



MARCOS HIKARI TOYAMA

**TsTX-V, UMA α -TOXINA DO NOVO MUNDO: ESTRUTURA E
ESTUDO DO EFEITO SOBRE O MECANISMO DE
SECREÇÃO DE INSULINA.**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni.

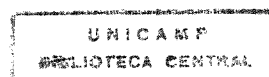
Campinas - São Paulo

1995

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Marcos Hikari Toyama
e aprovada pela Comissão Julgadora.

03
07
95

Sergio Marangoni





Ficha elaborada pela Biblioteca Central
UNICAMP

T668t Toyama, Marcos Hikari
TsTx-V, uma α - toxina do novo mundo : estrutura e estudo do efeito sobre o mecanismo de secreção de insulina / Marcos Hikari Toyama. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Sergio Marangoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neurotoxinas. 2. Escorpião. 3. Insulina. 4. Estrutura molecular. I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	T668t
V.	Ex.
L.º DO B.	25782
PROC.	433195
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/09/95
N.º CPD	

Aos meus pais, que depositaram tantas expectativas e esperanças e tiveram confiança em mim, dedico este trabalho, que espero seja o primeiro de uma série.

A eles meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo estímulo à formação profissional e científica.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, Prof. Livre Docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela confiança depositada e por quem devo minha introdução na atividade de pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina (USP-Ribeirão Preto), pela expressiva e marcante colaboração neste trabalho.

À Profa_a Dra. Eliane Candiane Arantes, do Departamento de Física-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela colaboração no isolamento da TsTX-V por metodologia por ela desenvolvida.

Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (UNICAMP), a quem devemos nossa introdução na atividade de pesquisa.

Ao Prof. José Camillo Novello, Prof. do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio Ari Gonçalves, Prof. do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela colaboração na parte experimental e pelas sugestões dadas neste trabalho.

Ao Prof. Everardo M. Carneiro, pela inestimável ajuda e sugestões na parte experimental do trabalho, realizadas no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia (UNICAMP).

À Profa. Inês Caracelli, do Departamento de Cristalografia do Instituto de Química e Física - USP de São Carlos, pela análise estrutural e filogenética da TsTX-V.

Ao colega Carlos Alberto da Silva, pelo inestimável auxílio na parte experimental realizada com ilhotas de Langerhans

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas e do Departamento de Bioquímica, pela amizade e pela contribuição direta ou indireta para a realização deste trabalho.

<u>ÍNDICE</u>	pág
RESUMO	06
ABSTRACT	08
ABREVIACÕES	10
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
<u>PURIFICAÇÃO DA TsTX-V</u>	19
<u>COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS</u>	19
<u>DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA</u>	20
<u>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA</u>	20
ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS	21
SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA	21
PERMEABILIDADE DE POTÁSSIO EM ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATO	22
EFEITO DA TsTX-V SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DE CÉLULAS β DE ROEDORES.	23
<u>DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA TsTX-V</u>	24
<u>DENDOGRAMA</u>	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	38
BIBLIOGRAFIA	55

RESUMO

As neurotoxinas escorpiônicas têm sido classificadas em duas grandes categorias: as α -toxinas (encontradas em espécies do Velho Mundo) que retardam a inativação dos canais de sódio e as β -toxinas (provenientes de espécies do Novo Mundo), que induzem um estado persistente de despolarização das membranas de células excitáveis (neurônios).

A TsTX-V foi obtida por cromatografia de troca iônica em CM-Cellulose 52 e teve seu grau de pureza confirmado por cromatografia de fase reversa em HPLC e por eletroforese em PAGE-SDS Tricina.

A estrutura primária da TsTX-V foi determinada por degradação automática de Edman, a partir da proteína pura carboximetilada e reduzida e de seus digestos peptídicos obtidos por Tripsina e Protease V8. Sua seqüência, 64 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular, calculada através da somatória dos resíduos, de 7,2 kDa, contendo oito resíduos de cisteína.

Testes eletrofisiológicos realizados em nervo vago de coelho mostraram que a toxina TsTX-V (0,03 μ g/mL) induz um prolongamento do potencial de ação das fibras B do nervo vago devido ao retardo na inativação do canal de Na⁺. A 0,3 μ g/mL ela induz também uma despolarização do nervo. Esses efeitos são irreversíveis e podem ser abolido por tetrodoxina (200 - 500 mM), mas não por um aumento da concentração de potássio no meio externo. Estes resultados demonstraram que TsTX-V é uma α -toxina (Arantes et al., 1994).

Em ilhotas de Langerhans, isoladas de ratos, a TsTX-V (α -toxina) potencializou a secreção de insulina, na ausência ou na presença de 8,3 mM de glicose. A Ts- γ potencializou a secreção de insulina por 8,3 mM de glicose.

A toxina TsTX-V (5,6 μ g/ ml) induziu um aumento do efluxo de ⁸⁶Rb⁺ cerca de 2,0 a 2,4 vezes em relação ao induzido por 8,3 mM de glicose em ilhotas de Langerhans. Este

efeito foi persistente e lentamente reversível. Efeito similar foi observado em presença de (110 μM) de veratridina, substância que retarda a inativação de canais de sódio sensíveis a voltagem. Estes dados sugerem que a toxina TsTX-V prolonga o período de despolarização das células B, ativando indiretamente os canais de K^+ dependente de voltagem, mantendo, desta forma, a permeabilidade da membrana ao K^+ , medida indiretamente pelo efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$, manteve-se elevada..

A estrutura tridimensional da toxina TsTX-V foi determinada através de modelagem molecular, utilizando-se para isso os dados cristalográficos da toxina CsE-V3, cujas coordenadas estão depositadas em banco de dados, e da toxina AaH II. De um modo geral, ela tem as feições típicas das neurotoxinas de escorpiões, como a formação em α -hélice e as três folhas β antiparalelas, mas diferindo quanto à disposição das alças J e B, e da região N-terminal e Carboxi terminal, quando comparados com a toxina do *Androctonus australis* Hector (AaH II).

O dendograma obtido através das similaridades e coincidências de resíduos e do alinhamento das estruturas secundárias, mostra que as toxinas do Novo Mundo podem ser subdivididas em três subgrupos: duas β e uma α .

ABSTRACT

Antimamals scorpion neurotoxins are classified in two groups: α -toxins (from the Old World species) that induce a slowing down of the inactivation of the sodium channel, and β -toxins (from the New World species), that induce a persistent depolarization of excitable cell membranes.

TsTX-V was obtained by ion-exchange chromatography on CM-Cellulose 52 and its degree of purity was confirmed by reverse phase chromatography and Tricine SDS-PAGE.

Primary structure of TsTX-V has been determined by automatic Edman degradation from the reduced and carboxymethylated protein and digestic peptide obtained by Protease V8 and Tripsin. Its sequence shows, a total of 64 aminoacid residues, a calculated molecular weight of 7200, and eight cysteine residues

Electrophysiological assay performed on the vagus nerve of rabbit, showed that TsTX-V (0,03 $\mu\text{g/mL}$) induce a persistent depolarized state during long time on B fibers, this effect was abolished by addition of tetrodotoxin (200 - 500 nM) but not abolished by high external potassium depolarization. Those effects characterized TsTX-V as α -toxins. (Arantes et al, 1994)

On isolated rat islets of Langerhans TsTX-V induced insulin secretion in both absence or presence of glucose (8,3 mM) presence of glucose 8,3 mM, but in absence any effect was observed. However, Ts γ (β toxin) potentiated insulin secretion in the presence of glucose 8,3 mM.

TsTX-V (5,6 $\mu\text{g/mL}$) induced a $^{86}\text{Rb}^+$ outflow increase, 2,0~2,4 fold the rate of the marker outflow in the presence of 8,3 mM glucose. This effect was persistent and slowly reversible, showing similarity to that induced by 100 mM veratridine, an agent that prolong the open period of Na^+ channel, delaying their inactivation. This suggested that, by

extending the depolarized period, TsTX-V indirectly affect β cells voltage dependent K^+ channels, thus increasing K^+ permeability.

Homology studies performed with TsTX-V and other scorpion neurotoxins revealed common folding among them, for example the presence of highly conserved regions and residues and the presence of eight cysteine residues at same locations.

The three-dimensional structure of TsTX-V was determined by modeling from crystallographic determined structure of CsE-V3 and AaH II. TsTX-V has conserved α and β structure present in other scorpion neurotoxins. Basically its three-dimensional structure is similar to CsE-V3 and AaH II, but differs in the folding patterns in the J and B loops.

Computer simulation performed on the three-dimensional structure obtained by molecular modeling, shows that the C-terminal and N-terminal loops have a great degree of freedom. On the other hand J and B loops did not show great differences in its leght spatial disposition whem compared with atoxic fraction TsTX-VI or Ts- γ (β toxins)

LISTA DE ABREVIACÕES

TsTX, TSTX, Ts	Toxina de <i>Tityus serrulatus</i>
AaH	Toxina de <i>Androctonus australis</i> Hector
Amm	Toxina de <i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>
Lqq	Toxina de <i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>
Bot, BOT	Toxina de <i>Buthus occitanus tunetanus</i>
Bem, BEM	Toxina de <i>Buthus epeus</i>
Bom	Toxina de <i>Buthus occitanus mauretanicus</i>
BM	Toxina de <i>Buthus martensis</i>
CsE	Toxina de <i>Centruroides sculpturatus</i> Ewing
Css	Toxina de <i>Centruroides suffusus suffusus</i>
Cn	Toxina de <i>Centruroides noxis</i>
Clit	Toxina de <i>Centruroides limpidua tecomanus</i>
TsIV-5, TsIV-V	Toxina 5 de <i>T.serrulatus</i>
CM-Cellulose 52	Carboximetil celulose - 52
DL50	Dose Letal 50%
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
β , β -toxinas	Betha toxinas escorpiônicas
α , α -toxinas	Alpha toxinas escorpiônicas

INTRODUÇÃO

Os escorpiões são os mais antigos habitantes do planeta, hoje encontrados. Existem há mais de quatrocentos milhões de anos, um período em que surgiram e desapareceram muitos animais. A análise dos fósseis mais antigos datados do Siluriano (425 - 450 milhões de anos) mostra que os escorpiões possuíam uma vida aquática ou anfíbia devido à presença de brânquias e membros natatórios, que foram perdidos ao conquistarem o ambiente terrestre ao final do Devoniano ou no início do Carbonífero (325 - 350 milhões de anos). As brânquias foram substituídas por pulmões e os membros natatórios pelos de locomoção terrestre. (Polis, 1990).

Durante este último período, os escorpiões sofreram poucas mudanças estruturais ou mesmo de hábito, permanecendo suas características semelhantes às daquelas espécies do Siluriano, do mesmo modo que só existem pequenas diferenças morfológicas entre as 1500 espécies e sub-espécies existentes. Foram o primeiro grupo de artrópodos a dominar a terra e se adaptaram aos mais diferentes habitats com uma enorme plasticidade comportamental e fisiológica (Kjellesvig-Warieng, 1972; Polis, 1990.).

Principalmente, por causa de suas oito patas, os escorpiões são classificados como aracnídeos, embora seja difícil estabelecer seu parentesco com as aranhas ou com os outros aracnídeos e mesmo entre os próprios escorpiões. Embora bem estudados, em nível taxonômico é muito difícil estabelecer relações filogenéticas entre os diversos grupos que compõem a ordem Scorpiones, que é composta por 9 famílias, das quais a maior e mais dissiminada é a Buthidae. Os butídeos compreendem 48 gêneros e mais de 500 espécies, sendo que 25 delas podem provocar graves acidentes escorpiônicos ou mesmo a morte (Barnes, 1987).

Embora os escorpiões sejam sempre associados às regiões secas e quentes, seu habitat é muito variado, ocorrendo em praticamente todos os ecossistemas terrestres, como desertos, savanas, florestas temperadas, tropicais e equatoriais e montanhosas. Podem ser encontrados nos Alpes, nos Montes Atlas e nos antiplanos Andinos e até em cavernas cuja profundidade pode chegar a 800 metros.

Apresentam um grau variado de adaptações; como as espécies de altas altitudes que possuem a hemolinfa com ponto de congelamento baixo, as espécies subterrâneas com perda completa da visão (Francke, 1979), mas são as espécies desérticas que possuem um grau variado de adaptações fisiológica, morfológicas e comportamentais para sobreviver em ambientes secos e de alta temperatura. Estas espécies cavam galerias subterrâneas de até meio metro de profundidade, escondem-se em buracos ou fendas, com predomínio da atividade noturna, redução da taxa metabólica e reaproveitamento de excretas, como os compostos nitrogenados. (Polis, 1990).

A dieta é extremamente variada, mas é determinada por alguns fatores como tamanho, odor e o tipo de exoesqueleto (Vachon, 1953; Barnes, 1987). Apesar de serem caçadores natos, os escorpiões possuem vários predadores naturais como sapos, pererecas, lagartos, corujas e até mesmo galinhas e macacos, e também são vítimas de vários microorganismos, tais como vírus, riquesia e fungos (Mccornick e Polis, 1990).

No Brasil existem 5 gêneros de butídeos dos quais o mais importante é o *Tityus*, abrangendo cerca de 60 espécies. Dentre estas destacam-se 5 que são responsáveis pela maioria dos casos de escorpionismo no Brasil (Bucherl, 1979; Sissom, 1990).

T. serrulatus é encontrado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro.

T. bahiensis ocorre desde a Bahia até Santa Catarina e Mato Grosso do Sul.

T. stigmurus é encontrado predominantemente no Nordeste, principalmente nos estados da Paraíba e Pernambuco.

T. trivitatus é encontrado no Brasil Central, Piauí, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

T. cambridgei ocorre na região amazônica.

No Brasil, a incidência de acidentes escorpiônicos é alta e, segundo o Ministério da Saúde, foram registrados, no período de 1988 a 1989: 444 acidentes ocasionados pelo *T. serrulatus*, 663 casos pelo *T. bahiensis*, 1 caso pelo *T. stigmurus*, 2 pelo *T. trivitatus* e 6.428 casos por espécies não identificadas. Do total de acidentes, foram registrados 72 óbitos (0,95%), que ocorreram, na maioria, nas regiões Sudeste e Nordeste e a faixa etária mais afetada foi até 14 anos (Ministério da Saúde, 1991).

Do ponto de vista clínico, a dor discreta ou aguda é a principal sintomatologia apresentada por pessoas acometidas por picadas de escorpiões. Os pacientes, principalmente crianças, podem ser acometidos por intensa agitação psicomotora, tremores. Dentre as manifestações gastro-intestinais, são observados com frequência náuseas, vômitos e diarreia associados a dores abdominais e cólicas. As manifestações respiratórias mais comuns tosse são espirros, taquipnéia.

A ação de neurotoxinas sobre o sistema nervoso autônomo (SNA), divisão simpática e parassimpática pode levar entre outras coisas a liberação de grandes quantidades de neurotransmissores (Magalhães, 1946). Portanto o quadro clínico mostrado acima é decorrente dos efeitos dos neurotransmissores liberados em quase todo o organismo. De um modo geral o tratamento anti-escorpiônico visa.

Aliviar os sintomas que provocam maiores incômodos ou mal-estar aos pacientes, pela administração de analgésicos, anestésicos e de drogas como a atropina e ergotoxina para de certa forma amortecer os efeitos da ativação do SNA, provocados pelo veneno. Durante o tratamento, as condições vitais dos pacientes são monitoradas principalmente

para evitar a falência cardíaca ou outras complicações clínico patológicas importantes, como, por exemplo, o edema. A soroterapia é indicada para acidentes graves de escorpionismo, sendo administrada via endovenosa.

