



Universidade de Brasília

Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Isolamento e caracterização de peptídeos
biologicamente ativos presentes na peçonha do
escorpião *Tityus fasciolatus***

Lanuse Caixeta Zanotta

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Fontes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Brasília
2006**

Tese defendida na Universidade de Brasília, em sessão pública no dia 10 de março de 2006, tendo sido aprovada por unanimidade.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro (orientadora)
Departamento de Ciências Fisiológicas
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Wagner Fontes (co-orientador)
Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa (examinador interno)
Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz (examinador externo)
Departamento de Ciências Fisiológicas
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

**“A inteligência humana é uma luz cuja claridade deve ser consagrada à
cooperação com o Supremo Senhor, na Terra”.**

Néio Lúcio/Chico Xavier

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, Pai de todas as horas. A Ele toda minha gratidão e respeito.

Aos meus orientadores Mariana de Souza Castro e Wagner Fontes pelo apoio, amizade, confiança, paciência, incentivo, pelas críticas construtivas e pelo conhecimento transmitido na execução deste trabalho e nos vários projetos desenvolvidos durante a graduação.

Aos meus queridos pais, Pedro José Portugal Zanotta e Maria da Glória Caixeta Zanotta por tudo que são!

Ao meu marido lindo e companheiro fiel de todas as horas!!!

Aos meus avós, tios e primos queridos pelo carinho, apoio, e pela compreensão nos vários momentos de ausência.

Ao professor Dr. Marcelo Valle de Sousa, coordenador do Centro Brasileiro de Pesquisas em Proteínas, pelo incentivo e confiança na execução deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Dr. Carlos André Ricart, Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, Dr. Ricardo Bastos Cunha, Msc. Pedro Portugal Zanotta por contribuírem na minha formação profissional, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e pelos vários bate-papos às vezes, não tão científicos, porém essenciais!

À professora Elizabeth Schwartz, docente do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pela amizade, incentivo e sugestões feitas no decorrer desse trabalho.

Aos professores do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, Antônio Sebben, Carlos Schwartz e Osmindo Jr. pelo apoio, discussões científicas e amizade.

Aos colegas e amigos de bancada do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Adriana, Alexandre, Aline Andrade, Aline Guimarães, Anna, Camila, Carol, Cássio, Carlos Garcia, Carlos Morris, Elaine, Fábio, Flávia Melissa, Flávia, Gabi, Higor, Jaime, Juana, Karina, Leandro, Liudy, Liz, Michele, Mirta, Oscar, Phellipe, Pollyana, Rafael, Rayane, Renan, Sébastien, Stela e Terezinha por todos estes anos de convivência, pelas discussões científicas e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, Carol Mayumi, Cynthia Rodor, Daniel, Flávio, Geraldino e Natan pelas várias conversas, amizade e apoio ao longo desses anos.

Ao Dr. Paulo César Motta, docente do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pelos espécimes de *Tityus fasciolatus*.

Ao Dr. Eduardo Cilli, docente da UNESP (*Campus* de Araraquara), pela síntese do peptídeo Tf2.7.

Ao Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão, docente do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos ensaios neurotóxicos.

À Dra. Maria Cristina O. Salgado, docente do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ribeirão Preto (USP), pelos ensaios sobre pressão arterial.

Ao Dr. Alberto Spisni e à Dra. Thelma A. Pertinhez, do Dipartimento di Medicina Sperimentale Sezione di Chimica e Strutturistica Biochimica da Università degli studi di Parma, Itália, pelos experimentos de dicroísmo circular.

À Dra. Cynthia Maria Kyaw, docente do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, por ceder o espaço do seu laboratório para os ensaios antimicrobianos, pelo incentivo e pela amizade.

Aos funcionários Nuno Manuel Domingues, Fábio Coelho e Antônio Rufino do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e Washington do Laboratório de Toxinologia por serem muito prestativos e pelo apoio técnico.

Aos meus queridos amigos que sempre estiveram presentes em minha vida.

Ao Daniel Sifuentes pela ajuda, boa vontade e paciência nos ensaios cardiotóxicos.

Aos amigos Janaína e Flávio pelas manhãs na FAL e Altiplano Leste me ajudando a virar cupinzeiro e coletar o tal bichinho.

Aos colegas da Pós-Graduação em Biologia Molecular pela motivação e discussões técnicas.

À Ana e a Sandra, da Secretaria de Pós-Graduação da Biologia Molecular, por todo auxílio nesses dois anos.

E, finalmente, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Os Escorpiões	01
1.2 Escorpionismo	02
1.3 A Peçonha	04
1.4. Eletrofisiologia dos Canais Iônicos	06
1.5 Toxinas Escorpiônicas e Canais Iônicos	09
1.5.1. Toxinas e os Canais de Sódio	09
1.5.2. Toxinas e os Canais de Potássio	12
1.5.3 Toxinas e os Canais de Cálcio e Cloro	14
1.6. Toxinas Escorpiônicas e Atividade Cardiotóxica	15
1.7. Toxinas Escorpiônicas e seu Potencial Biotecnológico	18
1.8. Objetivos e Relevância do Trabalho	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Material	20
2.1.1. Animais	20
2.1.2. Obtenção da Peçonha	20
2.1.3. Insumos Químicos	20
2.1.4. Equipamentos	20
2.2. Métodos	21
2.2.1. Purificação dos Peptídeos Bioativos	21
2.2.2. Dosagem de Peptídeos	22
2.2.3. Redução e Alquilação de Peptídeos	22
2.2.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS (Sistema Tris-Tricina)	23
2.2.5. Caracterização Estrutural dos Peptídeos Bioativos Purificados	24
2.2.5.1. Espectrometria de Massa	24
2.2.5.2. Seqüenciamento N-Terminal	25
2.2.5.3. Síntese Química do Peptídeo Tf2.7	25
2.2.5.4. Dicroísmo Circular	26
2.2.6. Análises Computacionais	26
2.2.7. Caracterização Biológica dos Peptídeos Bioativos Purificados	26
2.2.7.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana	26

2.2.7.2 Determinação da Atividade Neurotóxica	27
2.2.7.3 Determinação da Atividade Cardiotóxica	28
2.2.7.3.1. Ensaios de Coração <i>in situ</i> de <i>Rana catesbeiana</i>	28
2.2.7.3.2. Efeitos sobre a Pressão de Perfusão Mesentérica	29
2.2.7.4 Determinação da Atividade Fosfolipásica	30
3. RESULTADOS E DISCUSSAO	32
3.1. Fracionamento da Peçonha de <i>Tityus fasciolatus</i>	32
3.2. Análise por Espectrometria de Massa e Seqüenciamento N-terminal	37
3.3. Peptídeo Tf14	39
3.4. Peptídeo Tf3.5	44
3.5. peptídeo Tf2.7	45
3.5.1. Análise Estrutural por Dicroísmo Circular	46
3.5.2. Ensaios Neurotóxicos (<i>Whole-Cell Patch-Clamp</i>)	49
3.5.3. Ensaios Cardiotóxicos (Coração <i>in situ</i> de <i>R. catesbeiana</i>)	51
3.5.4. Determinação dos Efeitos sobre a Pressão de Perfusão Mesentérica	53
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS	60

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

Tabela 1. Principais espécies do gênero <i>Tityus</i> responsáveis por acidentes no Brasil.	03
Tabela 2. Número total de picos eluídos na cromatografia de fase-reversa em coluna C ₁₈ para cada fração proveniente da filtração em gel.	33
Tabela 3. Análise por MALDI-TOF MS dos peptídeos que foram submetidos à redução e alquilação com 4-vinilpiridina.	38
Tabela 4. Seqüência N-terminal das frações B, C e E com suas respectivas massas moleculares teóricas e experimentais.	39

FIGURAS

Figura 1. Esquema das estruturas externas de um escorpião.	1
Figura 2. Distribuição dos acidentes com escorpiões.	2
Figura 3. Espécies de escorpiões responsáveis pela maioria dos casos de acidentes ocorridos no Distrito Federal entre 1991 e 2001.	4
Figura 4. Cinética do fluxo de potássio nos diferentes tipos de canais.	8
Figura 5. Esquema geral da técnica de <i>patch-clamp</i> .	9
Figura 6. Esquema tridimensional do canal de sódio.	10
Figura 7. Arranjo transmembrânico da subunidade α do canal de sódio.	10
Figura 8. Localização dos sítios receptores de neurotoxinas.	11
Figura 9. Esquema tridimensional do canal de potássio.	12
Figura 10. Esquema das subunidades α formadoras do canal de potássio em eucariotos.	12
Figura 11. Estrutura do canal de potássio KcsA isolado da bactéria <i>Streptomyces lividans</i> .	13
Figura 12. Esquema ilustrativo do canal de cálcio.	14
Figura 13. Esquema da formação da bradicinina e ligação aos seus receptores específicos.	16
Figura 14. Estrutura primária da bradicinina e as regiões de clivagem enzimática.	17
Figura 15. Esquema geral de purificação e caracterização de peptídeos bioativos presentes na peçonha de <i>T. fasciolatus</i>	31
Figura 16. Cromatografia em filtração em gel.	32
Figura 17. Perfis cromatográficos em coluna C ₁₈ resultante do fracionamento das frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 e 12 provenientes da filtração em gel.	35
Figura 18. Espectrogramas (MALDI-TOF MS) do peptídeo Tf14.	41
Figura 19. Eletroforese em sistema Tris-Tricina.	43
Figura 20. Multi-alinhamento entre a seqüência do peptídeo Tf3.5 e os peptídeos BmKK4 e TXKs4 isolados da peçonha do escorpião <i>B. martenssi</i> .	44
Figura 21. Espectro de dicroísmo circular da poli-lisina nas três diferentes conformações (α -hélice, folha- β e estrutura randômica).	46
Figura 22. Espectro de DC do peptídeo Tf2.7 em meio aquoso no pH 4,3 e 7,0.	47
Figura 23. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Tf2.7	

incubado em condições que simulam a presença de membranas biológicas.	47
Figura 24. Efeito do peptídeo TF2.7 sobre a corrente transiente potássio em células GH3.	49
Figura 25. Efeito do peptídeo Tf2.7 sobre a corrente estacionária dos canais lentos de potássio.	50
Figura 26. Efeito da lavagem do peptídeo Tf2.7 sobre a corrente de potássio.	50
Figura 27. Registro esquemático de um potencial de ação de uma célula do miocárdio ventricular.	51
Figura 28. Atividade cardiotoxica do peptídeo Tf2.7 no coração de <i>Rana catesbeiana</i> .	52
Figura 29. Esquema dos estímulos e respostas decorrentes da ligação em receptores por agonistas específicos ou pelo aumento da pressão sobre a célula endotelial (<i>shear stress</i>).	53
Figura 30. Efeitos da aplicação de bradicinina (BK), acetilcolina (ACH) e do peptídeo Tf2.7 (P) sobre a pressão de perfusão mesentérica.	54
Figura 31. Efeitos da aplicação de bradicinina (BK) e do peptídeo Tf2.7 (P) sobre a pressão de perfusão mesentérica na presença do inibidor lisinopril.	54
Figura 32. Efeitos da aplicação de bradicinina (BK) e do peptídeo Tf2.7 (P) sobre a pressão de perfusão mesentérica na presença do antagonista HOE 140.	55
Figura 33. Alinhamento dos BPPs.	56
Figura 34. BPPs isolados da peçonha de <i>Bothrops jararaca</i> .	56
Figura 35. Predição da estrutura secundária da bradicinina.	57

ABREVIATURAS

ABS	Absorvância
ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
ACN	Acetonitrila
BPP	Peptídeos Potencializadores de Bradicinina
BK	Bradicinina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DTT	Ditiotreitol
FPLC	Rápida Cromatografia Líquida de Proteínas
g	Grama
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HCCA	Ácido ciano-4-hidroxicinâmico
L	Litro
LPC	Lisofosfatidilcolina
MALDI -MS	Espectrometria de Massa por Desorção e Ionização Induzida a Laser Assistida por Matriz
PSD	Decaimento após Fonte
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TFA	Ácido Trifluoracético
TFE	Trifluoroetanol
TOF	Analizador de Massa por Tempo de Voo
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano

