; POSSANI, L. D.; DELEPIERRE, M. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. **J. Mol. Biol.**, v. 287, p. 359-367, 1999.

PLATA-SALAMAN, C. R.; FRENCH-MULLEN, J. M. H. Interleukin-1b inhibits Ca²⁺ channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 266, p. 1–10, 1994.

POLIKARPOV, I.; JÚNIOR, M. S. M.; MAONI, S.; TOYAMA, M. H.; TEPLYAKOV, A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. **J. Mol. Biol.**, V. 290, p. 175-184, 1999.

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

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

PRENDINI, L.; WHEELER, W. C. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. **Cladistics**, v.21, p. 446-494, 2005.

RAVIZZA, T.; GAGLIARDI, B.; NOE, F.; BOER, K.; ARONICA, E.; VEZZANI, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol. Dis.**, v. 29, p. 142–160, 2008.

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**, v. 137, p. 301-308, 2006.

RIAZI, K.; GALIC, M. A.; PITTMAN Q. J. Contributions of peripheral inflammation to seizures susceptibility: Cytokines and brain excitability. **Epilepsy Research**, v. 89, p. 34-42, 2010.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: CECCARELLI, B.; CLEMENTI, F. (Ed.). **Advances in Cytopharmacology**, New York: Raven Press, 1979. p. 325-334.

ROGACHESKI, E.; MAZER, S.; RODRIGUES, D.; BITTENCOURT, P. R. M. Análises visual e volumétrica por ressonância magnética das formações hipocâmpais em um grupo de pacientes com diagnóstico clínico de epilepsia do lobo temporal. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 56, p. 419-428, 1998.

SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; NETO, F. R.; GIGLIO, J. R. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and TsIV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 29, p. 663-672, 1991.

SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. Behavioural and eletroencephalographic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**, v.31, n.9, p.205-212, 1993.

SCATTON, B. Pharmacology of excitatory amino acid receptors: novel therapeutic approaches in neurodegenerative disorders. In: RECAGNI, G.; BRUNELLO, N.; LANGER, S. (Ed.). **Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction**. Basel: Karger, 1994. p. 157-165.

SCHAFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci. Lett.**, V. 437, p. 188–193, 2008.

SCHOEPP, D. D.; JOHNSON, B G.; SALHOFF, C. R.; WRIGHT, R. A.; GOLDWURTHY, J.S.; BAKER, S. R. Second-messenger responses in brain slices to elucidate to novel glutamate receptors. **J. Neurosci. Methods**, v. 59, p. 105-110, 1995.

SEGAL, M. Acetylcholine and epilepsy. In: FISHER, R. S.; COYLE, J. T. (Ed.) **Neurotransmitters and Epilepsy**. New York: Wiley-Liaa, 1991. p. 95-101.

SINAN. Secretária de Vigilância em Saúde/MS. Portal Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela02_casos_escorpiao2000_2011_01_04_20011.pdf. Acesso em 12 jun. 2012.

SOFER, S.; GUERON, M.; WHITE, R. M.; LIFSHITZ, M.; APTE, RN. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. **Toxicon**, v. 34, p. 389-392, 1996.

TAPIA, R.; MECINA-CEJA, L.; PENÃ, F. On the relationship between extracellular glutamate syperxcitation and neurodegeneration in vivo. **Neurochem. Int.**, v. 34, p. 23-31, 1999.

TEIXEIRA, V. F.; CONCEIÇÃO, I. M.; LEBRUN, I.; NENCIONI, A. L. A.; DORCE, V. A. C. Intrahippocampal injection of TsTX-I, a beta-scorpion toxin, causes alterations in eletroencephalographic recording and behavior in rats. **Life Sci.**, v. 87, p. 501-506, 2010.

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

TOLEDO, D.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 55, p. 249–253, 1976.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINORK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, eletroencephalografic and neurophatological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-336, 1983

VALDIVIA, H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W. J.; CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel of skeletal and cardiac muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 12185-12189, 1992.

VALDIVIA, H.; POSSANI, L. Peptide toxin as probes of ryanodine receptor. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 8, p. 111-118, 1998.

VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the path physiology of epilepsy. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, p. 797-803, 2008.

VEZZANI, V.; CONTI, M.; DE LUIGI, A.; RAVIZZA, T.; MONETA, D.; MARCHESI, F.; DE SIMONI, M. G. Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: Functional evidence for enhancement of electrographic seizures. **J. neurosci.** V. 19, p. 5054-5065, 1999.

VEZZANI, A.; MONETA, D.; RICHINI, C.; ALIPRANDI, M.; BURROWS, S. J.; RAVIZZA, T.; PEREGO, C.; DE SIMONI, M. G. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 43, p. 30-35, 2002.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, p. 1724-1743, 2005.

VIJVERBERG, H. P. M.; LAZDUNSKI, M. A. A new scorpion toxin with a very high affinity for sodium channels an electrophysiological study. **J. Physiol. (Paris)**, v. 79, p. 275-279, 1984.

VIVIANI, B.; BARTESAGHI, S.; GARDONI, F.; VEZZANI, A.; BEHRENS, M. M.; BARTAFAI, T.; BINAGLIA, M.; CORSINI, E.; DI LUCA, M.; GALLI, L. C.; MARINOVICH, M. Interleukin-1 Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 8692-8700, 2003.

VIVIANI, B.; GARDONI, F.; MARINOVICH, M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 82, p. 247-263, 2007.

VORNOV, J. J. Mechanisms of neurotransmitter receptor actions. In: FISHER, R. S.; COYLE, J. T. **Neurotransmitters and epilepsy**, New York, Wiley-Liss, 1991. p. 17-31.

VOUSINOS-PORCHEDE, B.; KONING, E.; KAPLAN, H.; FERRANDON, A.; GUENOUNOU, M.; NEHLIG, A.; MOTTE, J. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium–pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiol. Dis.**, v. 17, p. 385-402, 2004.

WANG, C. X.,SHAIB, A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. **Progress in Neurobiology**, v. 67, p. 161-172, 2002.

WEN, F. H.; SANTALUCIA, M. Vigilância dos Acidentes por Animais Peçonhentos. **Apostila do Programa de Vigilância dos Acidentes por Animais Peçonhentos da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde**, 2005.

WILLIAMS, P. A.; HELLIER, J. L.; WHITE, A. M.; STALEY, K. J.; DUDEK, F. E. Development of spontaneous seizures after experimental status epilepticus: Implications for understanding epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 48, p. 157-163, 2007.

YATANI, A.; KIRSCH, G. E.; POSSANI, L. D.; BROWN, A. M. Effects of new world scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. 443- 451, 1988.

YE, Z. C.; SONTHEIMER, H. Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. **Neuroreport**, v. 7 p. 2181-2185, 1996.

ZHENG, H.; ZHU, W.; ZHAO, H.; WANG, X.; WANG, W. Kainic acid-activated microglia mediate increased excitability of rat hippocampal neurons in vitro and in vivo: crucial role of interleukin-1beta. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, p. 31-38, 2010.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. S.; SECATTO A.; SORGI, C. A.; BORDON, K. C. F.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon** v. 57, p. 1101-1108, 2011.