As principais ações farmacológicas dos venenos de escorpiões foram revistas por Freire-Maia (1990):

Liberação de Acetilcolina: O veneno total de *T. serrulatus* induz a liberação de acetilcolina nas terminações nervosas do SNA. A ação de toxinas na liberação de acetilcolina nas terminações nervosas foi demonstrada, experimentalmente, em preparações "in vitro" por vários autores (Ramos e Corrado, 1954; Diniz e Gonçalves; 1956, Diniz e Torres, 1968 e Diniz; Corrado, 1975, Gomez et al., 1973; Böhn et al., 1974)

Liberação de Catecolaminas : O veneno total induz também a liberação de catecolaminas pelas células da medula adrenal (Ramos e Corrado, 1954, Corrado et al., 1968, 1975)

As demais ações farmacológicas do veneno (aumento de angiotensina, inibição da secreção de insulina, bradicardia, taquicardia, edema pulmonar) são decorrentes direta ou indiretamente da ação de neurotransmissores liberados, induzidos pela ação de neurotoxinas presentes no veneno total.

Peptídeos com atividade tóxica proveniente do veneno de origem animal, de microorganismos ou vegetal têm sido largamente utilizados no estudo dos mecanismos de ação e dos processos metabólicos pois interagem especificamente com receptores, inibindo ou estimulando várias funções celulares, sendo, portanto, ferramentas moleculares valiosas. Como exemplo, pode-se citar a importância das neurotoxinas do veneno de escorpião na investigação dos canais iônicos. Desde 1952, quando os canais de sódio foram primeiramente descritos por Hodgkin e Huxley, as neurotoxinas têm contribuído para o

desenvolvimento de metodologia para o isolamento, a caracterização e a determinação de um modelo de estrutura molecular dos canais (Vassilev et al., 1989).

Por meio dessas neurotoxinas determinou-se a existência de quatro sítios receptores distintos nos canais de sódio (Catterall, 1984). Ao sítio 1, ligam-se as neurotoxinas guanidínicas solúveis em água (Tetrodoxina e Saxitoxina), que inibem o transporte iônico do canal de sódio. Ao sítio 2, ligam-se várias toxinas lipossolúveis (Graynotoxina, Veratridina, Aconitina e Batracotoxina), que causam a ativação persistente do canal de sódio no potencial de repouso da membrana, por bloquear a inativação da corrente de sódio e alterar a dependência de voltagem para potenciais de membrana mais negativos. As α -toxinas escorpiônicas e da anêmona do mar ligam-se ao sítio 3, causando o retardo ou bloqueio da inativação dos canais de sódio. E as β -toxinas ligam-se ao sítio 4, alterando principalmente a dependência de voltagem da ativação dos canais de sódio.

As toxinas escorpiônicas figuram entre as mais versáteis e biologicamente importantes ferramentas moleculares no estudo neurofisiológico. As neurotoxinas escorpiônicas, pode ser classificadas em: neurotoxinas anti-crustáceo, anti-inseto e anti-mamífero. As toxinas anti-inseto podem ser divididas em dois grupos de toxinas distintas farmacologicamente: as indutoras de contração (excitatórias) e as inibidoras da contração (depressoras) (Zlotkin, 1987).

As neurotoxinas anti-mamífero são classificadas em duas classes: as α -toxinas escorpiônicas e as β -toxinas escorpiônicas, dependendo do sítio de ligação destas neurotoxinas nos canais de sódio presentes no sinaptossoma de cérebro de ratos. As α -toxinas interagem com os sítios específicos do canal de sódio e os mantêm abertos, retardando desta forma a inativação do canal (Couraud et al., 1982). Já as β -toxinas ligam-se a outro sítio do canal de sódio e promovem um deslocamento para valores mais

negativos, do limiar do potencial de ação, levando as células a uma condição de hiperpolarização (Wheeler et al., 1983).

As α -toxinas tem sido isoladas de venenos de escorpiões do Norte da África e Europa Meridional, enquanto que as toxinas β , de espécies da América do Norte e do Sul (Loret et al., 1991). Todavia o veneno total de *Tityus serrulatus* contém ambas as classes de neurotoxinas (Barhanin et al., 1982), embora não se saiba se isso também ocorre em outras espécies do gênero *Tityus* (Borges et al., 1990).

As toxinas escorpiônicas também podem atuar em outros tecidos, além das células nervosas. Waterman (1938) e Bartholomew et al. (1975) descreveram aumento da secreção pancreática associada à ação do veneno total. Machado e Silveira (1976/1977), mostraram que doses sub-letais de veneno total podem induzir pancreatite aguda em cães. Possani et al., (1991), estudando a ação da toxina Ts IV-5 do escorpião *T. serrulatus* sobre a liberação de zimogênio pelo pâncreas exócrino, mostraram que a neurotoxina atuava diretamente sobre as células, tendo efeito tóxico quando em altas concentrações.

As neurotoxinas interagem com os canais iônicos, principalmente os de sódio dependente de voltagem, podendo causar despolarização persistente em nervos, e provocar a liberação de neurotransmissores (Couraud, et al., 1982 e Wheeler et al., 1983).

A primeira tentativa de se correlacionar a atividade biológica destas toxinas com sua estrutura foi realizada por Fontecilla-Camps et al., (1980) que determinaram a primeira estrutura cristalográfica de uma neurotoxina (CsE-V3).

A seqüência de aminoácidos de várias neurotoxinas conhecidas mostram vários aspectos em comum, incluindo o mesmo número de oito meias cistinas, similaridade na disposição das pontes de dissulfeto e a localização de vários resíduos invariáveis ou conservados. As neurotoxinas escorpiônicas são polipeptídeos que possuem um segmento

em α -hélice com duas voltas e meia e três segmentos em estrutura β antiparalelas, que ocorrem paralelamente à região de α -hélice.

Através de estudos de homologia seqüencial, correlacionando a atividade de várias neurotoxinas α e β com suas estruturas primária e terciária, foram reconhecidos as alças B e J, as quais foram propostas como responsáveis pela atividade biológica das neurotoxinas α e β (Meves et al., 1984; Fontecilla-Camps, 1988).

Sabe-se que todas as neurotoxinas possuem aspectos comuns em relação a sua estrutura e modo de ação; porém, visto que a grande maioria dos trabalhos relacionados ao veneno de escorpião está relacionada à sua ação sobre os sistemas nervosos, muito pouco se sabe sobre o efeito destas toxinas em outros tecidos.

OBJETIVOS

Arantes et al. (1994) isolou a TsTX-V e verificou que sua atividade farmacológica era do tipo α em nervos vago de coelho. Marangoni et al. (1994) determinaram a estrutura primária da TsTX-V e verificaram que esta toxina tem um alto grau de homologia com as toxinas α do velho Mundo. Gonçalves et al., (1994) verificaram que a TsTX-V é capaz de potencializar a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas, na presença de glicose 8,3 mM. Aschroft and Rosman (1989) verificaram que os canais de sódio voltagem dependente estão presentes nas células B em pequeno número, sendo sua função ainda não esclarecida.

O presente trabalho tem como objetivos:

- Verificar qual é o mecanismo de ação envolvido na secreção de insulina em células B de ilhotas de Langerhans, através do estudo do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$.
- Comparar, através do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$, em ilhotas, o efeito da toxinas TsTX-V com outras neurotoxinas que caracteristicamente atuem em canais Na^+ como a veratridina.
- Analisar o efeito da toxina TsTX-V sobre a atividade elétrica em células B.
- Determinar a filogenia da toxina TsTX-V em relação a outras toxinas conhecidas do Novo e Velho Mundo.
- Determinar a estrutura tridimensional da toxina TsTX-V por modelagem molecular a partir de dados cristalográficos de proteínas escorpiónicas já descritos em literatura, como as toxinas AaHII e CsE V3.

MATERIAIS E MÉTODOS

PURIFICAÇÃO DA TsTX-V

A purificação da TsTX-V foi realizado em colaboração com o Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

O veneno bruto foi purificado em duas etapas de cromatografia de troca iônica em CM-Cellulose 52, de acordo com o método descrito por Arantes et al. (1989, 1994). Para cada etapa de purificação, foram realizados testes de toxicidade e de DL₅₀, cujos valores e respectivos intervalos de confiança ($p = 0,05$) foram calculados segundo o método de próbitos (Finney, 1952) e o controle do grau de pureza de cada uma das frações obtidas foi realizado segundo o método do gel ácido, descrito por Reisfield et al. (1962).

A TsTX-V teve seu grau de pureza confirmado por HPLC de fase reversa segundo método descrito por Marangoni et al. (1990) e por eletroforese em PAGE-TRICINA para a detecção de proteínas de baixo peso molecular, segundo método descrito por Schanger & Jagow (1987).

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS

A composição de aminoácidos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Heirikson e Meredith (1984). Um nmol da TsTX-V purificada foi hidrolizada durante 24 h, a 106°C com HCl 6 N, sendo posteriormente seca a vácuo e derivatizada. Após o tempo requerido pela derivatização, a amostra foi seca a vácuo para completa remoção do fenilisotiocianato. Obtivemos os feniltiocarbamil aminoácidos, que foram analisados no sistema PICO-TAG de análise de aminoácidos (Water system).

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA

A determinação da estrutura primária da TsTX-V foi realizada em duas etapas e o seqüenciamento executado de acordo com o descrito por Marangoni et al. (1990). Para a degradação automática de Edman (Edman e Begg, 1967), foi usado o seqüenciador (gás-líquido) automático, modelo 477A (Applied Biosystem Sequencer), e a identificação dos feniltiohidantoina aminoácidos foi realizado em um analisador de aminoácidos (120A PTH Aminoacid Analyzer).

A proteína foi inicialmente reduzida e carboximetilada (RC-TsTX-V). Na primeira etapa foi determinada a seqüência N-terminal. Na segunda, duas amostras de RC-TsTX-V (1 mg) foram digeridas, uma com a protease V8 de *Staphylococcus aureus* e a outra com tripsina, e purificados no sistema HPLC de fase reversa (Waters 991 - PDA system). A repurificação dos picos, quando necessária, ocorreu em um gradiente descontínuo de concentração no intervalo do gradiente de saída dos picos de interesse. Os peptídeos obtidos, tanto na purificação, quanto na repurificação foram seqüenciados e, a partir da sobreposição dos resíduos coincidentes, determinou-se a estrutura primária da TsTX-V.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

A secreção estática de insulina, a permeabilidade de potássio em ilhotas de Langerhans e a atividade elétrica foram realizadas em colaboração com os Laboratório de Endocrinologia e Eletrofisiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

ISOLAMENTO DE ILHOTAS DE RATOS POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA.

Ilhotas de Langerhans foram isoladas de ratos de 3 a 4 meses, machos, (Wistar, procedentes do Biotério Central da UNICAMP). Os ratos foram sacrificados por decapitação e após uma incisão abdominal foi inserido uma cânula ligada a seringa para injetar 8,0 ml de solução de Hanks contendo collagenase, provocando o entumescimento do pâncreas e iniciando a digestão. O pâncreas foi retirado para remover restos de gordura, tecido vascular, gânglios linfáticos. A seguir, o pâncreas foi cortado em pequenos pedaços, transferidos, para um tubo e a digestão prosseguiu, sob agitação constante a 37°C, até ser obtida uma mistura de viscosidade homogênea.

Esta mistura foi transferida para um bequer contendo solução de Hanks com 0,5% de albumina bovina. Após sucessivas lavagens e sedimentação com solução de Hanks (com 0,5 % de albumina sérica bovina), as ilhotas foram separadas dos detritos e coletadas individualmente sob lupa.

SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA

Para medir a secreção de insulina, grupos de 5 ilhotas de Langerhans foram transferidos para cada reservatório da placa de cultura com 1,0 mL de solução de incubação (solução de Krebs), suplementada com 0,5% de albumina bovina. A seguir, as placas cobertas foram colocadas em banho-maria a 37 °C, gaseado com carbogênio (95%O₂, 5%CO₂).

A seguir, grupos de 5 ilhotas foram incubados durante 60 minutos em 1,0 ml de Krebs na ausência e na presença de glicose (8,3 mM), sendo o meio de incubação alterado: pela introdução de glicose e / ou do veneno total do escorpião *T.serrulatus* (5,6 µg/ml), e/ou com

(5,6 $\mu\text{g/mL}$) das neurotoxinas α (TsTX-V) ou β (Ts- γ). A insulina foi quantificada através de radioimunoensaio conforme Scott et al.(1981).

PERMEABILIDADE DE POTÁSSIO EM ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATO

Para estudar a permeabilidade de potássio foi empregado o isótopo $^{86}\text{Rb}^+$, que é normalmente utilizado em lugar do isótopo do potássio, cuja meia vida é menor (Sehlin e Taljedal, 1975), sendo a permeabilidade de ambos muito semelhante (Boschero & Malaisse, 1977). Dois grupos de 150 a 180 ilhotas foram incubada durante 90 min., a 37°C , pH 7,4 em 200 μL de solução de Krebs (NaCl, 120 mM; KCl 5mM; NaHCO_3 2,5mM; CaCl_2 2,5mM e MgCl 1,1mM).contendo $^{86}\text{Rb}^+$ (80 $\mu\text{Ci/ml}$). Ao fim deste período, as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de incubação não radioativa, transferidas para a câmara de perfusão e perfundidas com uma solução de Krebs

Após um período de equilíbrio de 20 minutos foi iniciado a coleta do efluente em frascos de cintilação , a intervalos de 1 min.até o final do experimento. A toxina (TsTX-V) bem com a veratridina foram adicionadas ao meio de incubação aos 40 minutos, sendo retiradas aos 60 minutos do experimento, restabelecendo as condições iniciais de incubação.

Ao final da perfusão (80 $^\circ$ min), as ilhotas foram transferidas para frascos de cintilação. Em cada frasco foi adicionado 5 mL de água para leitura, da radioatividade dos frascos que foi avaliada em contador beta de cintilação líquida (Beckman LS 6000TA). O valor da radiação beta (CPM) foi expresso como taxa de efluxo (%/min).

EFEITO DA T_sTX-V SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DE CÉLULAS B DE ROEDORES

A atividade elétrica de células B foi registrado em ilhotas de Langerhans microdissecadas de pâncreas de camundongos albinos (Swiss) de 2 a 3 meses de idade.

Os camundongos foram sacrificados e o pâncreas foi retirado e fixado a uma placa de Petri revestida com cera contendo solução de Krebs. Sob lupa, uma ilhota foi removida e transferida para a câmara de perfusão e fixada pela porção exócrina ao fundo da mesma, por meio de agulhas de aço.

O potencial de membrana foi medido entre dois eletrodos, um colocado na solução que banha a ilhota (eletrodo de referência) e o outro estabelecendo contato elétrico com o interior da célula B (eletrodo intracelular). O eletrodo intracelular tinha uma resistência entre 180 a 200 M Ω e foi constituído de uma micropipeta com uma ponta de diâmetro de aproximadamente 0,5 μ m, preenchida com uma solução de 3M de citrato de potássio e 3M de cloreto de potássio (1:1, v/v). O contato elétrico com o amplificador (impedância de 10¹⁴ Ω) foi estabelecido por meio de um fio de prata recoberto de cloreto de prata inserido na micropipeta.

O reconhecimento da célula B foi realizado pelo aparecimento (no osciloscópio ou em registrador potenciométrico) da atividade elétrica característica em presença de 11 mM de glicose, observada logo após a penetração da micropipeta em uma célula no interior da ilhota. Uma vez reconhecida a célula B, a experimentação foi iniciada após um período de estabilização do potencial de membrana (5 a 10 minutos).

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA TsTX-V

A determinação da estrutura tridimensional foi realizado em colaboração com o Departamento de Cristalografia do Instituto de Química e Física da USP de São Carlos.