Aminoácidos

A	Alanina	M	Metionina
C	Cisteína	N	Asparagina
D	Aspartato	P	Prolina
E	Glutamato	Q	Glutamina
F	Fenilalanina	R	Arginina
G	Glicina	S	Serina
H	Histidina	T	Treonina
I	Isoleucina	V	Valina
K	Lisina	W	Triptofano
L	Leucina	Y	Tirosina

RESUMO

Em algumas regiões do mundo, inclusive no Brasil, o número de acidentes com escorpiões é bastante significativo. Devido à necessidade, então, de se produzir antídotos ou anti-soros eficazes para combater os prejuízos causados à saúde humana em decorrência desses acidentes, estudos envolvendo a caracterização química e farmacológica da peçonha desses animais foram intensificados. A peçonha dos escorpiões é composta por vários tipos de moléculas, principalmente polipeptídeos geralmente tóxicos para um grande número de organismos como mamíferos, insetos e crustáceos. Muito se tem estudado sobre as diferentes propriedades fisiológicas e farmacológicas dessas moléculas e atualmente já são conhecidas a atuação em canais iônicos, atividade antimicrobiana, antimalária, fosfolipásica e inseticida. Esse trabalho tem como objetivo principal o isolamento e a caracterização de peptídeos biologicamente ativos presentes na peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*, espécie endêmica do cerrado. Os animais foram coletados na região do Distrito Federal e a peçonha foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada próximo à glândula produtora de peçonha do espécime e, em seguida, liofilizada. A purificação dos peptídeos foi realizada em duas etapas: filtração em gel (Superdex 75 HR 10/30) em tampão formiato de amônia e RP-HPLC (Vydac C18 218TP54) com a eluição mediada pela aplicação de um gradiente linear de acetonitrila. Os peptídeos de interesse foram reduzidos e alquilados com 4-vinilpiridina e suas massas moleculares foram obtidas por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). A estrutura primária dos peptídeos isolados foi obtida por meio da degradação de Edman e também foram realizados ensaios biológicos a fim de se determinar a atividade de tais peptídeos. Três peptídeos que apresentaram bom grau de pureza e abundância tiveram suas estruturas primárias determinadas. O peptídeo Tf14 possui massa molecular igual a 14 kDa e temos indícios de se tratar de um homodímero ligado por pontes dissulfeto; Tf3.5 é um provável bloqueador de canais de potássio, uma vez que possui alta similaridade estrutural com peptídeos dessa natureza e, finalmente, Tf2.7, um peptídeo linear com 25 resíduos de aminoácidos e massa molecular igual a 2,75 kDa. Ensaio biológicos revelaram tratar-se de um peptídeo com atividade semelhante à bradiginina, além de ser capaz de bloquear o fluxo de íons em canais de potássio voltagem-dependentes.

ABSTRACT

In some regions of the world, including Brazil, the number of injuries caused by scorpions is rather relevant. In order to minimize the deleterious effects in human health caused by those injuries by means of counter poison or anti-serum, efforts were expanded to further investigate the biochemical and pharmacological properties of the poison of these animals. The scorpion venom are constituted by several and different kinds of molecules, mainly polypeptides, generally toxic for a large number of organisms like mammals, insects and crustaceans. Much is known about the physiological and pharmacological properties of these polypeptides, including their mode of action on ions channels, anti-malary, anti-microbial, phospholipasic and insecticidal activities. The main objective of this work is the purification and characterization of biologically active peptides present in the venom of the scorpion *Tityus fasciolatus*, an endemic species from cerrado region. The animals were collected in Distrito Federal, and the venom was obtained by gentle electric stimulation next to the producing glandule of the specimen. The peptides were purified in two steps: gel filtration (Superdex 75 HR 10/30) using ammonium formiate buffer, followed by RP-HPLC cromatography (Vydac C18 218TP54). The elution was performed by means of an acetonitrile gradient. The obtained peptides were reduced and alkylated using 4-vinylpyridine and their molecular masses were determined using mass spectrometry analysis (MALDI-TOF MS). The primary structures of these peptides were determined by Edman degradation and several assays were done in order to determine the biological activity of these peptides. Three highly pure and abundant peptides had their primary structures determined: Tf14, with a molecular mass of 14 kDa seems to be an homodimer holded by disulphide bridges; Tf3.5 should act blocking potassium channels since it shares high structural similarities to other scorpion peptides of this nature; and Tf2.7, a linear peptide of 25 amino acids residues with a molecular mass of 2.75 kDa. This peptide exhibits a bradykinin-like activity and is also able of blocking ion fluxes in voltage-dependent potassium channels.

1. Introdução

1.1. Os ESCORPIÕES

Os escorpiões são aracnídeos que se alimentam principalmente de pequenos invertebrados como baratas e grilos. São animais terrestres presentes em todos os continentes do planeta, com exceção da Antártida, estando distribuídos principalmente em florestas tropicais, cerrados e campos. Possuem geralmente hábitos noturnos podendo ser encontrados durante o dia debaixo de cupinzeiros, troncos, tijolos ou telhas [1,2].

O corpo destes animais é dividido em duas regiões principais: prosoma (cefalotórax) e opistossoma (abdômen) revestido por fino e resistente exoesqueleto de quitina que protege as estruturas internas [1].

No cefalotórax, encontram-se os quatro pares de patas, um par de quelíceras e um par de pedipalpos. O abdômen, entretanto, é dividido em pré-abdômen (mesosoma) e pós-abdômen (metassoma). O pós-abdômen é formado por cinco segmentos possuindo, no final, o telson composto por uma vesícula e por um aguilhão (ou ferrão) (Figura 1). Na vesícula estão presentes duas glândulas produtoras de peçonha a qual é inoculada na presa por meio do ferrão [1,2]

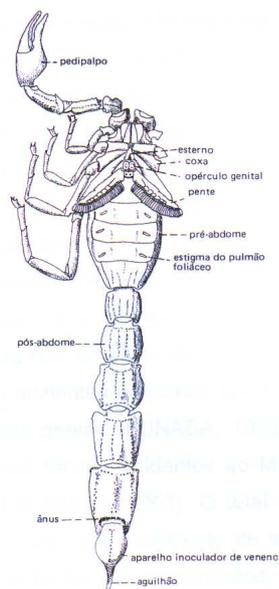


Figura 1. Esquema das estruturas externas de um escorpião^[1].

A presença da peçonha nesses animais é uma arma poderosa na sua alimentação, pois é através dela que o animal consegue capturar e imobilizar suas presas^[3].

1.2. ESCORPIONISMO

Atualmente, 1400 espécies e subespécies de escorpiões já foram descritas, estando distribuídas em nove famílias: *Bothriuridae*, *Buthidae*, *Chactidae*, *Chaerilidae*, *Diplocentridae*, *Ischnuridae*, *Iuridae*, *Scorpionidae* e *Vaejovidae*^[4].

É válido destacar que a família *Buthidae* é a maior e a mais diversificada, possuindo mais de 48 gêneros e 500 espécies. Na América do Sul, seus representantes ocupam quase todo o continente, excetuando-se o extremo sul do Chile e uma parte meridional da Argentina^[5].

O escorpionismo, ou acidentes com escorpião, é um problema que atinge vários países no mundo. Sua gravidade está relacionada à proporção entre a quantidade de veneno injetado e a massa corporal do indivíduo picado. As espécies mais peçonhentas, todas pertencentes à família *Buthidae*, estão distribuídas no norte e meio-oeste da África (gênero *Buthus*, por exemplo), na América do Sul (*Tityus*), Índia (*Mesobuthus*) e no México (*Centruroides*)^[6] (Figura 2).

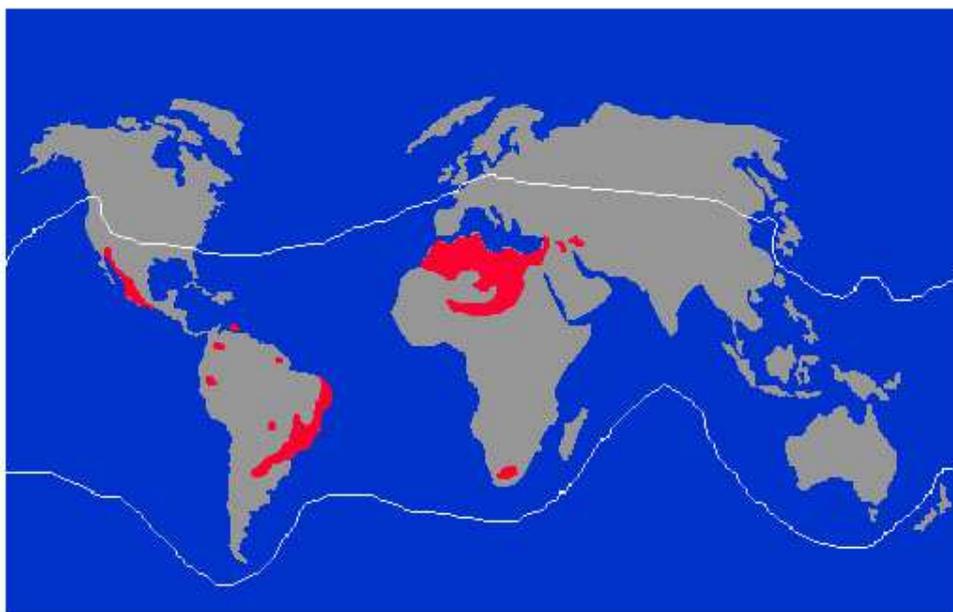


Figura 2. Distribuição dos acidentes com escorpiões. As regiões assinaladas em vermelho apresentam sérios problemas de escorpionismo^[7].

No Brasil, o gênero com maior número de espécies é o gênero *Tityus*, dentro do qual estão as espécies mais peçonhentas encontradas na América do Sul: *Tityus stigmurus* Thorell, 1876; *Tityus bahiensis* Perty, 1833 e *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922.

A maioria dos acidentes notificados no país é causada por *T. serrulatus*, ocorrendo principalmente nos estados de Minas Gerais (em Belo Horizonte) e de São Paulo (em Ribeirão Preto). Por ser uma das espécies mais peçonhentas da América do Sul, esses acidentes são considerados de maior gravidade. No Distrito Federal, os acidentes são causados, na maior parte das vezes, por *T. serrulatus*, *T. fasciolatus* e, finalmente, por *Bothriurus araguayae* (Tabela1)^[8].

Tabela 1. Principais espécies do gênero *Tityus* responsáveis por acidentes no Brasil.

NOME CIENTÍFICO	NOMES POPULARES	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
<i>T. bahiensis</i>	Escorpião marrom	MG, SP, PR, SC, RS, GO, MS
<i>T. cambridgei</i>	Escorpião preto	AP, PA
<i>T. costatus</i>	-----	MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS
<i>T. fasciolatus</i>	-----	GO, DF
<i>T. metuendus</i>	-----	AC, AM, PA, RO
<i>T. serrulatus</i> ¹	Escorpião amarelo	BA, MG, ES, RJ, SP, DF, GO, PR
<i>T. silvestris</i>	-----	AC, AM, AP, PA
<i>T. stigmurus</i>	-----	BA, SE, AL, PE, PB, RN, CE, PI

¹ Espécie partenogenética responsável pelos acidentes de maior gravidade registrados no país, incluindo óbitos.

Dentre essas, a espécie *Tityus fasciolatus* (Figura 3) é endêmica do cerrado, podendo ser encontrada no microhabitat típico: embaixo do cupinzeiro do gênero *Armitermes*^[8].

No período compreendido entre 1991 a 2001, o número de acidentes no Distrito Federal subiu de 51 casos para 121 sendo que 60,2% foram causados pela espécie *T. serrulatus*, 31,9% por *T. fasciolatus* e 7,9% por *Bothriurus araguayae* (Figura3)^[8].

A necessidade de se produzir antídotos ou anti-soros eficazes para combater os prejuízos causados à saúde humana em decorrência desses acidentes, aumentou o interesse em se fazer um estudo mais detalhado da peçonha desses animais.

Na década de 80, Possani *et al.* descreveram o primeiro peptídeo neurotóxico isolado da peçonha do escorpião mexicano *Centruroides noxius* denominado

noxiustoxina^[9]. Desde então, diversos trabalhos têm sido publicados demonstrando a composição química e biológica das moléculas presentes na peçonha de várias espécies de escorpiões ao redor do mundo.



Tityus fasciolatus (Foto: A. Sebben)



Tityus serrulatus (Foto: E. M. Mota)



Bothriurus araguayae (Foto: E. Wienskoski)

Figura 3. Espécies de escorpiões responsáveis pela maioria dos casos de acidentes ocorridos no Distrito Federal entre 1991 e 2001.

1.3. A PEÇONHA

A peçonha desses animais é composta por um coquetel de polipeptídeos, geralmente tóxicos para um grande número de organismos como mamíferos, insetos e crustáceos^[10]. Além disso, possui enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas e outros componentes ainda não identificados^[11].

Muito se tem estudado sobre as diferentes propriedades fisiológicas e farmacológicas dessas moléculas que podem ser classificados mais amplamente em

polipeptídeos que possuem pontes dissulfeto e aqueles que não possuem pontes dissulfeto, sendo o primeiro grupo melhor caracterizado^[12].

A grande maioria dos que possuem pontes dissulfeto interfere com a atividade de canais iônicos presentes em células excitáveis e não-excitáveis da presa, sendo denominadas neurotoxinas. No entanto, já foram descritos peptídeos com atividade fosfolipásica, com atividade antimalária, inseticidas e, em 2002, foi identificado o peptídeo BmKAPI, isolado de *Buthus martensii*, que possui atividade inibitória de proteinase e cinco pontes dissulfeto^[13, 14].

Por outro lado, poucos peptídeos sem pontes dissulfeto foram identificados e caracterizados. Até o momento, as atividades mais comumente encontradas, nessa classe, são a antimicrobiana (como a pandinina isolada de *Pandinus imperator* e a hadrurina purificada de *Hadrurus aztecus*), a potencializadora de bradiginina (como o peptídeo K12 isolado de *Buthus occitanus*), a imuno-moduladora (parabutoporina de *Parabuthus schlechteri*) e a hemolítica (IsCT de *Opisthacanthus madagascarienses*)^[12, 15, 16, 17].

A descoberta de peptídeos antimicrobianos na peçonha de escorpiões é bastante interessante, uma vez que várias bactérias apresentam resistência a diversos antibióticos empregados atualmente. Assim, a busca por novas fontes de compostos antimicrobianos tem crescido muito nos últimos anos, em especial, a identificação de compostos com novos mecanismos de ação.

O nível de expressão das toxinas presentes na peçonha depende de diversos fatores como: variação genética, distribuição geográfica, sexo, idade, entre outros. Um estudo realizado com indivíduos da espécie *Opisthacanthus madagascariensis* por Yamaji *et al.* (2004) demonstrou, pela primeira vez, que realmente há diferença na composição da peçonha em indivíduos de sexos diferentes. Foi identificada, apenas nos machos, a presença da toxina IsTX, uma potente neurotoxina que atua em canais iônicos de potássio^[18].

Uma importante contribuição advinda de toxinas neurotóxicas é que elas têm sido utilizadas para elucidar o mecanismo de ação dos diversos tipos de canais iônicos voltagem-dependentes presentes nas células, bem como a função de cada componente formador desses canais^[19].

1.4 ELETROFISIOLOGIA DOS CANAIS IÔNICOS

Canais iônicos são moléculas protéicas formadoras de poros na membrana celular capazes de permitir o fluxo de íons. Estão distribuídos na grande maioria das células eucariotas e participam de diversas funções celulares^[20].

Dentre os diversos tipos de canais, os voltagem-dependentes são os mais amplamente estudados, podendo ser divididos em diferentes classes de acordo com suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. Várias combinações entre esses tipos de canais são utilizadas por diferentes células (não só as excitáveis), dependendo da função que cada célula desempenha no organismo^[20].

Canais presentes em células excitáveis têm como principal função a propagação de potenciais de ação dentro da célula. O potencial de ação (PA) é definido por variações rápidas do potencial de membrana através da transferência de cargas positivas para o interior da célula com subsequente retorno dessas cargas para o exterior.

Para tanto, basicamente, dois tipos de canais voltagem-dependente são responsáveis por todas as características essenciais do PA^[21]. Os canais de Na⁺ voltagem-dependente são responsáveis pela despolarização da membrana. Esses canais se abrem rapidamente, permitindo um grande influxo de Na⁺, fazendo com que o potencial de membrana antes de -70mV passe a ser em torno de +35mV. Atingindo esse potencial, os canais de sódio começam a se fechar e os de potássio se abrem permitindo, agora, um rápido efluxo de K⁺ restabelecendo assim o potencial de membrana. Essa fase é chamada de repolarização da membrana^[21].

O canal de potássio, dentre os canais iônicos, é, com certeza, o mais estudado e parece estar presente em cada célula eucariótica do organismo^[22]. Esses canais estão envolvidos em uma gama de funções biológicas abrangendo desde o controle da excitabilidade da membrana celular até a regulação de vias de transdução de sinais indicando que eles, provavelmente, compõem a classe mais importante em termos de modulação^[22,23].

Embora haja uma grande diversidade de canais de potássio, a classificação dos mesmos não é algo trivial, entretanto, de uma forma geral, é possível dividi-los em 3 classes, baseado em diferenças na abertura desses canais, a saber: os voltagem-dependentes, os ativados por cálcio e os ligante-dependentes^[22, 24, 25].

A abertura dos canais voltagem-dependentes está energeticamente acoplada à mudança no potencial de membrana da célula. Pode-se subdividi-los em três tipos^[26] (Figura 4):

1) Canais lentos – a abertura desses canais é lenta e começa a ocorrer no ápice da despolarização, permitindo o efluxo de potássio e início da repolarização da membrana.

2) Canais anômalos – presentes principalmente em fibras musculares esqueléticas e cardíacas. Esses canais permitem o influxo de potássio na fase de hiperpolarização da membrana, ajudando assim a restabelecer o potencial de repouso.

3) Canais transientes – canais de cinética rápida, ou seja, que abrem e fecham muito rápido. Permitem um rápido efluxo de potássio contribuindo no início da repolarização.

A segunda classe de canais são representados pelos cálcio-dependentes, os quais se abrem devido a um aumento na concentração intracelular deste íon^[24].

Em termos funcionais, sabe-se que, nos neurônios, esses canais atuam na fase de repolarização do potencial de ação; nos nervos e nas células musculares eles levam à fase de hiperpolarização e em glândulas de secreção, tais como a salivar e lacrimal, esses canais são responsáveis pela liberação de K^+ durante a secreção do fluido^[27].

De uma forma geral, os canais de potássio ativados por cálcio podem ser divididos em três tipos: grandes (BKca), intermediários e pequenos. Os dois primeiros dependem tanto da concentração intracelular do cálcio como da despolarização da membrana para abrirem. Os pequenos por sua vez, são ativados apenas pelo cálcio.

O nome desses canais se deve ao tipo de condutância, ou seja, os BKca exibem uma condutância entre 100-250 pS enquanto os pequenos de 5-15 pS. Entende-se por condutância (C) a facilidade com que determinado íon atravessa a membrana celular ($C=1/R$, onde R é resistência)^[24].

Desde o início desse século, diversas funções fisiológicas dos canais BKca, presentes em diferentes tipos celulares, vem sendo descritas, como na imunidade inata dos leucócitos, no reconhecimento das proteínas heme-ligantes e em um mecanismo de proteção contra isquemia celular^[27].

Os canais de cálcio-dependentes têm sido caracterizados extensamente nos últimos anos e, provavelmente, um dos motivos para isso seja o papel que os níveis intracelulares de cálcio desempenham na sinalização celular^[21].

Geralmente, vários tipos de canais de potássio podem ser encontrados em uma mesma célula, indicando que essa diversidade não é devida unicamente às diferenças entre os tipos celulares^[22]. A utilização de técnicas mais sofisticadas de eletrofisiologia, como *patch-clamp*, permitiu que a lista dos canais de potássio aumentasse significativamente^[24,22].

Na Figura 4, observa-se a cinética das correntes nos principais tipos de canais de potássio. Pelos gráficos, pode-se observar a direção do fluxo dos íons de potássio bem como a duração da corrente.

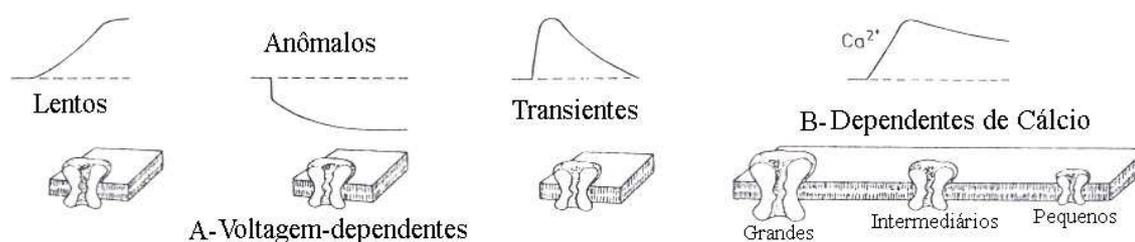


Figura 4. Cinética do fluxo de potássio nos diferentes tipos de canais^[24].

Finalmente, a última classe é representada pelos canais ligante-dependentes, os quais dependem da ligação de um íon, uma pequena molécula orgânica ou até mesmo de uma proteína para que se abram^[25].

Erwin Neher e Bert Sakmann desenvolveram, em 1976, a técnica denominada *patch-clamp* a qual revolucionou o estudo da eletrofisiologia por permitir isolar a corrente de um tipo específico de canal iônico em diversos tipos celulares e em uma grande variedade de espécies^[21, 26, 28].

Essa técnica consiste em se colocar uma micropipeta de vidro, de diâmetro entre 1-2 μm , em contato com a membrana plasmática da célula. É necessário isolar eletricamente uma pequena área da membrana plasmática contendo um pequeno número de canais. Na região de contato é aplicada uma pequena sucção o que provoca uma alta resistência (vedação) entre a micropipetea e a superfície celular, daí o nome *patch-clamp*. Desse modo, a corrente produzida por um canal aberto pode ser, facilmente, monitorada por um circuito elétrico (Figura 5)^[21, 26].

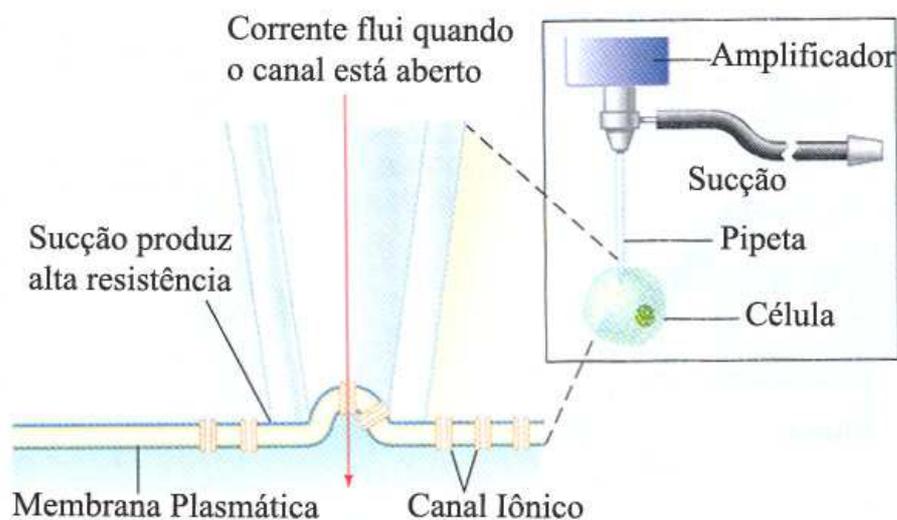


Figura 5. Esquema geral da técnica de *patch-clamp* ^[21]

Atualmente, existem diversas variações da técnica de *patch-clamp*, no entanto, a mais utilizada é a chamada *whole-cell*, a qual assegura que a corrente registrada na pequena porção da membrana reflete a corrente existente em toda superfície celular ^[26]. Por causa das peculiaridades do *whole-cell* foi possível, pela primeira vez, analisar biofisicamente diversos tipos celulares, particularmente as de tamanho pequeno ^[28].