A seqüência da TsTX-V foi primeiramente alinhada, com as seqüências da CsE-V3 e da AaH II e, posteriormente, com outras 30 toxinas de escorpiões conhecidas, mantendo-se o máximo possível de identidade e introduzindo o mínimo possível de inserções ou deleções através do programa MULTALIGN do sistema AMPS. O modelo tridimensional da TsTX-V baseou-se nos dados cristalográficos da variantes 3 de *Centruroides sculpturatus* e da toxina II de *Androcutonus australis*, que foram compilados em uma estação gráfica (SILICON GRAPHIC) e modelados pelos programas WHATIF, TOM e INSIGHT II. As regiões conservadas das três moléculas foram mantidas e as estruturas variáveis (loops) foram construídas usando-se principalmente o DG loop do programa TOM. O modelo obtido foi avalizado por meio de três programas: CROMOS do WHATIF e DISCOVER do INSIGHT para minimização da estrutura; QUALITY do WHATIF para avaliar a estrutura tridimensional, pela análise dos contatos atômicos das cadeias laterais e pelo posicionamento dos rotâmeros e PROCHEC para a avaliação dos parâmetros estereoquímicos.

DENDOGRAMA

Para o alinhamento das 30 toxinas escorpiônicas, obtidas dos bancos de dados, foi usado o programa MULTALIGN, que manteve o máximo possível de identidade entre elas, introduzindo desse modo o mínimo de inserções ou deleções. Uma vez obtido o alinhamento, o programa NEIGBOR JOINING do NEIGHBOR calculou o melhor dendograma.

RESULTADOS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TOXINA TsTX-V

A TsTX-V foi purificada em duas cromatografias de troca iônica em CM-Cellulose: a primeira usou um gradiente convexo de concentração de NH_4HCO_3 (0,01 - 1,0 M), em que se obteve a fração XI, que foi posteriormente repurificada em gradiente descontínuo de concentração, sendo isolada a TsTX-V (Arantes et al., 1994) (Fig 1A e B)

O grau de pureza da TsTX-V foi confirmado por dois métodos: um por HPLC de Fase Reversa, o qual mostrou somente um único pico de eluição e outro PAGE-SDS-TRICINA, que evidenciou a presença de uma única banda proteica, de massa molecular igual a 7,5 kDa (Marangoni et al., 1994) (Fig 1C).

A análise de aminoácidos mostrou que a TsTX-V apresenta valores elevados para AsX (10), Lys (8), Tyr (6) e Gly (6) e a presença de oito meias-cistinas, indicando a provável presença de 4 pontes de dissulfeto, comparadas com outras toxinas conhecidas como a AaH II e CsE V3.

Depois de realizada a análise de aminoácidos, a neurotoxina TsTX-V foi submetida à digestão enzimática com SV8 e tripsina. A partir da sobreposição dos digestos seqüenciados, foi possível determinar a ordem dos aminoácidos na estrutura primária da proteína (Marangoni et al., 1994) (Fig 2).

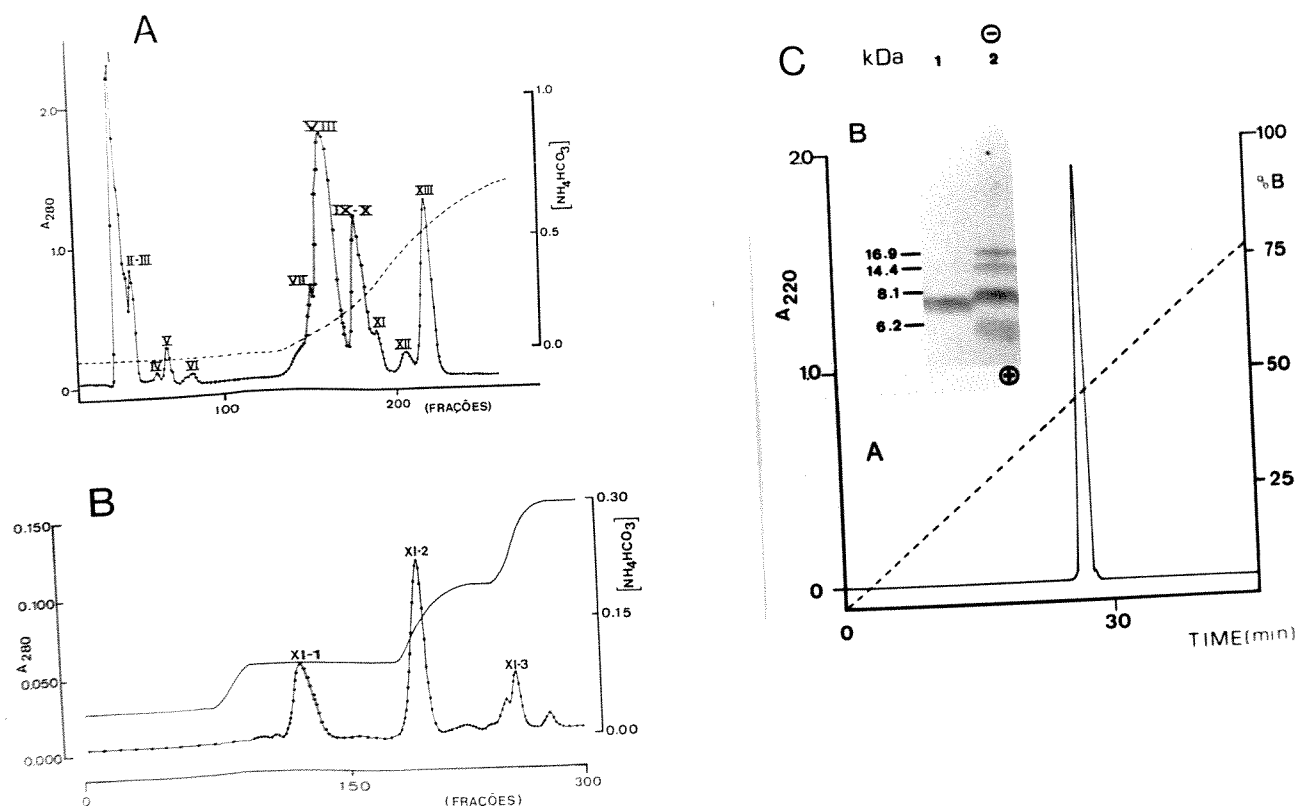


Figura 1. A) Cromatografia em CM-Cellulose-52 de 400 mg do veneno total de *Tityus serrulatus* em uma coluna (2,4 X 63 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 7,8, com gradiente convexo de concentração de 0,01M a 1,0 M, com fluxo de 25 ml/h, coletadas frações de 3,0 ml/tubo. 1B) Desdobramento da fração XI em uma coluna (2,4 X 63 cm) de CM-Cellulose-52, com gradiente convexo descontínuo de concentração. Recromatografia de fase reversa em HPLC da TsTX-V foi realizada em uma coluna analítica μ -Bondapack C18 (0,39 X 30 cm). C-A) Corrida cromatográfica foi monitorada a 220 nm, usando um gradiente linear de acetonitrila em 0,1% TFA, pH 2,5. C-B) PAGE-SDS Tricina da TsTX-V em um gel de 16,5% de acrilamida, pH 8,45. Linha 1: TsTX-V depois da repurificação em HPLC; linha 2: marcadores de peso molecular. A eletroforese foi realizada durante duas horas a 100 V.

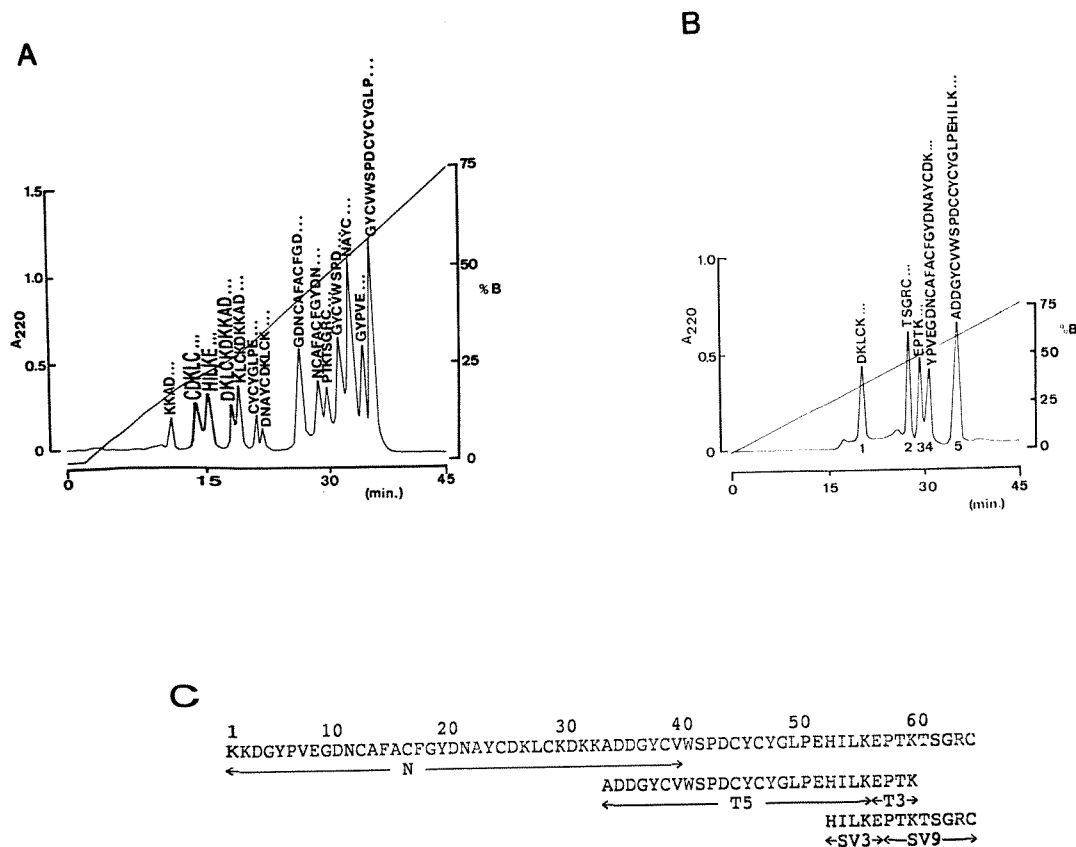


Figura 2. 2A) Purificação dos peptídeos obtidos por digestão com protease V8, realizada por cromatografia de fase reversa em HPLC, usando-se uma coluna μ -Bondapack C18 analítica (0,39 X 30 cm). A eluição das frações foi realizada com um gradiente linear de concentração de 0 a 66% de acetonitrila, o fluxo usado foi de 1 ml/min e a corrida cromatográfica monitorada a 220 nm. 2B) Purificação dos peptídeos tripticos da toxina TsTX-V por HPLC, nas mesmas condições da purificação com protease V8. 2C) Alinhamento dos primeiros 39 resíduos N-terminal, que foram determinados por seqüenciamento direto da proteína reduzida e carboximetilada; com os digestos peptídicos de tripsina (T) e protease V8 (SV).

SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA

A figura 3 mostra os efeitos do veneno total de *Tityus serrulatus*, bem como, das suas frações (α e β) sobre a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de ratos. A toxina α estimulou a secreção de insulina na ausência de glicose ($3,6 \pm 0,23$ ng/ml/ilhota; $n=21$ vs $1,5 \pm 0,15$ ng/ml/ilhota, $n=10$, $p < 0,05$) e potencializou a secreção induzida por 8,3 mM de glicose ($6,88 \pm 0,60$ ng/ml/ilhota; $n=14$ vs $4,49 \pm 0,66$ ng/ml/ilhota, $n=10$, $p < 0,05$). Por outro lado a toxina β somente potencializou a secreção na presença de 8,3 mM de glicose ($2,71 \pm 0,23$ ng/ml/ilhota; $n=16$ vs $1,82 \pm 0,4$ ng/ml/ilhota; $n=7$, $p < 0,05$). Contudo, o veneno total, que contém ambas frações inibiu a secreção de insulina induzida pela glicose.

EFLUXO DE $^{86}\text{Rb}^+$ EM ILHOTAS DE LANGERHANS

As ilhotas de Langerhans isoladas de rato apresentaram elevado efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ quando perfundidas na ausência de glicose (fig. 4) em virtude dos canais de K^+ sensíveis ao ATP estarem abertos (Atwater et al., 1989). Quando a glicose é adicionada ao meio, aumenta a razão ATP/ADP e estes canais se fecham após o ATP ligar-se ao canal (Atwater et al., 1989 e Ashcroft e Rorsman, 1989). Após adição da TsTX-V ($4,4 \mu\text{g/ml}$) na ausência de glicose houve um aumento transiente do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$. Todavia, na presença de glicose (8,3 mM), $5,6 \mu\text{g/mL}$ provocou um aumento do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de 2,0 a 2,4 vezes, o qual persistiu durante todo o período experimental (Fig. 4). O efluxo retornou aos níveis de controle após o retorno à solução perfusora sem a toxina.

A mudança induzida pela TsTX-V no efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas de Langerhans foi similar à induzida pela veratridina (Fig 5), um alcaloide que retarda a inativação dos canais de Na^+ (Barnes e Hille, 1988). O efeito da veratridina foi transiente na ausência de glicose,

mas induziu um aumento do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ na presença de glicose 8,3 mM, um efeito persistente.

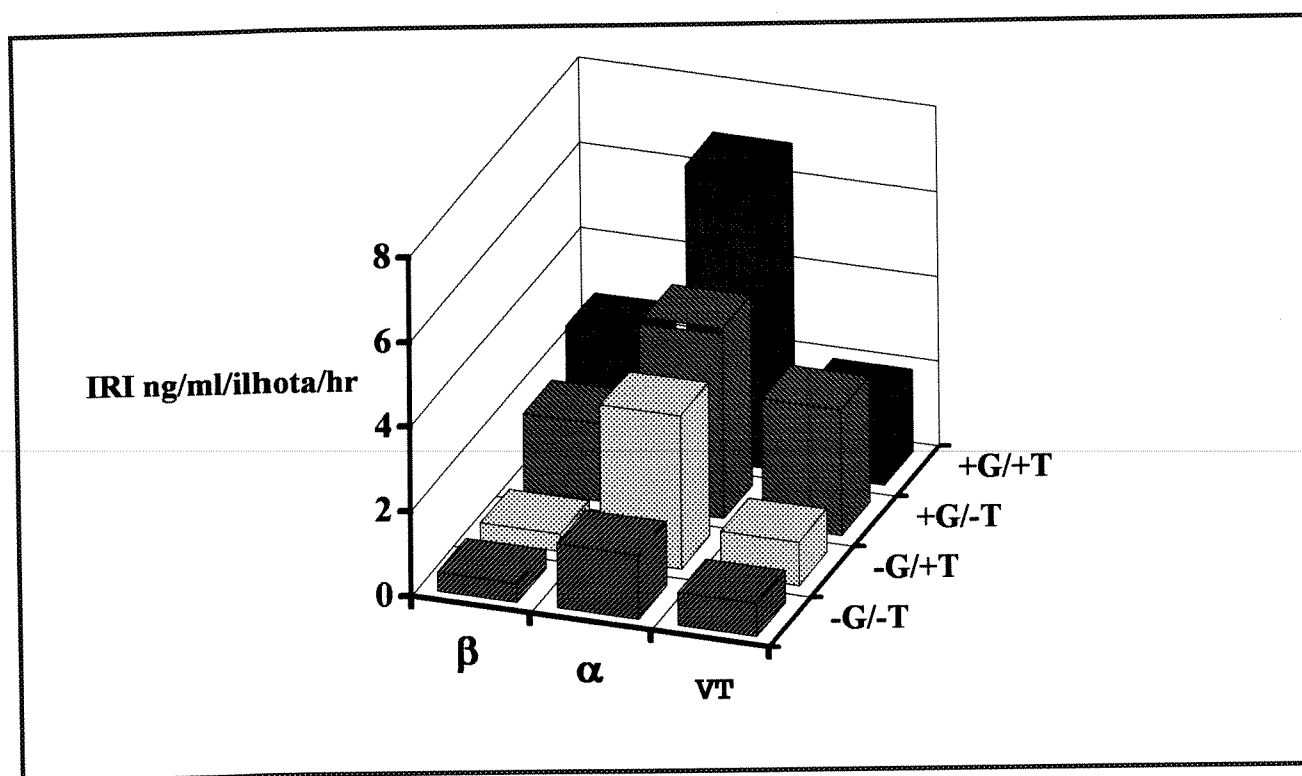


Figura 3. Secreção de insulina estática (IRI). As ilhotas de Langerhans foram incubadas durante 60 minutos nas seguintes condições experimentais: na ausência de glicose e de toxina (controle)(-G/-T); na ausência de glicose e presença da toxina (-G/+T); na presença de glicose 8,3 mM e ausência de toxina (+G/-T) e na presença tanto da glicose como da toxina (α = Toxina α ; β = toxina β e V T = veneno total de *Tityus serrulatus*).