1.5. TOXINAS ESCORPIÔNICAS E CANAIS IÔNICOS

Os peptídeos neurotóxicos são divididos em classes, famílias e subfamílias, de acordo com as suas características estruturais e efeitos fisiológicos. Atualmente, são descritas quatro grandes classes, sendo a primeira formada por neurotoxinas que atuam especificamente em canais de sódio, a segunda por aquelas que modulam a atividade dos canais de potássio, a terceira por moléculas que atuam em canais de cálcio e a quarta por aquelas que interferem na atividade de canais de cloro ^[19].

1.5.1. TOXINAS E OS CANAIS DE SÓDIO

O canal de sódio é formado por uma grande proteína denominada α de 260 kDa. Essa proteína, além de possuir quatro domínios transmembrânicos

homólogos, está associada, normalmente, a pequenas subunidades β (Figura 6). Cada domínio possui seis regiões transmembrânicas (S1-S6) (Figura 7)^[21].

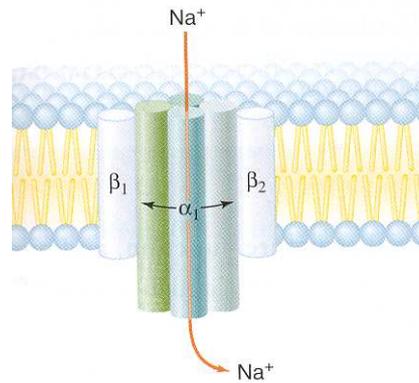


Figura 6. Esquema tridimensional do canal de sódio^[21]

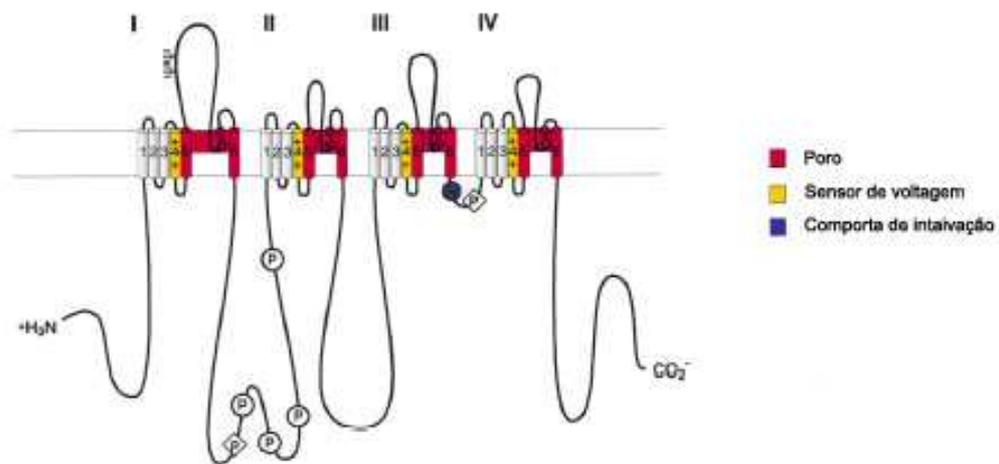


Figura 7. Arranjo transmembrânico da subunidade α do canal de sódio. Mapa funcional do canal: em vermelho está representado o poro (S5/S6); em amarelo, o sensor de voltagem (S4) e em azul, a comporta de inativação^[31].

As toxinas escorpiônicas que atuam nos canais de sódio são divididas em duas grandes famílias baseado no papel fisiológico que elas desempenham na abertura do canal, são elas: α -toxinas e β -toxinas. Porém, todas elas apresentam um centro estrutural em comum, a topologia $\beta\alpha\beta\beta$ ^[29].

As α -toxinas são peptídeos de cadeia longa constituídos de 60 a 70 resíduos de aminoácidos e que contêm quatro pontes dissulfeto. Elas foram divididas em três

grupos: (a) **clássico**: que apresentam maior atividade nos canais de mamíferos, (b) **inseticida**: alta atividade em canais de insetos e (c) **α -like**: que atuam tanto em canais de insetos como de mamíferos^[30].

As β -toxinas são também peptídeos de cadeia longa, porém possuem de 60 a 65 resíduos de aminoácidos e apresentam quatro pontes dissulfeto^[31]. Essas toxinas foram divididas em três grupos principais: **clássico**, **depressor** e **excitatório**^[29]. O primeiro grupo é ativo em mamíferos e o segundo e o terceiro apenas em insetos^[30]. Toxinas depressoras induzem uma lenta depressão e uma paralisia flácida precedida por uma fase transiente de contratura no inseto. Entretanto, ao se injetar as toxinas excitatórias, elas induzem uma rápida paralisia rígida^[30].

Além da diferença citada, as α -toxinas escorpionicas diferenciam-se das β -toxinas por interagirem em sítios diferentes no canal de sódio. Enquanto as primeiras se ligam no sítio três (no domínio IV) da subunidade α , retardando a inativação do canal, as β -toxinas se ligam ao sítio 4 (no domínio II), diminuindo o limiar de excitabilidade para a abertura do canal de sódio (Figura 8)^[31].

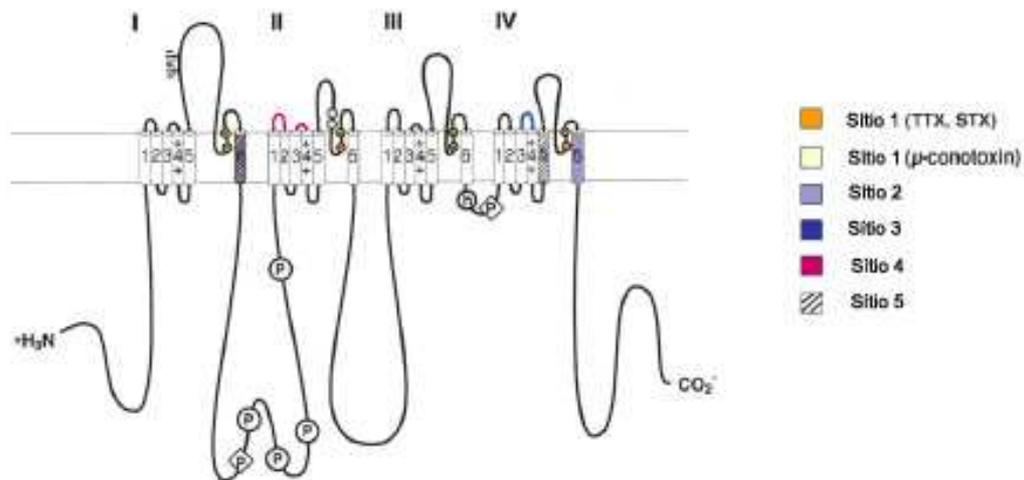


Figura 8. Localização dos sítios receptores de neurotoxinas. Em azul, o sítio 3, no qual as α -toxinas se ligam e em rosa, o sítio 4, onde as β -toxinas se ligam^[31]. Os sítios 1,2 e 5 representados na figura são sítios onde se ligam diversas outras toxinas isoladas de animais de outras ordens.

O estudo dessas toxinas tem recebido cada vez mais atenção devido à sua importância médica e aos interesses em caracterizar os efeitos farmacológicos em nível molecular.

Antigamente, acreditava-se que a peçonha de escorpiões seria uma fonte de toxinas específicas para os canais de sódio voltagem-dependente. Entretanto, estudos com a peçonha bruta mostraram que associado aos efeitos produzidos nesses canais, a corrente de potássio também era bloqueada. Esse fato foi um forte indício de que existiriam famílias distintas de toxinas que atuavam em canais de K^+ [32].

1.5.2. TOXINAS E OS CANAIS DE POTÁSSIO

A segunda classe é formada por peptídeos que modulam a atividade de canais de potássio. O canal de potássio é um complexo oligomérico de quatro subunidades α monoméricas arranjadas simetricamente em volta de um poro central. Associadas a elas, estão quatro subunidades β (Figura 9). Semelhante ao canal de sódio, cada subunidade possui seis regiões transmembrânicas (S1-S6) (Figura 10)^[21].

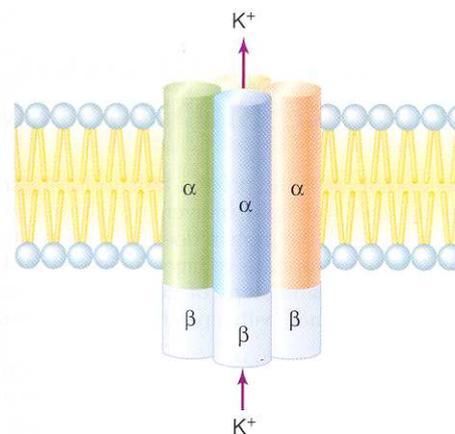


Figura 9. Esquema tridimensional do canal de potássio^[21].

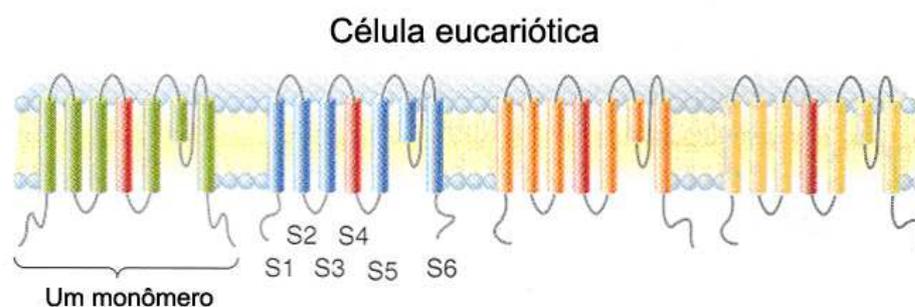


Figura 10. Esquema das subunidades α formadoras do canal de potássio em eucariotos. Cada subunidade possui seis regiões transmembrânicas (S1-S6)^[21].

Em 1998, o grupo liderado por Roderick MacKinnon determinou a estrutura tridimensional do canal de potássio registrando um grande marco no estudo dos canais iônicos (Figura 11) ^[32], reconhecido com o Prêmio Nobel de Química em 2003.

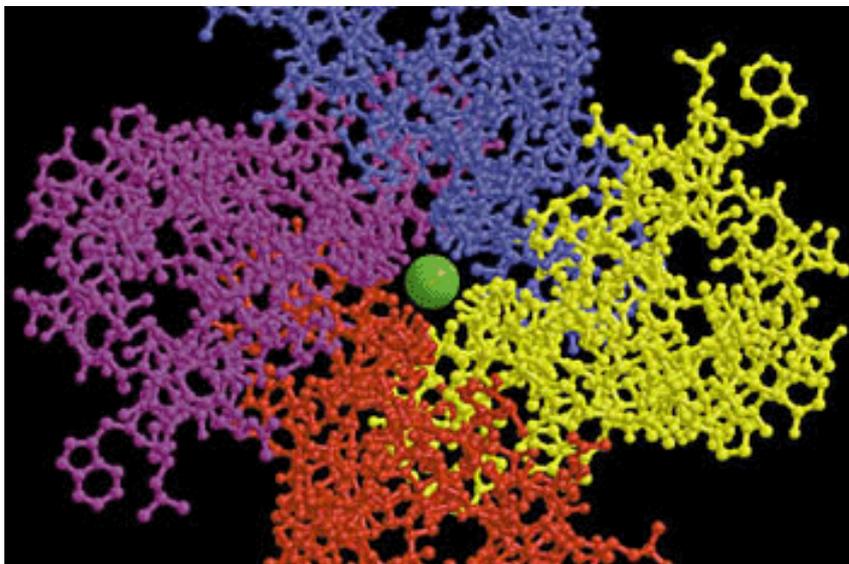


Figura 11. Estrutura do canal de potássio KcsA isolado da bactéria *Streptomyces lividans*. Cada subunidade do canal está representada por uma cor diferente. No centro do canal, observa-se um íon de potássio (em verde). Imagem obtida no sítio: <http://www.hhmi.org/news/mackinnon.html>.

A primeira toxina bloqueadora do canal de potássio a ser isolada e seqüenciada foi a noxiustoxina (NTX) do escorpião mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann em 1982 por Possani *et al.* ^[33]. Trata-se de um peptídeo básico com 39 resíduos de aminoácidos capaz de bloquear vários tipos de canais de K^+ de diversos tecidos sem afetar a corrente dos canais de sódio ^[10, 32]

Após essa descoberta, cerca de 120 toxinas já foram isoladas da peçonha de diversos escorpiões e provavelmente muitas outras ainda o serão, fato que indica a grande diversidade de toxinas que atuam em canais de potássio existentes na peçonha desses aracnídeos.

Em geral, essas neurotoxinas são menores que aquelas que atuam nos canais de sódio, possuindo de 30 a 45 resíduos de aminoácidos e contendo três ou quatro pontes dissulfeto. Entretanto, recentemente, Batista *et al.* (2000) descreveram a toxina Tc1 isolada de *Tityus cambridgei* que possui apenas 23 resíduos de aminoácidos, revelando-se a menor toxina bloqueadora de canais de potássio conhecida ^[34].

Uma característica interessante dos peptídeos dessa classe é a presença conservada do motivo CS- $\alpha\beta\beta$, ou seja, uma α -hélice ligada a duas folhas- β por duas pontes dissulfeto^[9, 35, 36].

As toxinas isoladas de diversas espécies de escorpião, que bloqueiam ou modificam a permeabilidade dos canais de potássio, são divididas basicamente em três famílias (α -, β - e γ -) sendo cada uma dividida em várias sub-famílias^[9].

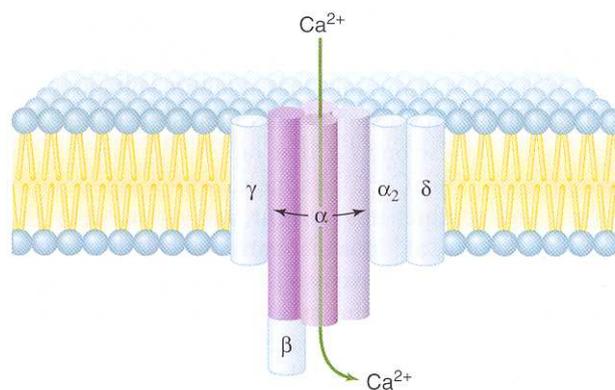
A família α -KTx é a mais diversificada, possuindo 18 sub-famílias. Os peptídeos pertencentes a essa família possuem de 23 a 40 resíduos de aminoácidos com três ou quatro pontes dissulfeto^[19].

1.5.3. TOXINAS E OS CANAIS DE CÁLCIO E CLORO

O canal de cálcio é, também, muito semelhante ao canal de sódio. É formado por uma grande subunidade chamada α , associada a pequenas subunidades denominadas α_2 , β , γ e δ (Figura 12A).

Além disso, a proteína principal possui quatro domínios, cada um com seis regiões transmembrânicas (S1-S6) (Figura 12B)^[21].

A.



B.

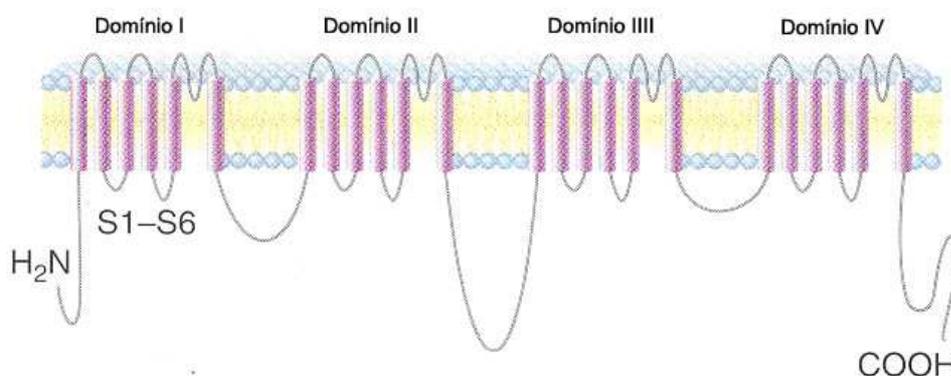


Figura 12. Esquema ilustrativo do canal de cálcio. A. Visão tridimensional. B. Representação dos quatro domínios juntamente com suas seis regiões transmembrânicas^[21].

Apenas dois peptídeos compõem essa classe: um que contém 33 resíduos de aminoácidos enquanto o outro, apenas 22 resíduos.

Os canais de cloro são até hoje pouco conhecidos, entretanto, em 1993, Debin *et al.* isolaram da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* a primeira toxina que bloqueia esse canal: a clorotoxina. Trata-se de um peptídeo pequeno, com massa molecular de 4 kDa, com quatro pontes dissulfeto e que apresenta similaridade de seqüência com uma classe de pequenos peptídeos inseticidas^[37].

Desde então, moléculas como BelT₅A isolada de *Buthus eupeus*, Amm P2 de *Androctonus mauretanicus*, peptídeo I de *Buthus indicus* e, mais recentemente, Bm-12 um pequeno peptídeo de 35 resíduos de aminoácidos com 4 pontes dissulfeto isolado de *Buthus martensi karsch* foram consideradas como membros da família da clorotoxina por apresentarem um alto grau de similaridade com a mesma^[38].

1.6. TOXINAS ESCORPIÔNICAS E ATIVIDADE CARDIOTÓXICA

O sistema multiprotéico cinina-caliceína representa uma cascata metabólica que, quando ativada, provoca a liberação de cininas vasoativas^[39].

Na maioria dos mamíferos, inclusive nos humanos, o termo “cinina” se refere, principalmente, ao nonapeptídeo, chamado de bradicinina (BK) e ao decapeptídeo calidina (KD). Elas são derivadas dos cininogênios os quais sofrem a ação das enzimas denominadas caliceínas^[40].

Por causa da sua capacidade de ativar as células endoteliais, permitindo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e mobilização do ácido aracdônico, as cininas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como regulação da pressão sangüínea e renal, estimulação da atividade da musculatura lisa e em processos patológicos ligados à inflamação^[39].

A fim de exercerem suas atividades farmacológicas, as cininas, ligam-se a receptores específicos antes de serem metabolizadas por várias peptidases. Atualmente, existem fortes evidências que quatro metalopeptidases dependentes de zinco são as principais responsáveis pela hidrólise da BK^[39].

Atualmente, dois receptores de BKs em mamíferos estão descritos na literatura: B₁ e B₂. O receptor B₂ é expresso constitutivamente tendo como agonistas as cininas, enquanto a expressão do receptor B₁ está associada à injúrias no tecido, à interação com endotoxinas bacterianas, além de ter mais afinidade por cininas degradadas (Figura 13)^[41].

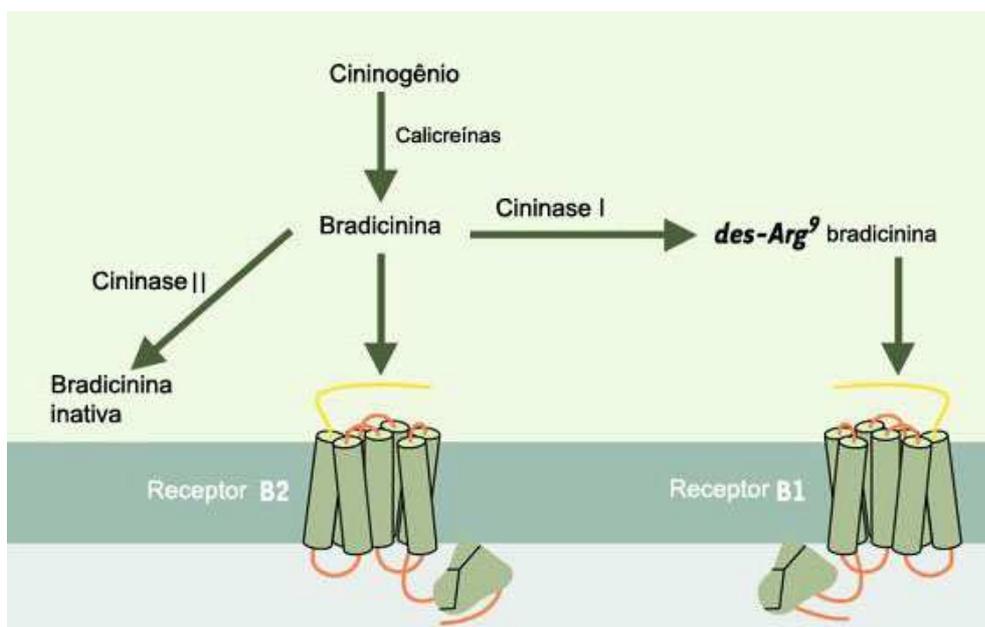


Figura 13. Esquema da formação da bradicinina e ligação aos seus receptores específicos^[42].

Uma das metalopeptidases que hidroliza as cininas é a ACE, enzima conversora de angiotensina, cuja função é regular a atividade de peptídeos vasoativos como a angiotensina I (ANG I) e BK, catalisando a liberação hidrolítica de dois resíduos de aminoácidos na região C-terminal do oligopeptídeo^[43].

Por ter uma alta afinidade com a bradicinina, a ACE é também chamada de cininase II. Ela inativa a BK hidrolizando, em duas etapas, a região C-terminal (Figura 14)^[39].

O papel fisiológico melhor conhecido desta enzima é no sistema renina-angiotensina onde a ACE catalisa a conversão da ANG I (decapeptídeo) em angiotensina II, um potente vasopressor constituído por 8 resíduos de aminoácidos que estimula a liberação da aldosterona permitindo a retenção do íon sódio^[40, 43].

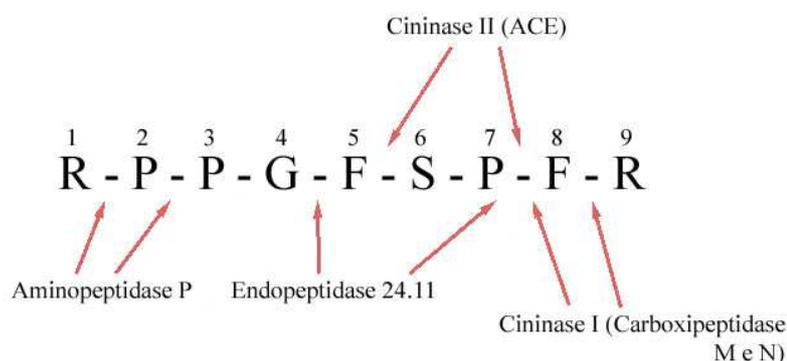


Figura 14. Estrutura primária da bradicinina e as regiões de clivagem enzimática^[39].

A inibição desta enzima tem sido utilizada como alvo no tratamento de hipertensão e falência cardíaca devido ao seu duplo papel fisiológico^[40].

Devido ao papel central desempenhado pelo sistema cinina-caliceína, vários animais venenosos e peçonhentos apresentam moléculas capazes de influir na pressão sanguínea e em outros processos fisiológicos das suas presas. Tal estratégia é muito comum em serpentes e em alguns escorpiões, através da síntese de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs)^[44].

Os BPPs também são capazes de inibirem a atividade da ACE, por isso, foram essenciais para o desenvolvimento do primeiro inibidor sítio-dirigido dessa enzima, o CAPTOPRIL, comumente usado no tratamento de hipertensão em humanos^[45].

Em 1970, Ferreira *et al.* caracterizaram o primeiro BPP isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*^[46]. A partir de então, vários peptídeos potencializadores de BK presentes em anfíbios, aranhas e em serpentes já foram descritos^[40]. Na década de 90, os peptídeos potencializadores de BK,T e K12 foram isolados da peçonha dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Buthus occitanus*, respectivamente. O primeiro possui 13 resíduos de aminoácidos e o segundo 21, embora atuem de

formas semelhantes (ativando a contração da musculatura lisa, inibindo ACE e diminuindo a pressão arterial), eles apresentam baixa similaridade estrutural^[12,40].