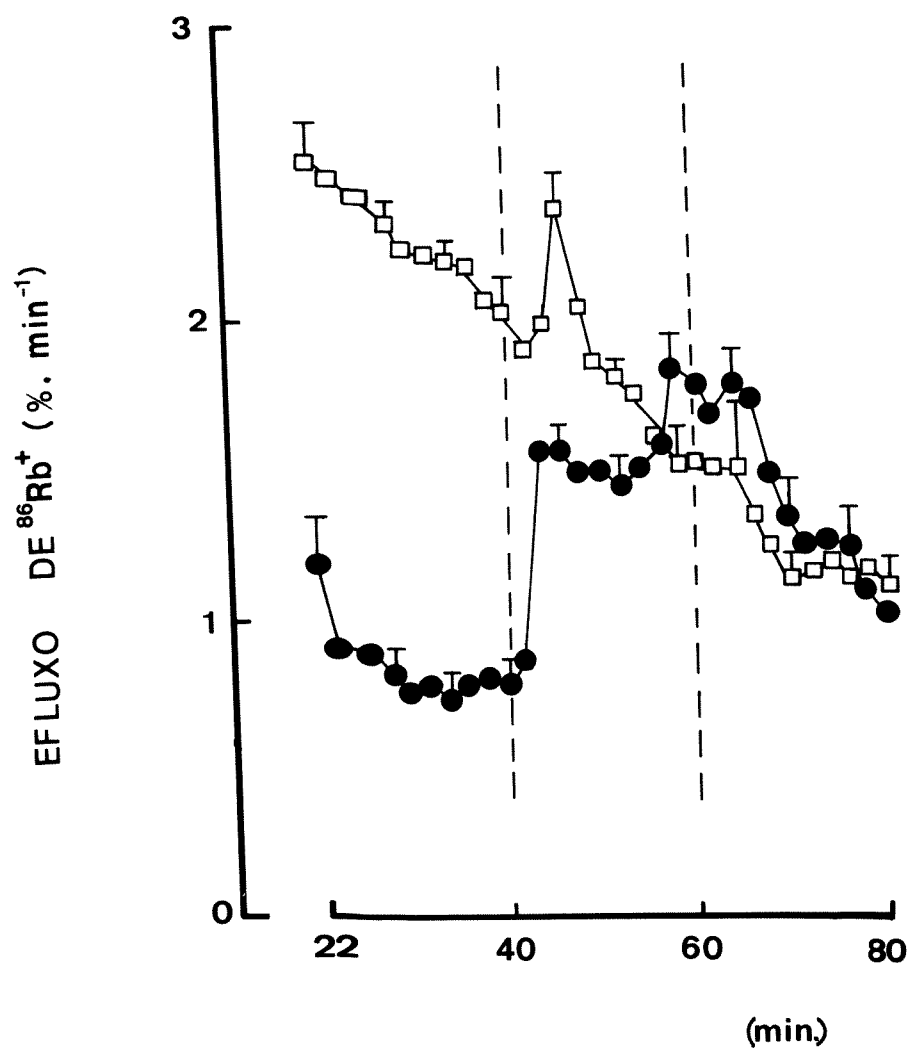


Figura 4. Alterações do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ induzidas pela toxina TsTX-V em ilhotas de Langerhans isoladas de rato. As ilhotas foram mantidas nas câmaras de perfusão por 20 minutos antes do início da coleta. TsTX-V ($5,6 \mu\text{g/ml}$) foi adicionada à solução de perfusão entre os 40^o e 60^o minutos (linhas verticais) na ausência (□ — □) ou na presença (● — ●) de 8,3 mM de glicose.

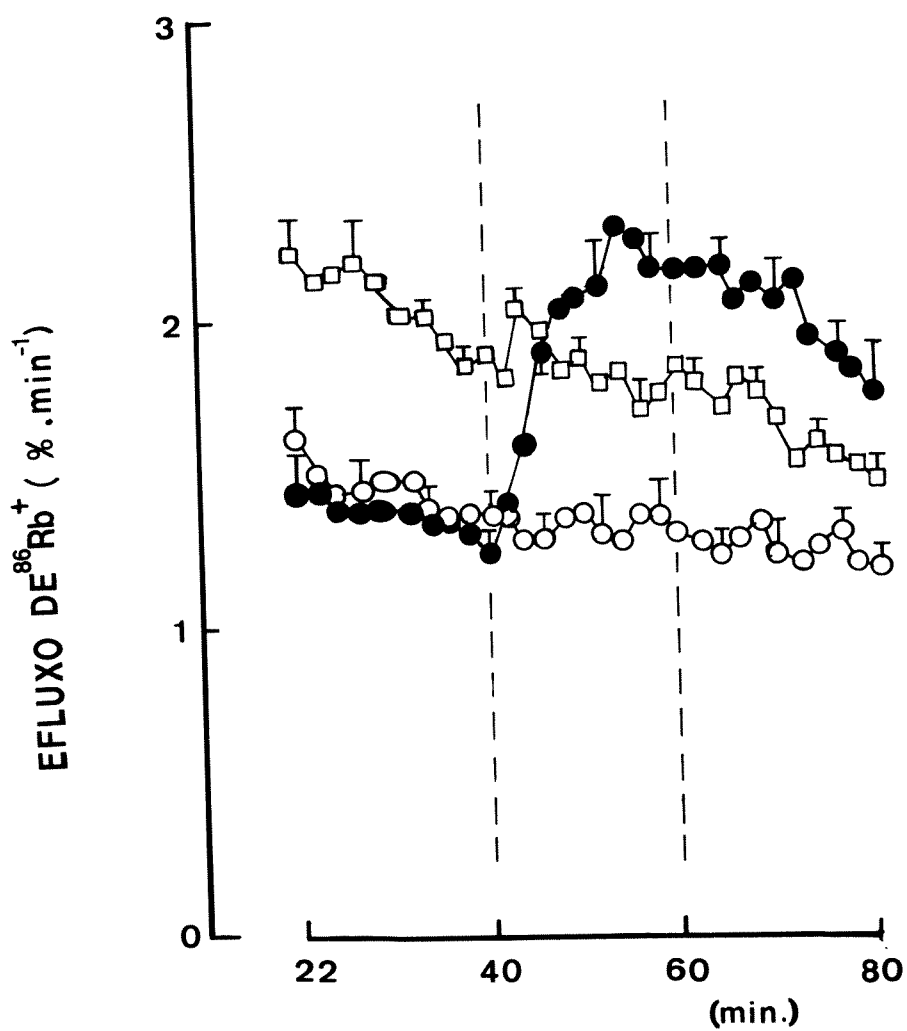


Figura 5. Efeito da veratridina sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas de Langerhans isoladas de rato. 100 mM de veratridina foi adicionada à solução de perfusão na ausência (□ - □) ou na presença (● - ●) de 8,3 mM de glicose. Uma curva controle (O - O) em que a glicose 8,3 mM estava presente o tempo todo é mostrada para comparação.

EFEITO DA TOXINA DE ESCORPIÃO, TsTX-V SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DE CÉLULAS B DE LANGERHANS.

Em presença de 11 mM de glicose, a célula B do pâncreas de camundongo exibe uma atividade elétrica caracterizada por uma sucessão de surtos de potenciais de ação superpostos a um plato ("bursts", fração ativa) despolarizado em relação a uma fase silente.

A figura 6 mostra o efeito da adição de 5,0 ug/ml de TsTX-V, a qual, reversivelmente, alterou a atividade elétrica induzida pela glicose, despolarizando a fase silente, aumentando a frequência dos "bursts" de 2,4/ min (no período-controle), para 5,2/min e, conseqüentemente, aumentando a fração ativa de 45,6% para 71,4%. Resultados semelhantes foram obtidos em outras 3 células de ilhotas diferentes.

Efeito semelhante foi observado quando foi adicionada 110 μ M de veratridina em presença de 11 mM de glicose a outras células B. A despolarização da fase silente e o aumento da frequência dos "bursts" (de 4,77/min no período controle para 7,2/min durante os 2 min e 30 s em que a veratridina foi aplicada) foram bem evidentes (fig. 7). Uma lenta recuperação ocorreu após o retorno a solução sem a veratridina. Em outras 2 células de ilhotas diferentes foram observados efeitos semelhantes. A fração ativa , de 32% durante o período controle, aumentou para 45.2%.

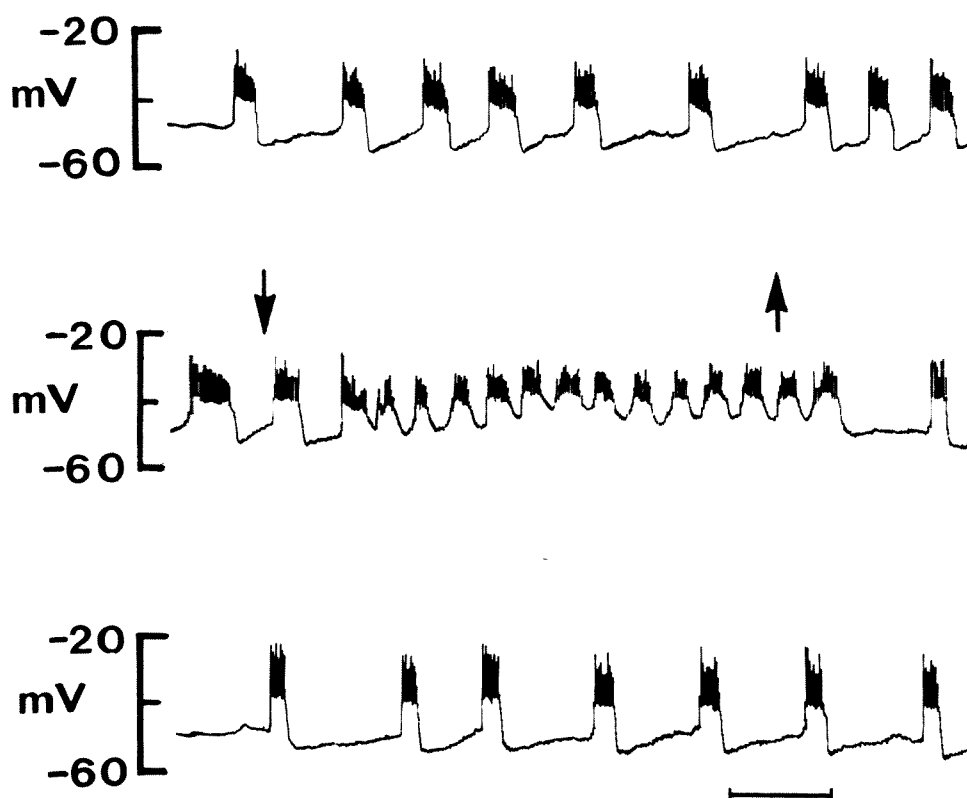


Figura 6. Registro contínuo da atividade elétrica da célula B de pâncreas de camundongo mostrando a atividade elétrica padrão, induzida por 11 mM de glicose (painel superior); o efeito da adição (↓) de 5,6 µg/ml de TsTX-V durante 2 min e 30 s (painel intermediário) e após a remoção da toxina (↑) (painel inferior). As fração ativa em presença de glicose foi de 45,6% nos período controle. Em presença de tsTX-V foi de 71,4% sendo reduzida para 19,5% após a remoção da toxina (primeiros 3 min.)

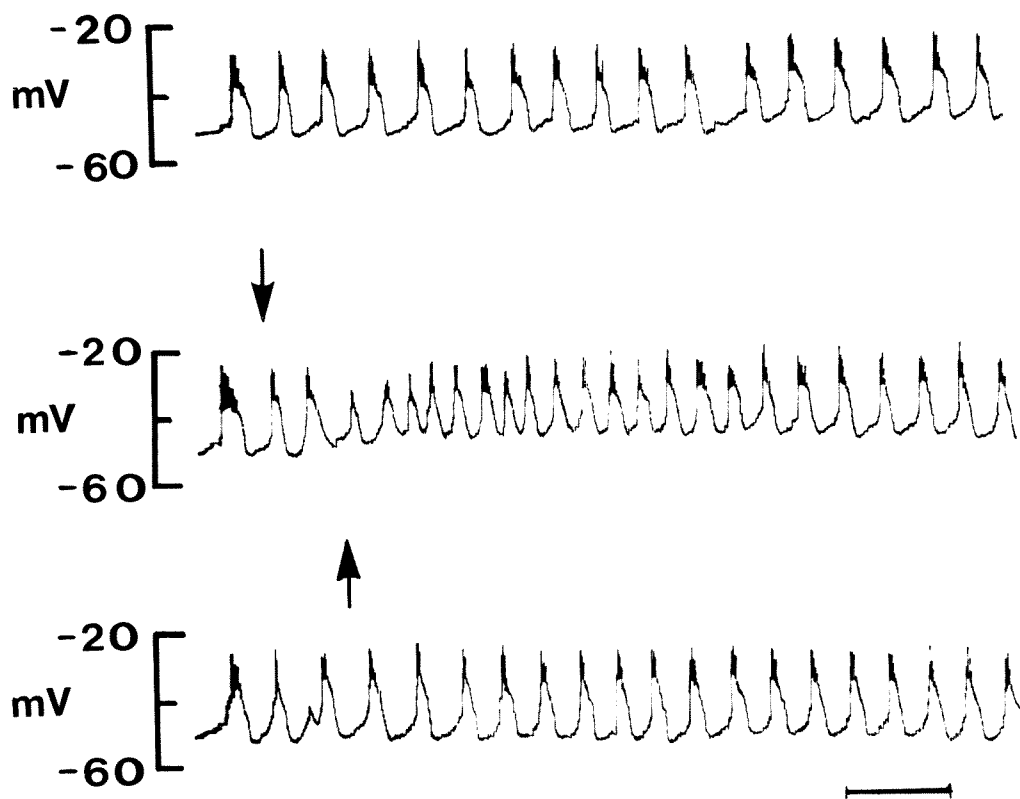


Figura 7 Registro contínuo da atividade elétrica da célula B de pâncreas de camundongo mostrando a atividade elétrica padrão, induzida por 11 mM de glicose (painel superior), após a adição (↓) e retirada (↑) de 110 mM de veratridina (painéis médio e superior). Fração ativa: glicose 11 mM (controle): 32% na presença de 110 μ M de Veratridina. Após a glicose: 37,3%.

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA TsTX-V

A toxina TsTX-V (Fig. 8) possui um esqueleto comum a todas as neurotoxinas escorpiônicas anti-mamífero: a presença de uma α -hélice com duas voltas e meia e três estruturas β -antiparalelas. Possui quatro pontes de dissulfeto e possui alça J e B praticamente do mesmo tamanho. Possui duas alça longas carboxiterminal e aminoterminal.