1.7. TOXINAS ESCORPIÔNICAS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Os venenos de animais têm sido considerados a principal fonte de moléculas bioativas. A grande diversidade de estruturas químicas juntamente com as promissoras atividades biológicas podem ser utilizada, em termos biotecnológicos, de várias maneiras como, por exemplo, na prospecção de novas drogas ou servindo de base para produção de novos compostos terapêuticos^[47].

Dentre essa diversidade de moléculas, os peptídeos vêm chamando cada vez mais a atenção dos pesquisadores por serem estruturas pequenas, possíveis de serem produzidos seja por síntese química como por meio da tecnologia do DNA recombinante e por desempenharem um papel importante em vários processos fisiológicos e regulatórios^[47, 48].

Porém, por estarem presentes geralmente em baixas concentrações na natureza e por serem moléculas pequenas, apenas recentemente, seu estudo tornou-se mais aprimorado, graças principalmente ao surgimento de técnicas mais modernas de análise com grande acurácia, como a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC/MS) ou a cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massa *in tandem* (LC/MS/MS) que possibilitam a identificação e o seqüenciamento de peptídeos^[47].

Como descrito anteriormente, diversas atividades biológicas de peptídeos já são conhecidas, fato que incentiva a buscas de alternativas para usá-las de forma terapêutica no tratamento de doenças graves como câncer, mal de Alzheimer, malária^[48].

Um outro aspecto bastante preocupante é o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos comercialmente disponíveis, como *Streptococcus pneumoniae* (resistente à penicilina), *Pseudomonas aeruginosa* (resistente a multidrogas - RM), *Staphylococcus aureus* (RM), *Staphylococcus epidermidis* (RM), *Salmonella* (RM), *Escherichia coli* (resistente a um grande espectro de β -lactamases)^[49]. Nesse contexto, existe um forte empenho em se caracterizar diversos peptídeos antimicrobianos justamente por eles possuírem mecanismos de ação diferentes das drogas utilizadas atualmente, ou seja, esse tipo de molécula,

geralmente catiônica, interage eletrostaticamente com a membrana do patógeno, lisando-a. Esse mecanismo de ação mais generalizado dificulta o aparecimento de resistência a tais peptídeos^[48,49].

Entretanto, existem alguns obstáculos no desenvolvimento de medicamentos dessa natureza como, por exemplo, o custo de produção, desconhecimento dos efeitos citotóxicos que precisam ser superados antes que peptídeos antimicrobianos sejam viabilizados para o tratamento de doenças infecciosas. Até superar essas dificuldades, a administração tópica pode ir remediando o problema. Alguns peptídeos já estão em fase clínica de experimentação^[50].

A grande maioria dos peptídeos antimicrobianos isolados da peçonha de escorpiões são hemolíticos, entretanto, eles podem ser potencialmente usados em aplicações tópicas na cavidade oral, a fim de inibir o crescimento de bactérias que estão associadas ao desenvolvimento de cáries e formação de placas, bem como em infecções de pele.

Fica claro que, embora haja diversos obstáculos a serem superados, os futuros medicamentos provavelmente serão constituídos por peptídeos, mesmo que o processo para otimização da eficácia dessas novas drogas seja lento^[48].

1.8. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Este trabalho teve como objetivo principal o isolamento e a caracterização química e biológica de peptídeos biologicamente ativos presentes na peçonha do escorpião *Tityus fasciolatus*. Tal projeto está inserido dentro das linhas de pesquisa tradicionalmente desenvolvidas nos Laboratórios de Toxinologia e de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília, sendo que a escolha dessa espécie ocorreu pelo fato de ser uma espécie endêmica do cerrado, fato mais que suficiente para justificar nosso interesse particular, mas principalmente porque, em virtude do vertiginoso crescimento demográfico do Distrito Federal, o número de acidentes vem aumentando nos últimos anos. Além do interesse epidemiológico, acreditamos existir uma grande diversidade de toxinas com potencial biotecnológico na peçonha dessa espécie, cuja descrição química e biológica será útil na fabricação de soros anti-escorpiônicos mais eficazes, bem como no desenvolvimento de novas drogas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. ANIMAIS

Exemplares de *Tityus fasciolatus* foram coletados na região do Distrito Federal. Os animais foram mantidos em cativeiro no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, até o momento da coleta da peçonha. Após este procedimento, os espécimes foram cedidos ao Prof. Dr. Paulo Motta do Laboratório de Aracnídeos da Universidade de Brasília sendo tombados na coleção. Na realização desse trabalho, utilizamos a peçonha obtida de 8 indivíduos.

2.1.2. OBTENÇÃO DA PEÇONHA

A peçonha de *T. fasciolatus* foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada próximo à glândula produtora de peçonha do animal. A peçonha liberada foi dissolvida em água Milli-Q, congelada e liofilizada. A amostra liofilizada foi alíquotada em tubos *ependorf* contendo, em cada um, 6,0 mg da peçonha e estocada a -20°C, até o momento do uso. É importante ressaltar que nenhum animal foi sacrificado durante este procedimento.

2.1.3. INSUMOS QUÍMICOS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou de alta pureza (“sequanal grade”). Na preparação das soluções foi utilizada água Milli-Q (Ultra Pure Water System, Millipore).

2.1.4. EQUIPAMENTOS

Agitador Thermomixer comfort (Eppendorf)

Amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments)

Bomba LKB-2115 (LKB)

Centrífuga (Eppendorf)

Centrífuga a vácuo Speed-Vac SC-100 (Savant)

Coluna cromatográfica de filtração em gel Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech)

Colunas cromatográficas de fase-reversa pré-empacotadas: C₁₈ 218TP54 e e C₄ 214TP54 (Vydac , Separations Group)

Espectrofotômetro UV-VIS Ultrospec II (LKB)

Espectrômetro de massa API 300 (Perkin-Elmer Sciex)

Espectrômetro de massa Reflex IV (Bruker Daltonics)

Espectropolarímetro (Jasco-810)

Leitora de placas modelo 3550-UV (Biorad)

Medidor de pH (Digimed)

Polígrafo (NARCO Bio-Systems)

Pré-amplificador (NARCO Bio-Systems)

Seqüenciador Automático de Proteínas e Peptídeos de Líquido Pulsátil modelo 477A/120A (Applied Biosystems)

Sistema controlador de temperatura (Peltier Jasco PFD-425S)

Sistema de eletroforese Mini Protean II Cell (BioRad)

Sistema de HPLC (LKB): Unidade controladora mod. 2152

Bombas mod 2150

Registrador mod. 2210

Detector (λ variável) mod 2141

Software: PClamp6 (Axon Instruments), Clampfit (Axon Instruments) e SigmaPlot 5 (SPSS Inc.)

Transdutor isométrico F-60 (NARCO Bio-Systems)

2.2. MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir encontra-se essencialmente resumida no esquema da Figura 15.

2.2.1. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Alíquotas de 6,0 mg da peçonha liofilizada de *T. fasciolatus* foram dissolvidas em 200 μ L de tampão formiato de amônio pH 4,8 150 mM (Tampão A) e centrifugadas por 20 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de filtração em gel Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com tampão A. As frações foram eluídas com este tampão com fluxo

constante de 0,8 mL/min, sendo monitoradas a 280 nm, coletadas manualmente, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

Todas as frações coletadas foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se coluna de fase-reversa Vydac C₁₈ 218TP54 (4,6 x 250 mm) previamente equilibrada com TFA 0,1% (v/v). Cada fração foi ressuspensa em 200 µL de TFA 0,1% (v/v) e centrifugada durante 15 min a 14.000 rpm antes de ser aplicada à coluna. As frações foram eluídas usando-se um gradiente linear de acetonitrila (0-100%), contendo TFA 0,1% (v/v), com fluxo de 0,8 mL/min e detecção a 216 nm. As frações eluídas foram coletadas manualmente e secas em Speed-Vac.

2.2.2. DOSAGEM DE PEPTÍDEOS

A concentração de cada peptídeo purificado por HPLC da peçonha de *T. fasciolatus* foi determinada pelo método “Far UV Absorbance” (determinação da concentração protéica por absorvância em UV distante) segundo Aitken & Learmonth (1996)^[51]. Esse método baseia-se na diferença de absorvância de componentes protéicos em diferentes comprimentos de onda (215 nm e 225 nm). A absorvância em 225 nm é subtraída da absorvância encontrada em 215 nm. A diferença é multiplicada por 144, resultando na concentração da proteína em µg/µL.

2.2.3. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DE PEPTÍDEOS

As toxinas purificadas por RP-HPLC foram dissolvidas em 100 µL de tampão desnaturante (cloridato de guanidina 6,0 M, Tris-HCl 0,3 M, pH 8,6) adicionado de DTT (na proporção 1,5 mg de DTT para 1,0 mL de tampão desnaturante). As amostras ficaram incubadas sob agitação constante de 400 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após esse período, 2 µL de 4-vinilpiridina foram adicionados sob atmosfera de nitrogênio. As toxinas foram novamente incubadas a 37°C sob agitação constante de 400 rpm durante 1h.

Em seguida, cada fração foi dessalinizada utilizando-se coluna de fase reversa (Vydac C₄ 214TP54) em sistema de HPLC. A coluna foi equilibrada previamente com TFA 0,1% (v/v) e a eluição ocorreu devido à utilização de um gradiente linear de acetonitrila com TFA a 0,1% (v/v), com fluxo de 0,8 mL/min e detecção em 216 nm.

As frações eluídas foram coletadas manualmente e secas em centrífuga a vácuo Speed-Vac.

2.2.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS (SISTEMA TRIS-TRICINA)

A fim de se avaliar a massa molecular do peptídeo Tf14 foi realizada uma corrida eletroforética em sistema Tris-Tricina (que é especialmente recomendado para a resolução de proteínas na faixa de 1 a 100 kDa), utilizando-se o sistema de eletroforese Mini-Protean II Cell da Bio-Rad com placas de vidro de 6 x 8 cm e espessura de 1,0 mm. Para tanto foram utilizadas as seguintes soluções e o procedimento descrito a seguir.

SOLUÇÕES:

- a) Tampão Anódico (inferior): Tris-HCl 0,2 mol/L pH 8,9
- b) Tampão Catódico (superior): Tris 0,1 mol/L pH 8,25, contendo Tricina 0,1 mol/L e SDS 0,1% (v/v)
- c) Tampão do Gel: Tris-HCl 3,0 mol/L pH 8,45, contendo SDS 0,3% (v/v)
- d) Acrilamida/Bisacrilamida 49,5%T, 3%C: 48% acrilamida (p/v) e 1,5% (p/v) bisacrilamida
- e) Acrilamida/Bisacrilamida 49,5%T, 6%C: 46,5% (p/v) acrilamida e 3% (p/v) bisacrilamida
- f) Tampão de Amostra (pH 6,8): Tris-HCl 0,05 mol/L pH 6,8, contendo SDS 4% (p/v), Glicerol 12% (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (v/v)

PROCEDIMENTO:

Componentes	Gel concentrador (4%T, 3%C)	Gel espaçador (10%T, 3%C)	Gel separador (16,5%T, 6%C)
sol.c	0,80 mL	2,5 mL	2,5 mL
sol. D	0,25 mL	1,5 mL	---
sol. E	----	---	2,5 mL
Uréia	----	---	2,7 g
água destilada	2,10 mL	3,5 mL	qsp 7,5 mL
PAS 10%	25 μ L	25 μ L	25 μ L
TEMED	3 μ L	3 μ L	3 μ L

Ao montar-se a placa, o gel separador (4,3 cm) foi colocado primeiro e, imediatamente após, foi colocado o gel espaçador (1,0 cm) para que os dois polimerizassem juntos. Após a polimerização, adicionava-se o gel concentrador (2,0 cm) e colocava-se o pente. As amostras foram dissolvidas em solução f e incubadas durante 30 minutos a 40°C.

A corrida eletroforética foi realizada inicialmente com voltagem de 30 V, até que a amostra penetrasse totalmente no gel concentrador. Após isso, a voltagem era elevada para 100 V sendo mantida constante até o final da corrida.

Para a revelação das bandas protéicas foi utilizado nitrato de prata segundo procedimento descrito por Blum *et al*^[52].

2.2.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS PURIFICADOS

2.2.5.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os peptídeos purificados tiveram suas massas moleculares determinadas por meio de espectrometria de massa, utilizando-se espectrômetros de massa modelos API 300 triple-quadrupole da PE-Sciex ou Reflex IV da Bruker Daltonics.

Nas análises por MALDI-TOF, as amostras foram ressuspensas em uma solução contendo 50% de ACN em 0,1% TFA (v/v). Após a solubilização, 1µL de cada amostra e 1 µL de solução de matriz [α-ácido α-hidroxicinâmico (HCCA) 10 µg/µL dissolvido em acetonitrila em TFA 0,1% e TFA 0,1% (66:34) eram aplicados e misturados em diferentes poços de uma placa de aço inoxidável.

.Os espectros foram obtidos usando o modo refletor positivo e o modo linear com aplicação de 20 a 30 pulsos de laser sobre a amostra. O espectrômetro de massa foi previamente calibrado com uma mistura de peptídeos (*Peptide Mix*) no modo refletor positivo e uma solução de citocromo C no modo linear.

2.2.5.2. SEQÜENCIAMENTO N-TERMINAL

As frações de interesse foram submetidas ao seqüenciamento automático por meio da degradação de Edman em um seqüenciador automático de proteínas modelo 477A da Applied Biosystems, modificado segundo Fontes *et al*.^[53].

2.2.5.3. SÍNTESE DO PEPTÍDEO Tf2.7

O peptídeo Tf2.7 foi sintetizado manualmente de acordo com o protocolo de Atherton e Sheppard, 1989^[54]. Os seguintes grupos de proteção da cadeia lateral foram utilizados: Boc (t-butoxicarbonil) para K, tBut (t-butil) para D, T e E, Pmc (2,2,5,7,8-pentametil-chromane-6-sulfonil) para Q e N. Cada ciclo de síntese consistiu em desproteger N^α-Fmoc com piperidina/dimetilformamida (DMF) 20% (v/v) durante 20 min, seguido por lavagem com DCM (diclorometano) e DMF e acoplamento no próximo resíduo. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com DMF e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada etapa de acoplamento foi efetuado um teste de ninidrina. Este reagente, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul. Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, portanto, indicativo da eficiência do passo de acoplamento. A clivagem do peptídeo ao final da síntese foi realizada pela adição de um coquetel contendo água ultrapura 5% (v/v), fenol 5% (v/v), 1,2 etanoditiol (EDT) 2,5% (v/v), tioanisol 5%, (v/v) em TFA, durante duas horas de agitação. Após esse tempo, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado, e filtrado em placa porosa juntamente com a resina. O peptídeo, que permaneceu na placa, foi dissolvido em ácido acético 10% (v/v) em solução aquosa e separado da resina por filtração. O filtrado foi liofilizado, obtendo-se o peptídeo bruto.

O peptídeo, após a dissolução em TFA/H₂O 0,045% (v/v) [solvente A], foi purificado em um sistema de HPLC utilizando-se coluna C₁₈ de fase-reversa semi-preparativa (Beckman 1 cm x 25 cm) e eluído em um gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila com TFA a 0,036% (v/v) [solvente B] durante 90 min. A detecção utilizada foi de 220 nm e o fluxo aplicado foi de 5 mL/min. A homogeneidade do peptídeo sintetizado foi checada por meio de RP-HPLC analítico (Varian), usando os solventes A e B em um gradiente de 5-95% B durante 30 minutos com fluxo de 1,5

mL/min e detecção em 220 nm. A identidade do peptídeo sintético foi confirmada por análise em espectrômetro de massa do tipo *electrospray* (Micromass, UK) e por análise de aminoácidos (Shimadzu model LC-10A/C-47A).

2.2.5.3 Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados utilizando um espectropolarímetro Jasco-810 acoplado a um sistema controlador de temperatura (Peltier Jasco PFD-425S). O peptídeo Tf 2.7 foi dissolvido em água deionizada, trifluoretanol (TFE), micelas de SDS e em lisofosfatidilcolina (LPC). Os dados do dicroísmo circular foram registrados usando-se uma célula de 1 mm em um espectro que variou entre 190-260 nm a 37°C. Cada espectro é resultado da média de quatro varreduras consecutivas. Após a correção da linha de base, ajuste de concentração por efeitos de diluição (no caso de adição de SDS) e confirmação posterior da concentração do peptídeo por análise de aminoácidos, a elipsidade observada, θ (miligráus), foi convertida para a elipsidade molar média do resíduo, $[\theta]$ (graus por centímetro quadrado por decimol). A porcentagem de hélice-R foi calculada como descrito previamente^[55].

2.2.6. ANÁLISES COMPUTACIONAIS

A partir das seqüências obtidas procederam-se análises computacionais objetivando-se determinar o grau de similaridade com famílias de toxinas já descritas na literatura. Para o cumprimento deste objetivo foi utilizado o programa BLASTP disponível no sítio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. A busca foi feita no banco de dados “nr” (não-redundante) e o parâmetro utilizado foi o próprio *default* (padrão) do BLAST.

2.2.7. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS PURIFICADOS

2.2.7.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A fim de se determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo Tf2.7 isolado por RP-HPLC foi feito um ensaio usando-se diluições seriadas das amostras em placas de microtitulação estéreis.

Inóculos das bactérias patogênicas *Escherichia coli* (Gram-negativa, ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva, ATCC 25923) foram cultivados em

meio Mueller Hinton a 37°C sem agitação até atingir uma absorvância de 1,000 a 590 nm. A absorvância foi monitorada por meio de espectrofotômetro (LKB). Após atingir a fase logarítmica de crescimento, cada cultura bacteriana foi diluída na seguinte proporção: 1:50 (em meio Mueller Hinton) para bactérias Gram-negativas; 1:10 (em meio LB) para bactérias Gram-positivas.

O peptídeo foi ressuspendido em água Milli-Q e esterilizados em filtro Millipore (0,22 µm). Na placa foi feita diluição seriada em triplicata. Do segundo ao oitavo poços foram colocados 50 µL de água Milli-Q estéril e no primeiro poço, foi colocado 100 µL do peptídeo, na concentração inicial de 256 µM dissolvido em água Milli-Q estéril. A diluição seriada consistiu em retirar 50 µL do primeiro poço passar para o segundo, misturar bem, em seguida, retirar 50 µL da solução do segundo e passar para o terceiro, assim por diante, com a ressalva de que ao final, os 50 µL do último poço foram descartados.

Em seguida, 50 µL da cultura bacteriana (contendo 5×10^5 bactérias) foram acrescentados a cada poço, ficando cada poço com um volume final de 100 µL. Dessa forma, a concentração final do peptídeo no primeiro poço era de 128 µM.

Foram feitos controles empregando-se formaldeído esterilizado (50 µL de formaldeído 0.4% (v/v) e 50 µL da cultura de bactérias) e água Milli-Q estéril (50 µL de água e 50 µL da cultura de células).

A placa foi lida após 19 horas de incubação em estufa a 37°C em uma leitora de placas (modelo 3550-UV da Biorad) no comprimento de onda de 595 nm.

2.2.7.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA

Células GH3 (células de tumor de hipófise de ratos) foram mantidas em meio Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM)-HEPES suplementado com 1% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina e incubados a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi trocado três vezes por semana. Para os registros eletrofisiológicos, as células foram separadas e semeadas em uma placa de Petri de 45 mm de diâmetro. A separação foi feita com tripsina 0,1% (p/v) e EDTA 1 mM adicionados ao meio de cultura sem soro. Normalmente, as células eram utilizadas entre 1 e 2 dias após a tripsinação.

As correntes dos canais de potássio foram registradas em temperatura ambiente (24-28°C) utilizando, para tanto, a técnica *whole-cell patch-clamp*. Os

dados foram adquiridos por meio de um amplificador Axopatch 200B controlado pelo *software* PClamp6 (Axon Instruments, Union City, USA) e amostrados a 20 kHz e filtrados a 5 kHz. O protocolo de voltagem para registrar as correntes foi o seguinte: a um potencial conservado em -80 mV foram aplicados pulsos (-70 mV a 60 mV) durante 80 ms. O desvio e as correntes capacitivas foram subtraídas digitalmente utilizando o procedimento *P/4 on line*. A fim de se analisar as correntes em função do tempo, o pulso teste foi estabelecido a 50 mV.

As pipetas foram construídas com capilares de vidro e com uma resistência de 2-4 MΩ. As células foram seladas em uma solução-controle contendo NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, glicose 10 mM pH 7,4 ajustado com NaOH. Na solução experimental, o peptídeo Tf 2.7 foi diluído com a solução-controle até alcançar a concentração final de 1 μM. Durante os registros, a célula investigada foi continuamente perfundida com solução-controle e solução experimental por meio de uma pipeta capilar de 0,1 mm de diâmetro em contato direto com a célula. A perfusão foi checada previamente com solução livre de Na⁺ e o desaparecimento da corrente de sódio foi verificado com eficácia. As pipetas foram preenchidas com uma solução contendo: KCl 140 mM, EGTA 5 mM e HEPES 10 mM ajustado para um pH de 7,2 com KOH. Os dados foram analisados *off-line* com Clampfit (Axon Instruments, Union City, USA) e SigmaPlot 5 (SPSS Inc., Richmond, CA, USA).

2.2.7.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOTÓXICA

2.2.7.3.1. ENSAIO DE CORAÇÃO *IN SITU* DE *RANA CATESBEIANA*

Exemplares de *Rana catesbeiana*, pesando entre 280 e 300g, foram imobilizados pela destruição do sistema nervoso central e fixados em decúbito dorsal, pelos membros, a uma prancha de dissecação. Uma incisão da pele e dos músculos abdominais foi feita, expondo-se os órgãos viscerais. Procedeu-se, então, a canulação da veia cava posterior com um tubo de polietileno contendo solução de Ringer (NaCl 111 mM; KCl 1,0 mM; CaCl₂ 1,1 mM; NaHCO₃ 2,4 mM). A seguir, seccionou-se o esterno e o pericárdio, de modo a expor o coração, que foi suspenso com o auxílio de uma pinça cardíaca, conectada ao ápice do ventrículo. Os registros foram realizados por intermédio de um transdutor isométrico F-60, conectado a um polígrafo, ambos da NARCO Bio-Systems. No mesmo bioensaio, foram feitos,

também, registros da atividade elétrica ventricular. Para tal, foi utilizado um eletrodo de sucção que consiste em um tubo de polietileno, com uma das extremidades acoplada a uma seringa, responsável por criar uma pressão negativa no interior do tubo. Na outra extremidade, foi inserido um eletrodo de prata cloretada (Ag/AgCl_2), que foi conectado a um pré-amplificador (High-Gain Coupler, NARCO Bio-Systems). Cerca de um terço do tubo de polietileno foi preenchido com Ringer, mantendo-se a região de contato com o músculo cardíaco sempre molhada. Os registros elétricos foram feitos simultaneamente aos registros das contrações musculares, também no polígrafo. Após a montagem do bioensaio, foram feitos registros dos padrões normais de atividade elétrica e das contrações cardíacas. A toxina Tf2.7 de *T. fasciolatus* foi perfundida na concentração de 256 μM através da cânula na veia cava e os registros acompanhados por um período de 120 minutos.