DENDOGRAMA

Através do alinhamento inicial de 30 toxinas escorpiônicas foi possível obter uma árvore filogenética pelo método Neighbor Joining. Pelo dendograma (Fig. 9) quatro grupos foram agrupados, um grupo de α -toxinas de espécies do Velho Mundo e dois grupos de toxinas do Novo Mundo, uma α e uma β . As toxinas TsTX-V juntamente com as toxinas TsIV-5 e CsE-V formam um grupo de toxinas α mais próximas aquelas do Velho Mundo.

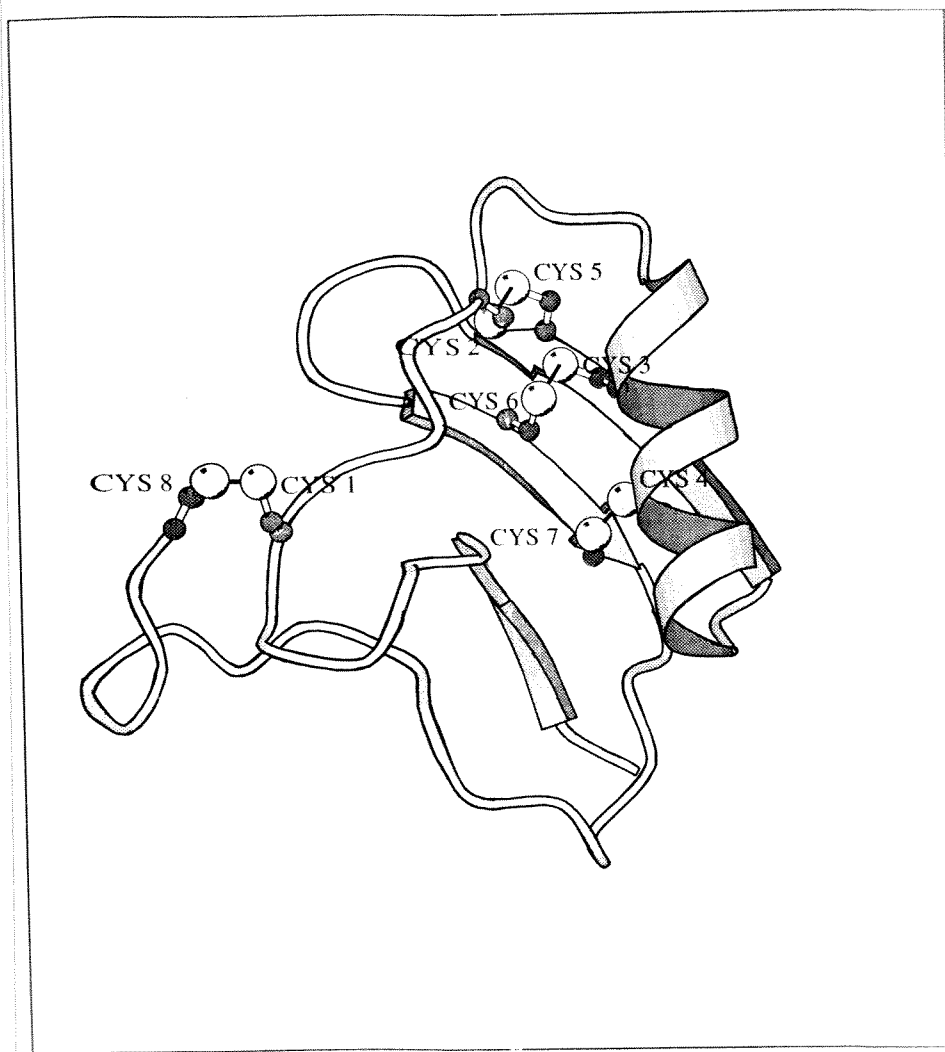


Figura 8. Estrutura tridimensional da neurotoxina TsTX-V do escorpião *Tityus serrulatus* com uma α -hélice, três estruturas β antiparalelas, quatro pontes de dissulfeto (CYS 1- 8; CYS 2 - 5; CYS 3 - 6, CYS 4 -7). A região N-terminal aparece anterior à região de CYS1. Nesta região está presente uma das três estruturas β antiparalelas. A região Carbox -terminal está indicada por CYS 8.

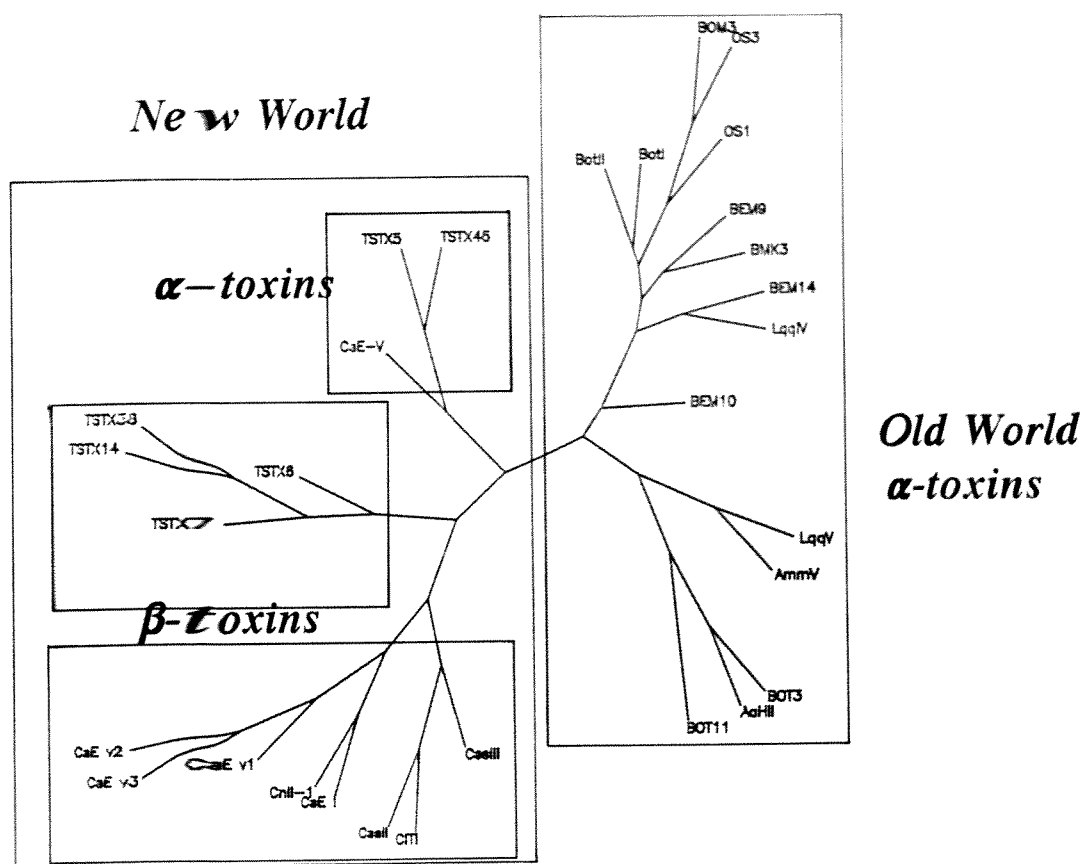


Figura 9. O Dendograma mostra os grupos de toxinas escopiônicas correlacionados de acordo com a sua similaridade estrutural. Foram utilizadas 31 proteínas para esta representação. Através do programa Neighbor Joining foram encontrados dois grandes grupos de toxinas: as do Velho Mundo (unicamente α -toxina) e as do Novo Mundo, com três subgrupos, uma α e duas β (norte-americana e sul-americanas).

DISCUSSÃO

A discussão será dividida em duas partes: estrutura e função e a outra parte sobre a atividade biológica da TsTX-V.

I -ESTRUTURA E FUNÇÃO

As toxinas escorpiônicas interagem especificamente com os canais iônicos (sódio, potássio) de tecidos excitáveis. Formam uma família de proteínas estruturalmente correlacionadas e são compostas por uma única cadeia polipeptídica, com massa molecular de 6 ~ 7 kDa, de caráter básico (Rochat et al., 1970). Dependendo da ação sobre as células nervosas, os diferentes tipos de neurotoxinas escorpiônicas podem ser divididos em três grupos: anti-inseto (Zlotkin et al., 1971), anti-mamífero (Babin et al., 1975) e anti-crustáceo (Lester et al., 1982).

A toxina TsTX-V do veneno de *Tityus serrulatus* foi isolada é caracterizada como uma α -toxina de ação biológica semelhante à das toxinas α do Velho Mundo. Nos testes eletrofisiológicos realizados, a TsTX-V causou um prolongamento do potencial de ação do nervo vago de coelho, cujo efeito não foi revertido por despolarização induzida pelo aumento na concentração de potássio na solução de perfusão, sugerindo que a sua ação é voltagem dependente (Arantes et al., 1994), mas bloqueado pela tetrodoxina.

As neurotoxinas escorpiônicas anti-mamífero são divididas em dois grandes grupos de acordo com seu modo de ação e interação com os canais iônicos (Couraud et al., 1982 e Wheeler et al., 1983): as α -toxinas isoladas do veneno de escorpiões do Norte da África e Oriente Médio e as β -toxinas isoladas de espécies americanas. Escorpiões da espécie *Tityus serrulatus* e *Centruroides sculpturatus* contêm ambas as classes de neurotoxinas (Barhanin et al., 1982 e Meves et al., 1982). As α -toxinas modulam a inativação dos canais de sódio, prolongando a duração do potencial de ação em músculos esqueléticos (Baumgold

et al., 1983) e em nervo (Koppenhorfer e Schmidt, 1968). Este é considerado um efeito típico farmacológico das α -toxinas. Sua ação é voltagem dependente não somente em nervos mielinizados, mas em outros tecidos excitáveis (Catterall, 1980 e Couraud et al., 1982). As α -toxinas têm sua afinidade de ligação reduzida por um aumento da concentração de potássio no meio externo, o que não aconteceu no caso da TsTX-V (Arantes et al., 1994). Segundo Strichartz e Wang (1986), as α -toxinas podem se dissociar dos sítios de ligação por uma mudança do potencial de ação para valores maiores que -20 mV, portanto a TsTX-V pertence a este grupo de neurotoxinas α .

As β -toxinas escorpiônicas modulam o processo de ativação dos canais de sódio, deslocando o limiar do potencial de ação para potenciais mais negativos e interferindo portanto, com a despolarização da membrana (Aldrich et al., 1983; Vandenberg e Horn, 1984).

A TsTX-V foi purificada segundo Arantes et al. (1989, 1994) e teve seu grau de pureza confirmado por HPLC de fase reversa. O perfil cromatográfico mostrou a presença de uma única fração eluída aos 48% do solvente B. A análise do perfil eletroforético em PAGE-SDS tricina em condições dissociantes e redutoras evidenciou uma única banda proteica, mostrando que a TsTX-V é composta por uma única cadeia polipeptídica de peso molecular de 7500. A presença de um único resíduo N-terminal confirmou o grau de pureza da TsTX-V (Marangoni et al., 1992).

Todas as toxinas anti-mamífero, até o presente momento descritas na literatura,, apresentam em sua estrutura quatro pontes de dissulfeto (Rochat et al., 1979). A composição global de aminoácidos da toxina TsTX-V mostra os seguintes aminoácidos mais frequentes: oito resíduos de ácidos aspárticos, 6 de glicinas, 6 de tirosinas e de oito resíduos de meia cistina, sugerindo a existência de 4 pontes de dissulfeto. Os aminoácidos menos freqüentes são: uma histidina e uma isoleucina. Metionina não foi detectada e esta

em baixas proporções ou ausente é uma característica comum em outras toxinas de *Tityus serrulatus*: XI-1, TsTX, IV-V, T₂III₁ e X-4 (Marangoni et al., 1992).

A estrutura primária da TsTX-V foi deduzida a partir da proteína reduzida e carboximetilada, hidrolizada com protease V8 de *Staphylococcus aureus* e com tripsina, cujos peptídeos foram seqüenciados, e, por estudos de sobreposição, determinou-se a estrutura covalente da TsTX-V. A região N-terminal da cadeia polipeptídica foi obtida por seqüenciamento direto da proteína reduzida e carboximetilada. Sua estrutura primária tem 64 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de 7230. Uma vez determinada a sua estrutura, foi possível estudar a homologia seqüencial com outras toxinas de escorpiões (Fig.10) (Marangoni et al., 1994).

O seqüenciamento completo da proteína TsTX-V revelou informações sobre a sua estrutura, como a determinação da seqüência da região B, que é uma importante região para a atividade das α -toxinas. A sua estrutura primária mostra um alto grau de similaridade seqüencial com outras α -toxinas de espécies do Velho Mundo: AaH II (50%), AmmV (50%), Lqq V (52%).

Jover et al. (1980) caracterizaram dois grupos de neurotoxinas escorpiônicas, por experimentos de "binding", demonstrando que as toxinas se ligavam a dois sítios distintos do canal de sódio em sinaptossomas de cérebro de rato. As α toxinas atuavam na inativação dos canais de sódio; nesta classe incluiu a toxina II de *Androctonus australis* (AaH II), a toxina V de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Lqq V) e outras correlatas. As toxinas que reconheciam outros sítios de ligação, diferentes do Lqq V e AaH II foram classificadas como toxinas β . Posteriormente, Wheeler et al. (1983) confirmaram a existência destes dois sítios distintos de ligação para as neurotoxinas, um para o sítio de ligação das β toxinas representada pela toxina Css II de *Centruroides suffusus suffusus* e um outro sítio de ligação para toxinas de *Androctonus australis* II e afins (α -toxinas).

	1	10	20	30	40	50	60	70
TsTX-V	KKDGYPVEGDN-CA	-FACFGY-DNAYCDKLCKDK-KADD-GYCVW-SPD---	CYCYGLPEHILKEPTKTSGR-C					
AaH II	VKDGIVDDVN-CTYT	-CGR---NAYCNEECKL-KGES-GYCQWASPYGNACYCYKLPDH---	VRTKGPGR-C					
Amm V	LKDGIIIDDLN-CTFF	-CGR---NAYCDDECKKK-GGES-GYCQWASPYGNACWCYKLPDR---	VSIKEKGR-CN					
Lqq V	LKDGIVDDRN-CTFF	-CGR---NAYCNDECKKK-GGES-GYCQWASPYGNACWCYKLPDR---	VSIKEKGR-CN					
TsIV-5	KKDGYPVEYDN-CAYI	-CWNV-DNAYCDKLCKDK-KADS-GYCYWVHIL---	CYCYGLPDS---	EPTGSYK--C				
TsTX-VI	GREGYPAD-SKGCKIT	-CWNV-DNAYCDKLCKDK-KADS-GYCAW--P---	ACYCYGLPESVKIW-TSETNK-C					
TsY	KEGYLMDHE-GCK	-LSCF-IRPSGYCGRECGIKKG-SS-GYCAW--P---	ACYCYGLPNWVKYWDRA-TNK-C					
CsE-V3	KEGYLVKKS	GDGCKYG-CLKLGENEGCDTECKAKNQGGSYGYCYAF-----	ACWCEGLPESTPTYPLP--NKSC					
CsEI	KDGYLYEK-TGCKKT	-CYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYGF-----	GCYCEGLPDSTQTWPLP--NK-CT					
CsEV	KKDGYPVDSGN-CKYE	-CLK---DDYCNDLCLER-KADK-GYCYWGKV---SCYC-GLPDNSPTK-TS--GK-CNPA						
Css II	KEGYLVSKSTGCKYE	-CLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAF-----	ACWCTHLYEQAVVWPLP--NKTCN					
Clt 1	KEGYLVNHSTGCKYE	-CFKLGDNDYCLRECRQQYGKAGGYCYAF-----	GCWCTHLYEQAV-WPLP--NKECS					
		--- J ---			--- B ---			

Figura 10. Alinhamento seqüencial da TsTX-V com outras toxinas escorpiônicas, realizado de acordo com os resíduos de meia-cistina. Os "gaps" foram introduzidos ao longo da seqüência para maximizar a homologia. As toxinas usadas foram AaH II (Rochat et al., 1970), o Amm V (Rosso e Rochart 1981), Lqq V (Kopean et al., 1978), TsIV-5 (Possani et al., 1985), TsTX-VI (Marangoni et al., 1990), Ts γ (Bechis et al., 1984), CsV3 (Fontecilla-Camps et al., 1980), CsE I (Babin et al., 1975), CsEV (Possani, 1985), Css II (Rochat et al., 1979) e CIT1 (Ramirez et al., 1988).

Toxinas escorpiônicas têm segmentos moleculares definidos como alças J e B que são expostos à superfície da molécula (Fontecilla-Camps et al., 1980 e Granier et al., 1989). Quando a neurotoxina TsTX-V é comparada com as toxinas de espécies norte americanas de *Centruróides* como a CsE-V3, CsE-V1, CsslI, CITI, nota-se pela homologia sequencial (Fig. 10) diferenças na região J da cadeia polipeptídica. A presença de resíduos incomuns, como, P (6), N (11), F (14) e L (27) e a ausência de outros na cadeia J, poderia ter contribuído para a perda da atividade β . A análise do perfil hidropático da alça J mostra uma diferença considerável nos índices de hidrofobicidade, quando comparadas as toxinas de espécies americanas (Marangoni et al., 1994).

Meves et al. (1984) propuseram que estas alças seriam importantes para a atividade biológica das toxinas de escorpião. A alça J seria responsável pela atividade β , e a alça B, a responsável pela atividade α . Demonstraram também que a maioria das β -toxinas têm uma alça J longa e as toxinas α uma alça B longa e uma J curta, como ilustrado na fig. 11. Estudos eletrofisiológicos têm mostrado que certas modificações na sequência destas regiões podem estar envolvidas com a ativação ou inativação dos canais de Na^+ (Barhanin et al., 1985 e Kharrat et al., 1989).

Kharrat et al. (1989) mostraram que alguns resíduos de aminoácidos seriam de extrema importância na expressão da atividade biológica das α -toxinas. Eles realizaram uma série de estudos envolvendo alteração química dos resíduos de tirosina, triptofano e arginina das toxinas AaH I, AaH II e AaH III e suas atividades eletrofisiológicas. Descobriram que o triptofano teria um papel crucial na atividade, mas que outros resíduos presentes na região C-terminal e N terminal teriam uma importância na ligação destas neurotoxinas com os canais iônicos. Sugeriram que a alça B, localizada entre os resíduos 37 e 44, formam um segmento hidrofóbico importante como parte de um núcleo hidrofóbico conservado em muitas neurotoxinas de escorpião.

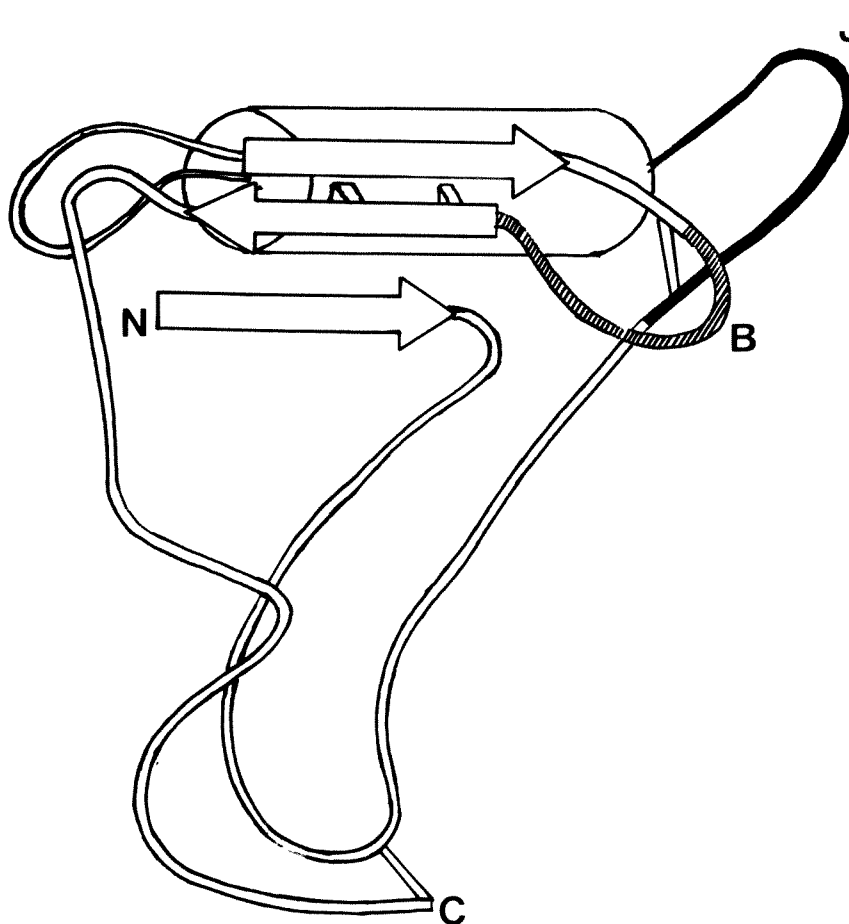


Figura 11. A figura de Meves et al. (1984) mostra uma toxina de escorpião hipotética, com as três estruturas antiparalelas, a estrutura em α -hélice e as alças B e J, aqui representados, que teriam segundo Meves um papel muito importante na expressão biológica alfa ou para a expressão da atividade beta.

Além dos resíduos de triptofano desta região hidrofóbica, as toxinas isoladas do veneno de *T.serrulatus*, TsTX-VI (atóxica), Ts γ (β) e TsTX-V (α) apresentam prolina. Além disso, a TsTX-V contém serina, a qual poderia desempenhar um papel importante nesta estrutura, a exemplo do que ocorre com um grupo de enzimas, as serinoproteases.

Em nosso modelo da TsTX-V (fig.12), nota-se que as alças J e B são de mesmo tamanho e estão espacialmente separadas de tal forma que tanto uma quanto a outra poderia interagir com o canal (Oliveira et al., 1994), de acordo com a proposta de Meves (1984). Atualmente predomina a idéia de que a atividade biológica depende do maior comprimento de uma das alças. Portanto, esperava-se que a TsTX-V tivesse a mesma disposição estrutural da toxina AaH II, com a alça B maior que a J e sobressaída estruturalmente na molécula, conforme o modelo mostrado na fig.12. Entretanto, isto não foi observado em nossos estudos, os quais mostraram que a alça B na toxina TsTX-V é bem menor do que aquela da toxina AaH-II (fig. 12). Consequentemente, é possível que outras regiões moleculares também desempenhem papel importante na expressão da atividade biológica.

A primeira toxina de escorpião cuja estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia de raio X de alta resolução foi a variante 3 do escorpião *Centruroides sculpturatus*. Apesar de não ser tóxica, possui estrutura muito semelhante a das β -toxinas escorpiônicas, sendo, portanto, um modelo de β - toxina. CsE-V3 possui uma formação em alfa hélice, três estruturas beta antiparalelas e quatro alças: duas pequenas, que correspondem as porções J (resíduo 16 a 21), e B (resíduo 41 ao 46) e duas grandes, uma na porção carboxi terminal (resíduo 52 e 65) e a outra na porção amino terminal (resíduo 5 ao 14) (Fontecilla-Camps et al., 1980) (Fig 13 A).

A segunda neurotoxina a ter sua estrutura tridimensional totalmente resolvida foi a toxina II de *Androctonus australis*, a AaH II, a qual possui um "esqueleto" formado por uma

α -hélice e pelas 3 estruturas β antiparalelas. O que diferencia uma neurotoxina da outra é a orientação das alças que se destacam do esqueleto da neurotoxina, principalmente as alças J e B e a alça C-terminal (Fontecilla-Camps et al., 1988) (Fig.13B).

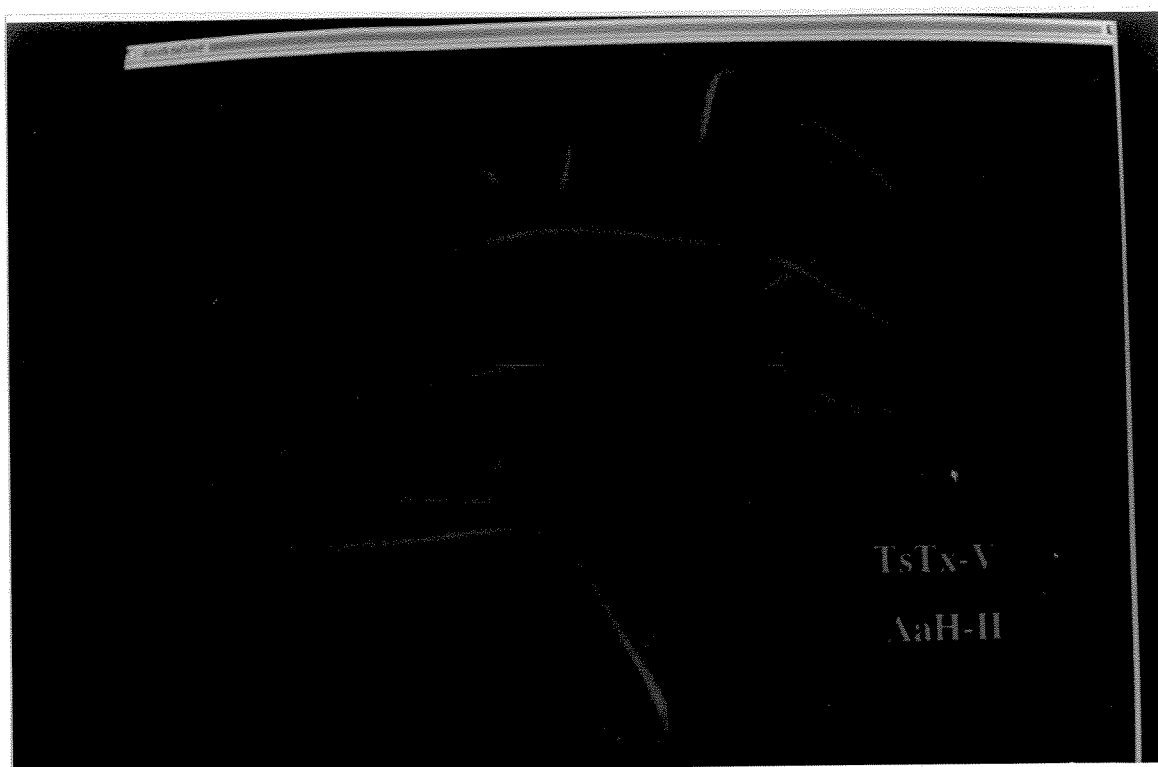


Figura 12. A figura mostra a representação das toxinas TsTX-V (cor verde) e de AaH II (cor majenta), dando destaque principalmente à diferença entre as disposições dos alças B e J da toxina TsTX-V e AaH II. Na sobreposição, temos estruturas extremamente conservadas como as e o tubo de α -helice.

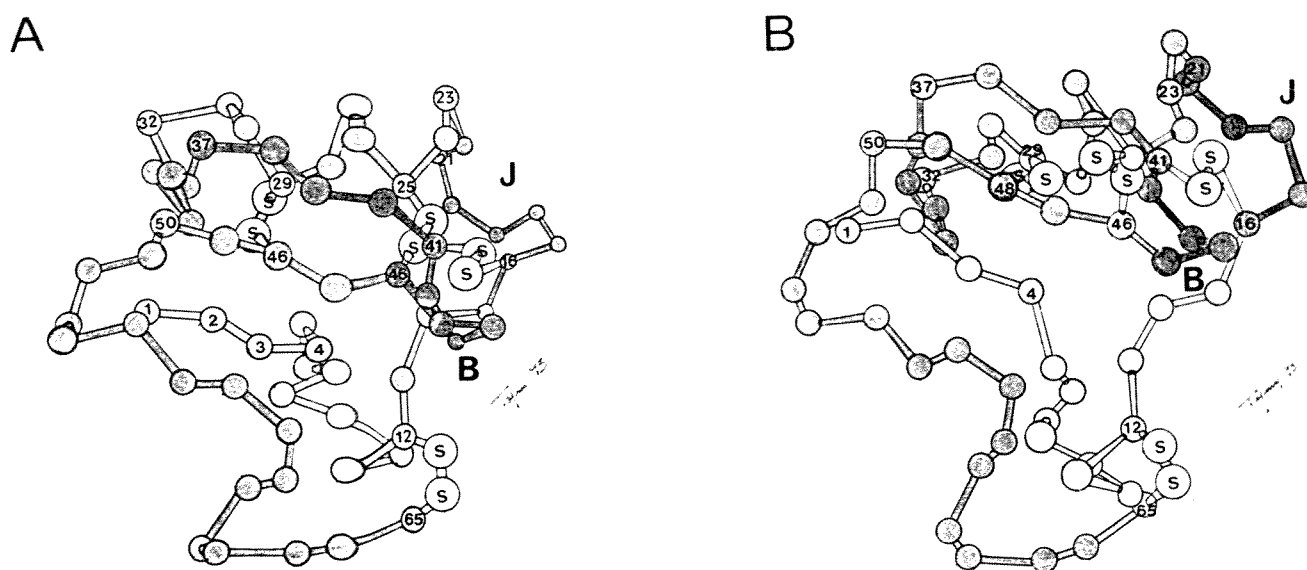


Figura13. A) Estrutura da toxina AaH II de *Androctonus australis* , uma alfa toxina do Velho Mundo (Fontecilla-Camps, et al., 1988). B) Representação da toxina beta, CsE-V3 (Fontecilla-Camps, et al., 1980). Ambas as estruturas foram determinadas por cristalografia de raio X de alta resolução. As letras B e J indicam a região das alças B e J que estão sobrepostas no plano.

Quando as toxinas CsE-V3 e AaH II são comparadas com outras toxinas escorpiônicas, a homologia seqüencial revela diferenças entre as alças J e B. Nas toxinas β , representadas pela CsE-V3, há uma alça B menor do que a encontrada nas toxinas α (AaH II). Por sua vez a toxina AaH-II possui a alça J menor do que a CsE-V3 (figs. 11 e 13). Convencionou-se, a partir dessas observações, que a diferença na expressão das atividades biológicas das neurotoxinas, bem como as suas ações eletrofarmacológicas, estariam relacionadas com estas alças. (Meves et al., 1984)

As toxinas Css II, de *Centruroides suffusus suffusus*, Csl, Cs II e Cs IV, de *Centruroides sculpturatus* junto com a toxina Ts γ (TsTX-I) foram classificadas como β toxinas por sua propriedade de deslocar a curva da ativação de sódio em nodos de Ranvier (Meves et al., 1982, Wang e Strichartz, 1982).

Em outra categoria estão as toxinas de *Leiurus* e *Androctonus*, Lqq V e AaH II, respectivamente, que são capazes de retardar a inativação, sendo por isso classificadas de α -toxinas. Mas a toxina V de *Centruroides sculpturatus* ficou de fora desta classificação, permanecendo como uma classe ímpar. Apesar de sua atividade α comprovada, a toxina possui uma alça J mais curta (Meves et al., 1982). Caso semelhante é o das toxinas TsIV-5 e TsTX-V. Portanto, sugerimos que há duas classes de α -toxinas, aquelas do tipo AaH II e Lqq V e uma outra do tipo da TsTX-V, que se diferenciariam pela disposição e comprimento da região J, o que provavelmente se reflete na diferença de atividade biológica.

De modo similar ao que se descobriu para as α -toxinas, Wheeler et al. (1983) e Vijerberg et al. (1984) mostraram que a toxina Ts- γ de *Tityus serrulatus* possui uma característica diferenciada das outras toxinas da classe β . A Ts- γ tem acesso a determinados sítios do canal de Na⁺ que outras toxinas β não teriam. Desta forma, a toxina Ts γ deslocaria outras toxinas β do canal de sódio não via competição direta pelo mesmo sítio, mas por uma modificação estrutural do canal que impediria as outras β toxinas de se

ligarem. Arantes et al., (1994) fazem referência a esse comportamento diferenciado da toxina Ts- γ . Estruturalmente as toxinas TsTX-V e TsTX-VI (atóxicas) descritas por Marangoni et al., (1990) e Ts γ são homologas. Oliveira et al., (1994) demonstraram, através de modelagem estrutural, que estas três toxinas têm a mesma disposição das alças B e J, portanto, a diferença entre as atividades biológicas destas toxinas não deve estar somente relacionada à diferença de um só resíduo ou na disposição de suas alças B e J, como Meves et al. (1984) assinalaram, reforçando a hipótese de que outras regiões moleculares estariam envolvidas. No caso da TsTX-V, além da região da ação biológica residente nas alças B e J, existem outras duas alças, uma na região N-terminal e outra na região C-terminal, ambas com grande "mobilidade". Estas alças fazem parte do núcleo hidrofóbico, podendo atuar como uma região de ligação da toxina com a proteína do canal

Os dados espectrais e químicos das várias neurotoxinas escorpiônicas que atuam sobre os canais de sódio (Darbon et al., 1983, Rochat, 1979 e Jover et al. 1980), sugerem que a superfície hidrofóbica destas moléculas são, na verdade, uma estrutura extremamente conservada do ponto de vista evolutivo e que desempenhariam um papel extremamente importante na interação das neurotoxinas com os canais de sódio (Fontecilla-Camps et al., 1981). Segundo estes autores, este núcleo hidrofóbico teria um papel direcionador da atividade biológica das neurotoxinas, sendo formado principalmente por resíduos de triptofano, tirosina, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina, prolina, alanina e treonina. Modificações químicas neste núcleo mostraram que, outros resíduos de aminoácidos básicos carregados, situados dentro ou próximo dele, seriam necessários (Angelis e Nutter, 1983).

Estes dados reforçam nossa hipótese de que outras regiões moleculares estariam envolvidas na atividade biológica destas neurotoxinas, sendo as alças J e B responsáveis

pela expressão da atividade biológica; uma região N-C terminais responsável pela ligação e o núcleo hidrofóbico que contém as regiões N-C terminais.

Nossos estudos de filogenia molecular revelou discrepância em relação à classificação proposta por Meves (1984) que considera apenas duas classes de neurotoxinas de escorpião. O dendrograma resultante de nossos estudos (fig. 9) propõe o agrupamento das neurotoxinas em quatro grupos, conforme suas semelhanças estruturais, principalmente em relação à disposição das alças B e J. Dentre as toxinas utilizadas no estudo de filogenia, notamos dois grupos de toxinas α : um maior, composto exclusivamente por espécies do Velho Mundo, com 15 toxinas representadas, incluindo a AaH II e a Lqg V e o outro, composto por toxinas de espécies americanas, duas de *Tityus serrulatus* (TsTX-V e Ts IV-5) e por uma norte-americana a CsE-V. Aparentemente a TsTX-V é a mais recente e a toxina CsE-V é a mais próxima das espécies do Velho Mundo, apresentando a característica principal das α -toxinas americanas e igual disposição das alças B e J, caracteristicamente mais curtas que as espécies do Velho Mundo. As β -toxinas estão agrupadas em dois grupos exclusivamente americanos: um deles compreende as β -toxinas do tipo γ , incluindo toxinas de escorpiões do gênero *Tityus* e o outro formado por β toxinas do tipo C β Ss, isolada de espécies norte-americanas. A divisão das toxinas β em dois grupos também encontra apoio nos trabalhos de Wheeler et. al. (1983) e Vijerberg et al. (1984), que mostraram o efeito da toxina γ sobre o canal de sódio, deslocando as outras toxinas β dos sítios do canal de sódio.

II-ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os efeitos do venenos de *Tityus serrulatus* ou de suas frações tóxicas podem ser estudados em mamíferos, insetos ou crustáceos, como já foi mencionado. A maioria das observações ou experimentos foram realizados em indivíduos onde a intermediação do sistema nervoso não poderia ser excluída. A picada de escorpião pode provocar a morte de indivíduos jovens e diversos sintomas no homem. A maioria deles tem sido atribuída a ativação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), induzindo a liberação de acetilcolina e de nor-adrenalina, as quais por sua vez afetam a atividade dos órgãos alvos. Distúrbios metabólicos, como hiperglicemia e glicosúria são alguns dos sintomas da intoxicação pelo veneno de *T. serrulatus* (Magalhães, 1939; Freire-Maia, 1990). No homem, o distúrbio mais grave é a pancreatite causada pela picada (Machado e Silveira, 1976/77). Novaes et al., (1994) induziram a pancreatite crônica e nesídeoblastose em ratos pela injeção de veneno bruto e da fração (Tityustoxina) de *T. serrulatus*, mas não se pode afirmar que os efeitos foram independentes da ativação do SNA.

Sabe-se que o mecanismo de ação das toxinas escorpiônicas que alteram a atividade das células nervosas acima referidas decorre da ligação da toxina a determinados sítios dos canais de Na⁺, afetando as correntes de Na⁺, ativando-as mais rapidamente (efeito β) ou retardando a sua inativação (efeito α) (Catterall, 1980; 1984).

Só recentemente foram relatados efeitos diretos de toxinas de *T. serrulatus* em outras preparações, independentes do sistema nervoso. Possani et al., (1991) demonstraram que a toxina Ts IV-5 estimula a secreção de grânulos de zimogênio em pâncreas exócrino de ratos. O mecanismo de ação permanece desconhecido, contudo, outras toxinas do mesmo escorpião, TsTX-V e Ts- γ potencializaram a secreção de insulina induzida por glicose em

ilhotas isoladas de ratos (Gonçalves et al., 1994a), possivelmente devido a despolarização da membrana da célula β (Gonçalves et al., 1994b).

Nossos dados confirmaram as observações de Gonçalves et al., (1994a), mostrando que as toxinas TsTX-V e Ts- γ potencializaram a secreção de insulina diretamente, sem intermediação do Sistema Nervoso, pois as ilhotas utilizadas nos experimentos foram isoladas cerca de 2 horas e meia antes do início da incubação com as toxinas .

A toxina TsTX-V potencializa a secreção de insulina tanto na presença como na ausência de glicose 8,3 mM, sugerindo que a toxina, no caso das células B, não precisaria estar despolarizada para agir, mas sua ação potencializadora é maior e mais efetiva quando as células B se encontram despolarizadas devido à presença de glicose 8,3 mM. Já a toxina Ts- γ só potencializa a secreção quando a célula se encontra no estado despolarizado, ou seja quando o meio é suprido com glicose 8,3 mM.

O mecanismo de secreção de insulina induzido pela glicose envolve a participação de canais de K^+ e de Ca^{2+} (Atwater et al., 1989 e Ashcroft e Rosman, 1989) e provavelmente de Na^+ (Hiriart e Mateson, 1985; Gonçalves et al., 1994b). Um dos eventos mais precoces nesta sequência é o fechamento dos canais de K^+ decorrentes do aumento da razão ATP/ADP no citosol da célula B (Atwater et al., 1984; 1989; Ashcroft et al., 1984; Cook e Hales 1984 e Scott et al., 1985), o qual contribui decisivamente para a despolarização que precede a abertura dos canais de Ca^{2+} , para a admissão de Ca^{2+} necessário para a ativação do mecanismo promotor da exocitose dos grânulos de insulina (Malaisse 1984, Boscher et al., 1984, Atwater et al., 1989). Em células B de ilhotas isoladas de camundongos a glicose promove uma atividade elétrica oscilatória característica, decorrente dos efeitos integrados sobre os canais de K^+ , Ca^{2+} e possivelmente de Na^+ (Gonçalves et al., 1994 b).

Havendo verificado que as toxinas de escorpião estimulam a secreção de insulina por ilhotas de ratos isoladas (Fig.3), estudamos os efeitos da toxina TsTX-V sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ e sobre a atividade elétrica induzida pela glicose para obter informações sobre o mecanismo de ação da TsTX-V. Os efeitos da toxina α , TsTX-V, sobre o fluxo iônico (representativo da atividade dos canais) foram estudados de maneira indireta, através do estudo de fluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas de ratos (como indicador da permeabilidade ao K^+) e das alterações induzidas na atividade elétrica da célula β de camundongo (o estado elétrico da membrana reflete a atividade integrada dos canais ativos a qualquer momento). A correlação entre os resultados obtidos neste dois tipos de preparação tem sido estabelecida em diversos trabalhos (Atwater et al., 1984, 1989 e Gonçalves et al., 1986).

A glicose despolariza as células B pancreáticas após fechamento dos canais de K^+ ATP sensíveis (Ashcroft e Rosman, 1989 e Misler et al., 1992) e reduz o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas isoladas de ratos e camundongos (Gonçalves et al., 1986; Boscherio et al., 1977 e Dawson et al., 1984). Contudo, a despolarização ativa outros tipos de canais de K^+ , causando um aumento no efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ (Rosman et al., 1986). Na membrana de células B pancreática de ratos foi encontrado um tipo de canal de Na^+ voltagem dependente (Hiriart e Matteson, 1986), que não está completamente inativado no estado de repouso da célula.

Se a TsTX-V afeta a inativação dos canais de Na^+ em células B um aumento do efluxo de K^+ de ilhotas de Langerhans perfundidas é previsível. O aumento do efluxo de K^+ foi confirmado experimentalmente, pela medida do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ (Fig.4). A aplicação da toxina TsTX-V ($4,4 \mu\text{g/mL}$) produziu um efeito transitório na ausência de glicose. Porém na presença de $8,3 \text{ mM}$ de glicose, a toxina ($5,6 \mu\text{g/mL}$) induziu um aumento do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$. Na ausência de glicose o canal, de K^+ sensível ao ATP estão abertos e o potencial de membrana está próximo de -70 mV (Atwater et al., 1989), condição em que a secreção de insulina é mínima. Porém, na presença de glicose ($8,3 \text{ mM}$), o efeito da TsTX-V foi

persistente, aumentando o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ 2,0 a 2,4 vezes comparado com o período controle.

Aparentemente o efeito da TsTX-V sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ foi indireto. Segundo Atwater et al., (1989) os canais de sódio estão presentes nas células B em número reduzido e a sua importância para o mecanismo de secreção é negligenciado. Sabe-se contudo que esta toxina tem uma alta afinidade por canais de sódio de células nervosas. Pode-se sugerir que a TsTX-V teria o mesmo efeito nas células B, ativando indiretamente a permeabilidade dos canais de K^+ voltagem dependente após a ativação dos canais de Na^+ presentes na membrana de células B.

Uma outra evidência que mostra a ação desta toxina sobre os canais de sódio é que o efeito observado é semelhante ao da veratridina (100 μM) (Fig 5). A veratridina mantém os canais de sódio que foram abertos, contribuindo desta forma para manter o estado despolarizado por maior tempo. Em estudos sobre os efeitos da veratridina sobre o retardo na inativação do canal de sódio, Barnes e Hille (1988) demonstraram que a veratridina somente tem acesso ao canal quando este se encontra no estado aberto. Isso é compatível com o efeito da TsTX-V potencializando a secreção de insulina em presença de glicose. Este efeito foi também verificado por Donatsch et al. (1977), que já haviam demonstrado que a veratridina, substância que retarda a inativação do canal de Na^+ , potencializa a secreção de insulina estimulada pela glicose em ilhotas de ratos.

Estes resultados sugerem que a TsTX-V atua diretamente sobre os canais de Na^+ , o qual indiretamente, afeta a permeabilidade ao K^+ dependente de voltagem. Existem neurotoxinas de escorpiões que podem afetar a permeabilidade dos canais de K^+ , Ca^{2+} voltagem dependente, como é o caso da caribdotoxina (Kulkujan et al., 1991 e Blaustein et al., 1991). Contudo ainda não se tem, infelizmente, uma caracterização bioquímica desta classe de neurotoxinas do veneno de *Tityus serrulatus*.

Nossos estudos eletrofisiológico confirmaram as observações de Gonçalves, et al., (1994b), mostrando que, na presença de glicose (11 mM) a TsTX-V despolariza a fase silente da atividade elétrica padrão, aumentando o período em que a célula permanece na fase ativa do "burst". Estes efeitos são semelhantes a aqueles induzidas pela veratridina (110 μ M) em ilhotas de camundongos perfundidas em presença de 11 mM de glicose. Na ausência de glicose, nem a veratridina nem a TsTX-V afetam o potencial da membrana e a resistência à entrada de corrente.

Os efeitos verificados em presença da toxina de escorpião devem estar relacionados ao seu efeito sobre os canais de Na^+ , à semelhança dos efeitos da veratridina, isto é, retardando a inativação dos canais de Na^+ . Canais de Na^+ foram recentemente identificados em células B através da técnica de "path clamp" (Hiriart e Matteson, 1988). De acordo com Barnes e Hille (1988), a veratridina só modifica os canais de Na^+ após sua abertura, retardando a inativação. Portanto, se a TsTX-V atua sobre os canais de sódio voltagem dependente de nervos, esta toxina pode ser uma valiosa ferramenta para a compreensão da função dos canais de sódio na secreção e verificar qual a importância destes canais sobre a dinâmica da célula.

BIBLIOGRAFIA

- Aldrich, R.W.; Corey, D.P. and Stevens, C. F. (1983) A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. Nature 306: 436 - 441.
- Angelis, K.J. and Nutter, T.J. (1983) Mapping the molecular structure of voltage-dependent sodium channel. J.Biol. Chem. 258: 11948 - 11957 .
- Arantes, E.C.; Prado, W.A.; Sampaio, S.V. e Giglio, J.R. (1989). A simplified for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. Toxicon, 8: 907 - 916.
- Arantes, E.C.; Riccioppo Neto, F.; Sampaio, S.V.; Vieira, C.A. and Gliglio, J.R. (1994) Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. Biochim. Biophys. Acta 1199: 69 - 75.
- Ashcroft, F.M.; Harrison, D.E. and Ashcroft, S.J.H. (1984) Nature, 312: 446 - 448
- Ashcroft, F.M. and Rorsman, P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic B-cells. Prog. Biophys. Mol. Biol. 54: 87 - 143.
- Atwater, I.; Gonçalves, A.A.; Herchuelz, A.; Lebrun, P.; Malaisse, W.; Rojas, E. & Scott, A. (1984) Cooling dissociates glucose-induced insulin release from electrical activity and cation fluxes in rodent pancreatic islets. J. Physiol., 348: 615 - 629.
- Atwater, I.; Carroll, P and Rorsman, P (1989). Electrophysiology of the pancreatic β -cells. In: Insulin Secretion (Draznin, B, Melmed, S., and LeRoith, D., Eds), Alan R. Liss New York.
- Babin, D.R.; Watt, D.D.; Gross, S.M. and Meejnek, R.V. (1975) Amino acid sequence of neurotoxin I from *Centruroides sculpturatus* Ewing. Arch. Biochem. Biophys. 166: 125 - 134.

- Barhanin, J.; Giglio, J.R.; Leopold, P.; Schmid, A.; Sampaio, S.V. and Lazdunski, M. (1982) *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. Tityus γ toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na^+ channel. J. Biol. Chem. **257**: 12553 - 12558.
- Barhanin, J.; Merr, H.; Romey, G.; Pauron, D. and Lazduski, M. (1985) A monoclonal immunotoxin acting on the Na channel with properties similar to those of a scorpion toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. **82**: 1842 - 1846.
- Barnes, R.D. (1987) Order Scorpiones - Invertebrate Zoology 5th edition Saunders College Publishing: pp 503
- Barnes, S. and Hille, B. (1988) Veratridine modifies open sodium channels. J. Gen. Physiol. **91**: 421 - 443.
- Bartholomew, C.; Murphy, J.J.; Fitzgerald, O. & McGeeney, K.F. (1975) Action of *Tityus trinitatis* venom on the canine pancreas Toxicon, **13**: 87.
- Baumgold, J.; Parent, J.B. and Spector, I. (1983) Development of sodium channels during differentiation of chick skeletal muscle in culture II. $^{22}\text{Na}^+$ uptake and electrophysiological studies. J. Neurosci. **3**: 1004 - 1013.
- Bechis, G.; Sampieri, F.; Yuan, P.N.; Brando, T.; Martin, M.F.; Diniz, C.R. and Rochat, H. (1984). Amino acid sequence of toxin VII, a β -toxin from the venom of the scorpion *T. serrulatus*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **122(3)**: 1146 - 1153.
- Blaustein, M.P.; Rogowski, R.S.; Schneider, M. J. and Krueger, B.K. (1991) Polypeptide toxins from the venom of Old World and New World Scorpion preferentially block different potassium channels. Molecular Pharmacology **40**: 932 - 942.
- Böhn, G.M.; Pampolo, S.; Diniz, C.R.; Gomez, M.V., Pimenta, A.F. and Netto, J.C. (1974) Ultrastructural interactions of mouse diaphragm nerve ends induced by purified scorpion venom Tityustoxin Toxicon, **12**: 509.

- Boschero, A.C.; Kawazu, S.; Duncan, G. and Malaisse, W. J. (1977) Effect of glucose on K⁺ handling by pancreatic islets. FEBS letters 83: 151 - 154.
- Boschero, A.C.; Malaisse, W. and Gonçalves, A.A. (1984) Mecanismo de secreção de insulina. Ciência e Cultura, 36: 1742 - 1757.
- Borges, A.; Arantes, E.C. and Giglio, J.R. (1990) Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karch). Toxicon 28(9): 1011 - 1017.
- Bücherl, W. (1979) Acúleos que matam. São Paulo, Revista dos Tribunais 153p.
- Catterall, W.A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channel in excitable membranes. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 15 - 43.
- Catterall, W.A. (1984) The molecular basis of neuronal excitability. Science 223: 653 - 661.
- Catterall, W.A. (1986) Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and functions. Trends Neurosci. 9 : 7 - 10.
- Corrado, A.P., Antonio, A. and Diniz, C.R. (1968) Brazilian Scorpion Venom (*Tityus serrulatus*) an usual sympathetic postganglionic stimulant. J. Pharmac. Exp. Ther. 164: 253 - 258.
- Corrado, A.P., Diniz, C.R. and Antonio, A. (1975) Neurotransmitter release by the toxin of brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*, Lutz e Mello) In: Rocha e Silva, M and Suarez-kurtz, G. (editors) Concepts of membranes in regulation and excitation. Raven Press, New-York: 193.
- Cook, D. and Hales, C.N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in B-cells. Nature, 311: 269 - 271

- Couraud, F.; Jover, E.; Dubois, J.M. and Rochat, H. (1982) Two types of scorpion toxins receptor site, one related to the activation the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon 20(1): 9 - 16.
- Darbon, H.; Jover, E.; Couraud, F. and Rochat, H. (1983) Photoaffinity labeling α -toxins and β -toxins receptors associated with rat brain sodium channel. Int. J. Pep. Protein. Res. 22: 179 - 186.
- Dawson, C.M.; Croghan, P.C.; Scott, A.M. and Bangham, J.A. (1984) Direct comparison of K⁺ and Rb⁺ effect in normal mouse islets. Diabetologia 27: 667A.
- Diniz, C.R. and Gonçalves, J.M. (1956) Some chemical and pharmacological properties of brazilian scorpion venom. In: Burckley, E. and Borges, N. (editors) Venon, Amer. Assoc. Adv. Sci. Press. Washington D.C.: 131 - 144.
- Diniz, C.R. and Torres, J.M (1968) Release of acetylcholine like substance from guinea-pig ileum by scorpion venom. Toxicon, 5: 277 - 281.
- Donatsch, P.; Lowe, D.A.; Richardson, B.P. and Taylor, P. (1977). J. Physiol.(London) 267: 357 - 376.
- Edman, P. and Begg, G. (1967) A protein sequencer. Eur. J. Biochem. 1: 80 - 91.
- Eddlestone, G.T.; Gonçalves, A.A.; Bangham, J.A. and Rojas, E. (1984) Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse. J. Membr. Biol. 77: 1 - 8.
- Finney, D.I. (1952) In: Statistical method in Biological Assay London: Charles Griffin
- Fontecilla-Camps, J.C.; Almassy, R.J.; Suddath, F.L.; Watt, D.D. and Bugg, C.E. (1980) Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(11): 6496 - 6500.
- Fontecilla-Camps, J.C.; Almassy, R.J.; Suddath, F.L.; Ealick, S.E.; Watt, D.D.; Feldman, R.J. and Bugg, C. (1981) Architecture of scorpion neurotoxins: a class of membrane binding proteins. TIBS, 6: 291 - 296.

- Fontecilla-Camps, J.; Habersetzer-Rochat, C. and Rochat, H. (1988) Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7443 - 7447.
- Francke, O.F. (1979) Observations on the reproductive biology and life history of *Megacormus gertsani* Diaz (Scorpiones, Chactidae, Megacorminae) J. Arachnol. 7: 223 - 230.
- Freire-Maia, L.; Ferreira, M. e Carvalho, P. (1961) Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial produzida pelo veneno total do escorpião no cão. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz 59: 11 - 22.
- Freire-Maia, L. (1990) Pharmacology of *Tityus serrulatus* scorpion venom. Mem. Inst. Butantan 52: 51 - 57.
- Gomez, M.V., Dai, M. and Diniz, C.R. (1973) Effect of scorpion venom, tityustoxin on the release of acetylcholine from induced slices of rat brain. J. Neurochem. 20: 1051.
- Gonçalves, A.A.; Dias, O.; Langone, F.; Reis, L.C. and Boschero, A.C. (1986) Thiopental inhibits K⁺ permeability of rat and mouse pancreatic B-cells. Eur. J. Pharmacol. 125: 119 - 125.
- Gonçalves, A.A. ; Carneiro, E.M.; da Silva, C.A.; Toyama, M.H. ; Marangoni, S.; Giglio, J.R.; Arantes, E.C. e Oliveira, B. (1994) Neurotoxinas α e β de *T. serrulatus* potencializam a secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos. IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE): 167.
- Gonçalves, A.A.; Mears, D.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Giglio, J.R.; Arantes, E.C. & Oliveira, B. (1994) Toxinas de *T. serrulatus* altera a atividade das células B de camundongos IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE): 313

- Granier, C.; Novotny, J.; Fontecilla-Camps, J.C.; Fourquet, P.; Ayeb, M.E. and Bahraqui, E (1989). The antigenic structure of a scorpion toxin. Molecular Immunology. 26: 503 - 513.
- Hanks, J.H. and Wallace, R.E. (1949) Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration. Proc. Soc. Exp. Biol. 71: 196.
- Heinrikson, R.L. and Meredith, S.C. (1984) Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: pre column derivatization with phenylthiocyanate. Analytical Biochemistry 136: 65 - 72.
- Hiriart, M. and Matterson, D.R. (1988) Na^+ channels and two types of Ca^{+2} channels in rat pancreatic β -cells identified with reverse hemolytic plaque assay. J. Gen. Physiol. 91: 617 - 639.
- Hodkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) Quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117: 500.
- Kharrat, R.; Darbon, H.; Rochat, H. and Granier, C. (1989) Structure/activity relationships of scorpion α -toxins. Multiple residues contribute to the interaction with receptors. Eur. J. Biochem. 181: 381 - 390.
- Kjellesvig-Warieng, E.N. (1972) *Brontoscorpio anglicans*: a gigantic. Lower paleozoic scorpion from Central England. J. Palentol. 46: 39 - 42.
- Kopean, C.; Martinez, G. and Rochat, H (1978) Amino acid sequence of neurotoxin V from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* FEBS letters 89 (1): 54 - 58.
- Koppenhoffer, E. and Schmidt, H. (1968) Die wirkung von skorpiongift auf die ionestrome des Ranvierscher Schnurrings I . Die Permeabilitäten P_{Na} um P_{K} . Pflügers Archiv. 303: 150 - 161.

- Kulkujan, M. Gonçalves, A.A. & Atwater, I. (1991). Charybdotoxin -sensitive K(Ca) and increased burst frequency without affecting average spike frequency in pancreatic B-cells. *Biophys. J.* ,57: 521
- Jover, E.; Couraud,F. and Rochat,H. (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. Biochemical and Biophysical Research Communication 95(4): 1607 - 1614.
- Lester, D.; Lazarovici, P.; Pellate, M. and Zlotkin, E. (1982) Purification, characterization of two insect toxins from the venom of the scorpion *Buthus judaicus* Biochim. Biophys. Acta 701: 370 - 381.
- Loret, E.P.; Martin-Eauclaire, M.F.; Mansuelle, P.; Sampieri, F.; Granier, C. and Rochat, H. (1991). An Anti-insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis* Hector also act on the α and β sites of the mammalian sodium channel: Sequence and Circular Dicroism study. Biochemistry 30: 633 - 640.
- Machado, J.C. & Silveira Filho, J.F. (1976/77) Indução de pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpônico de *Tityus serrulatus*. Mem. Inst. Butantan 40/41:1 - 9.
- Magalhães, O. (1939) The scorpionic syndrome. J. trop. Med. Hyg. 42: 1 - 5.
- Magalhães, O. (1946) Escorpionismo IV Monografia do Inst. Oswaldo Cruz Nitzan (Tischerler) M. (1970) Thermostability of the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. Toxicon 3: 245.
- Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae,F. and Sener, A. (1984) Coupling factors in nutrient-induced insulin release. Experientia, 40: 1035 - 1043.
- Marangoni,S.; Ghiso, J.; Sampaio, S.V.; Arantes, E.C.; Giglio,J.R.; Oliveira,B. and Frangione,B. (1990) The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. J. Prot. Chem. 9 (5): 595 - 601.

- Marangoni, S.; Toyama, M.H.; Arantes, E.C.; Giglio, J.R. and Oliveira, B. (1992) Sequência parcial da TsTX-V, uma nova neurotoxina do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*. VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE): 123.
- Marangoni, S.; Toyama, M.H.; Giglio, J.R.; Arantes, E.C. and Sampaio, S.V. (1994) Structure and Function of TsTX-V, a α -toxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom. SBBq :136
- Mccornick, S.J. and Polis, G.A. (1990) Prey, predators and parasites In: Polis, G.A. (editor) The biology of the scorpiones Stanford, Stanford University Press. 587p
- Meves, H.; Ruby, N. and Watt, D.D. (1982) Effect of toxin isolated from the venom of scorpion *Centruroides sculpturatus* on the Na currents of the nod of Ranvier. Pfugers Arch. 393: 56 - 62.
- Meves, H.; Simard, M. and Watt, D.D. (1984) Biochemical and electrophysiological characteristic of toxins isolated from the scorpion *Centruroides sculpturatus*. J. Physiol. (Paris) 79: 185 - 191.
- Ministério da Saúde (1991) Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Escorpionismo - Análise Epidemiológica. Brasília - DF.
- Misler, S.; Barnett, D.W.; Gills, K.D. & Pressel, D.M. (1992) Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human B cells. Diabetes 41: 1221 - 1228.78.
- Novaes, G; Ponte, G.; Chaves, A.; Henkes, G.; Amorin, A. e Queiroz, A.C. (1994) Pancreatite crônica por veneno bruto de escorpião em ratos. IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE) :198.
- Oliveira, P.S.L.; Horjales. E. and Caracelli, I (1994) Structural models of three venom toxins from brazilian scorpion. SBBq :134.

- Polis, G.A. (1990) Ecology. In Polis, G.A. (ed). The biology of scorpions . Stanford, Stanford University Press, 587 p.
- Possani, L.D.; Martin, B.M.; Svendsen, I.; Rode, G.S. and Erickson, B.W. (1985) Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *T. serrulatus*. Biochem. J. 229: 739 - 750.
- Possani, L.D., Martins, B.M., Fletcher, M.D. and Fletcher Jr, P.I. (1991) Discharge Effect on Pancreatic Exocrine Secretion Produced by Toxins from *Tityus serrulatus* venom. J. Protein Chem. 296: 3178 - 3186.
- Ramirez, A.N.; Gurrola, G.B.; Martin, B.M. and Possani, L.D. (1988) Isolation of several toxins from the venom scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffman Toxicon 26(9): 773 - 783.
- Ramos, A.O. and Corrado, A.P. (1954) Efeito hiperpietico do veneno total do escorpião *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Reisfield, R.A.; Lewis, W.J. and Willians, D.F. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptide on polyacrylamide gels. Nature 195: 281 - 283.
- Rochat, H.; Rochat, C.; Miranda, F.; Lissitzky, S. and Edman, P. (1970) The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. Eur. J. Biochem. 17: 262.
- Rochat, H.; Bernard, P. and Couraud, I. (1979) In: Advances in Cytopharmacology, vol. 3, Neurotoxins: Tool in Neurobiology (Ceccareli, B. and Clement, F. Eds) New York; raven Press: 325 - 334.
- Rosman, P.; Arkhammar, P. & Berggren, P.O. (1986) Voltage-activated Na⁺ current and their suppression by phorbol ester in clonal insulin-producing RINm 5F cells. Am. J. Physiol. 251 C: 912 - 919.
- Rosso, J. and Rochat, H. (1981). Characterization, from the venom of *A. mauretanicus* *mauretanicus*, of ten proteins including six neurotoxins. Toxicon, 20(1): 76 -77.

- Sissom, W.A.(1990) Systematic, biogeography, paleontology, In Polis, G.A. (ed) The biology of the scorpions Stanford, Stanford University Press. 587p.
- Schanger, H. and Jogow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368 - 379.
- Scott, A.M.; Atwater, I. and Rojas, E. (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cells membrane potential in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia 21: 470 - 475.
- Scott,A.M.; Dawson, C.M. & Gonçalves, A.A.(1985) Comparison of glucose-induced changes in electrical activity, insulin release, lactate output and potassium permeability between normal and ob/ob mouse islets: effect of cooling. J. Endocrinol. 107: 265 - 273.
- Strichartz, G.R. and Wang, G.K. (1986) Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion α -toxins coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve. J. Gen. Physiol 88: 413 - 435.
- Vachon, M. (1953) La biologia de los escorpiones Endeavour. 12: 80 - 89.
- Vandenberg, C.A. & Horn, R. (1984) Inactivation viewed through single sodium channels. J. Gen. Physiol. 84: 535 - 564.
- Vassilev, P.M.; Schever, t. and Catterall, W.A. (1989) Identification of a intracellular peptide segments involved in sodium channel inactivation. Science, 241(1): 1658 - 1661.
- Vijverberg, H.P.M.; Pauron, D. and Lazdunsky, M (1984) The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin g on Na channel in neuroblastoma cells. Pflügers Arch. 401: 297 - 303.
- Wang, G. and Strichartz, G.R. (1982) Simultaneous modification of sodium channel gating by two scorpion toxins. Biophys. J. 40: 175 - 179

- Waternam, J.A. (1938) Some notes on scorpion poisoning in Trinidad. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 31: 607 - 624.
- Wheeler, K.P.; Watt, D.D. and Lazdunski, M. (1983) Classification of Na⁺ channel receptor specific for various scorpion toxins. Pfúger Archiv. 397: 164 - 165.
- Zlotkin, E.; Fraenkel, F.; Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971) The effect of scorpion venom on blowfly larvae - a new method for the evaluation of scorpion venoms potency. Toxicon 9: 1 - 8.
- Zlotkin, E. (1987) Pharmacology of survival: insect selective neurotoxins, derived from scorpion venom. Endeavour 35(4): 168 - 174.