2.2.7.3.2. EFEITOS SOBRE A PRESSÃO DE PERFUSÃO MESENTÉRICA (MPP)

Os experimentos foram conduzidos em ratos Wistar com peso corporal entre 220 e 250g. Os animais foram mantidos em ambiente controlado submetidos a ciclos de luz:escuridão de 12 em 12h e foi oferecida água e alimentos *ad libitum*. Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, ip) e seus leitões mesentéricos removidos e preparados para perfusão em um banho mantido a 37°C. As artérias mesentéricas foram, então, perfundidas utilizando solução de Krebs's (modificada): NaCl 120.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 3.0 mM, MgCl_2 1.4 mM, NaHCO_3 25.0 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, glicose 11.0 mM e EDTA 0.03 mM equilibrada com uma mistura contendo 95% O_2 /5% CO_2 a 37°C em uma velocidade constante de 4 mL/min (LKB-2115 multiperplex pump). A pressão de perfusão mesentérica foi monitorada com um transdutor de pressão (Hewlett-Packard 1280) conectado ao braço lateral da cânula da artéria mesentérica. O efeito promovido pelo peptídeo Tf2.7 (25-100 μg) foi determinado em leito arterial mesentérico pré-contraído com fenilefrina e comparado com o efeito induzido por uma única dose de bradicinina (BK, 1 ng) ou acetilcolina (Ach, 20 ng). Para investigar o papel do óxido nítrico e de prostaglandinas no efeito vasodilatador do peptídeo Tf2.7, o inibidor de NOS L-NNA (200 μM) e o inibidor de COX diclofenaco (10 μM) foram adicionados à solução de perfusão. Também foi avaliado se o peptídeo Tf2.7 é capaz de potencializar o efeito da BK por inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE). Nesse caso, o efeito do

peptídeo Tf2.7 foi investigado na presença do inibidor de ACE lisinopril (5 μ M) ou com o peptídeo Tf2.7 administrado imediatamente antes de BK. As respostas foram expressas como porcentagem de decréscimo na pressão de perfusão mesentérica (MPP) de artérias pré-contraídas com fenilefrina. Os resultados foram submetidos ao teste-t para análise de significância da correlação ($P < 0.05$).

2.2.7.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Foi preparada uma solução contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 10 mM e Triton X-100 0,5% (v/v). A uma alíquota de 12 mL desta solução, acrescentou-se 0,3 g de fosfatidilcolina (concentração final 2,5% (p/v)). A solução foi submetida a sonicação por 1 hora a fim de se dissolver por completo a fosfatidilcolina. Após dissolução, foram adicionados 240 μ L de Vermelho Fenol 0,15% (p/v). Em cada tubo foram colocados 2,5 mL da solução reagente, sendo também preparados controles negativos com a adição de 100 μ L de água destilada e controles positivos com a adição de 100 μ L (10 mg/mL) de peçonha liofilizada de *Crotalus durissus terrificus*. Nos tubos-teste foram adicionados 100 μ L (0,1 μ g/ μ L) da toxina Tf14. Os tubos foram incubados a 37°C durante vinte e quatro horas e, após incubação, foram acrescentados a cada tubo 20 μ L de NaOH 1 M. A coloração resultante em todas as amostras testada foi sempre comparada com a coloração do controle negativo observada a olho nu.

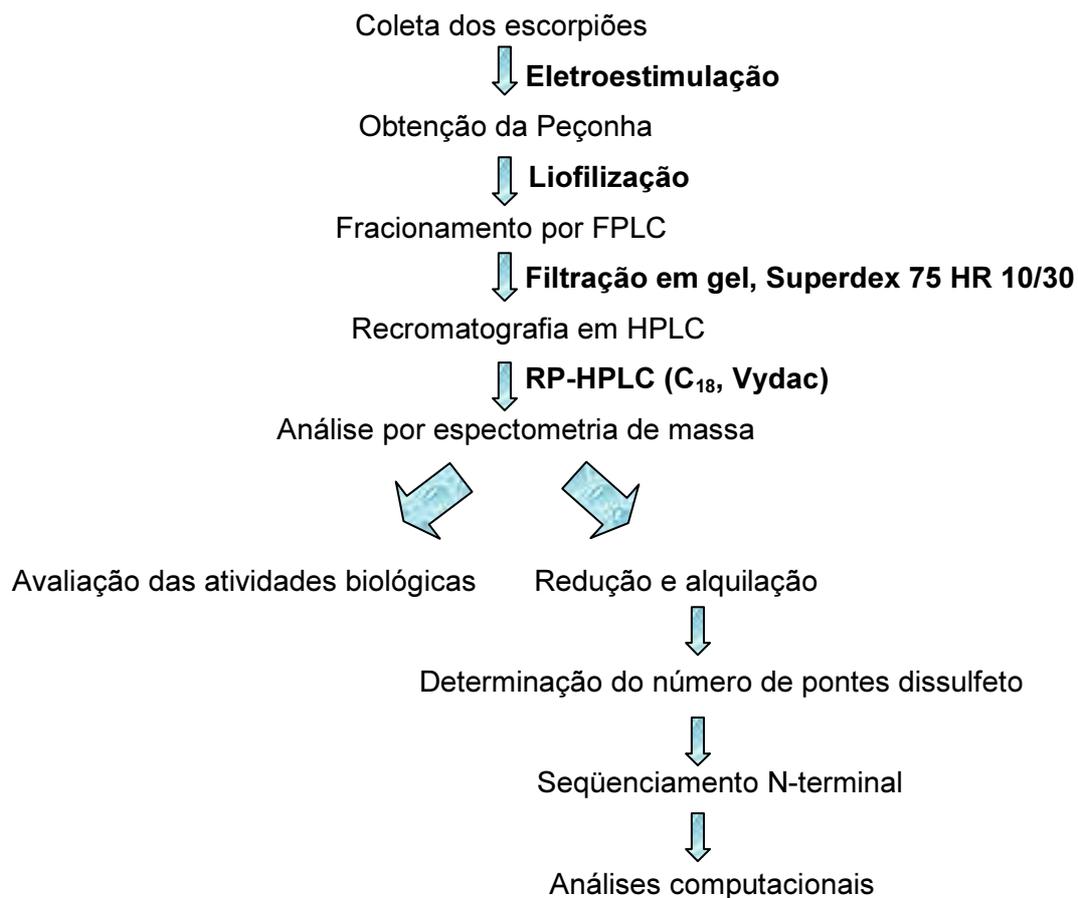


Figura 15. Esquema geral de purificação e caracterização de peptídeos bioativos presentes na peçonha de *T. fasciolatus*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DE *Tityus fasciolatus*

No fracionamento da peçonha bruta de *T. fasciolatus* foi adotado o procedimento descrito por Wagner, 2003^[6]. Assim, a peçonha foi primeiramente submetida à cromatografia por filtração em gel em sistema de FPLC, usando-se coluna Superdex 75 HR 10/30. Doze frações foram eluídas, coletadas e secas a vácuo em Speed-Vac (Figura 16). O perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao descrito por Wagner, mas infelizmente foi observada uma perda na capacidade de resolução da coluna, talvez devido ao desgaste natural da coluna pré-empacotada utilizada.

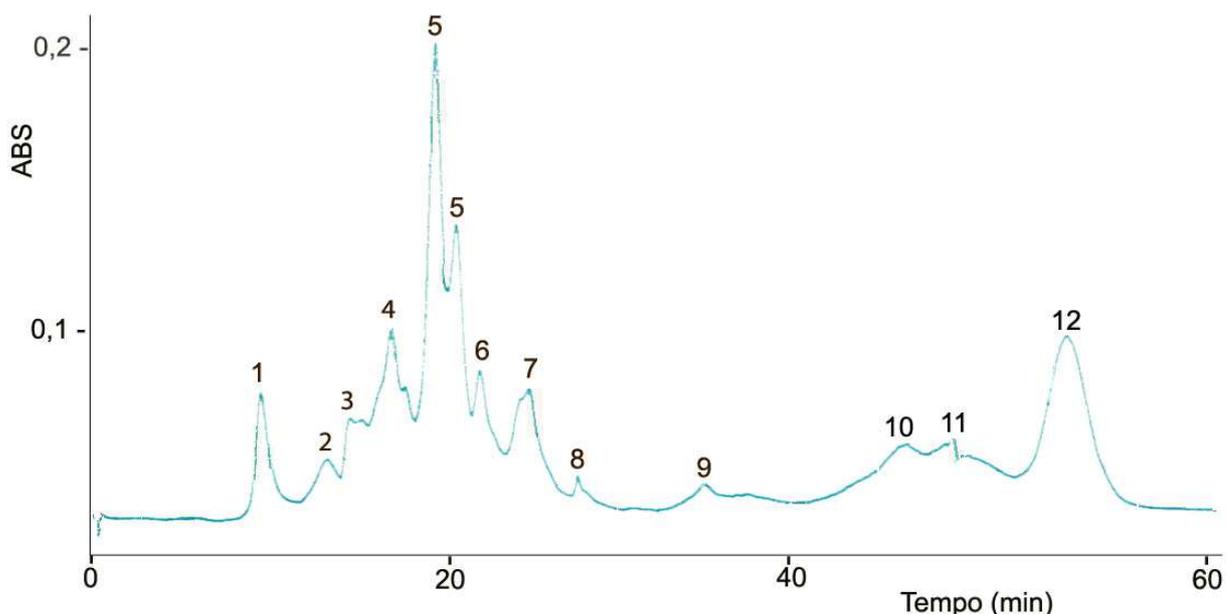


Figura 16. Cromatografia por filtração em gel. Alíquotas de 6,0 mg da peçonha liofilizada de *T. fasciolatus* foram dissolvidas em 200 μ L de tampão formiato de amônio 150 mM (pH 4,8) e centrifugadas por 20 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de filtração em gel Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com tampão formiato de amônio 150 mM (pH 4,8). As frações foram eluídas com tampão formiato de amônio com fluxo constante de 0,8 mL/min, sendo monitoradas em 280 nm, coletadas manualmente, liofilizadas e armazenadas a -20°C .

É importante comentar que, por uma limitação técnica, só foi possível monitorar a eluição cromatográfica em 280 nm, o que pode ter resultado em alguma perda de material peptídico o qual não é detectado nesse comprimento de onda.

Nos trabalhos desenvolvidos por Wagner^[6] foi detectada atividade neurotóxica em todas as frações provenientes da filtração em gel realizada nessas mesmas condições. Por esse motivo, decidiu-se submeter as frações obtidas a um segundo passo de purificação, utilizando-se agora uma coluna de fase-reversa C₁₈ (Tabela 2), a fim de se isolar o maior número possível de peptídeos bioativos presentes nessa peçonha.

Nas frações 1, 8 e 9 não se observou a eluição de nenhum pico significativo durante a cromatografia de fase-reversa, o que pode ser explicado pelo fato de não existirem componentes que absorvam em 216 nm nessas frações ou porque as moléculas presentes nessas frações por serem muito hidrofóbicas se ligaram irreversivelmente à coluna ou ainda porque o material sofreu precipitação dentro da coluna ao entrar em contato com a acetonitrila. O total de picos eluídos nas cromatografias das frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 e 12 em coluna C₁₈ está apresentado na Figura 17.

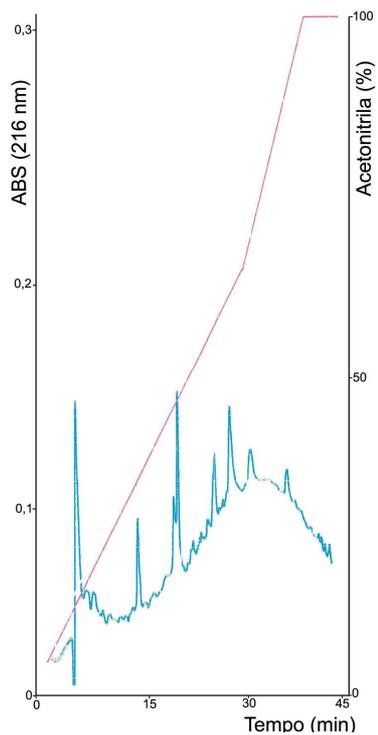
Tabela 2. Número total de picos eluídos na cromatografia de fase-reversa em coluna C₁₈ para cada fração proveniente da filtração em gel.

Fração proveniente da filtração em gel	Total de picos eluídos na cromatografia em C ₁₈ (Vydac 218TP54)
1	0
2	9
3	10
4	11
5	18
6	10
7	13
8	0
9	0
10	4
11	5
12	4

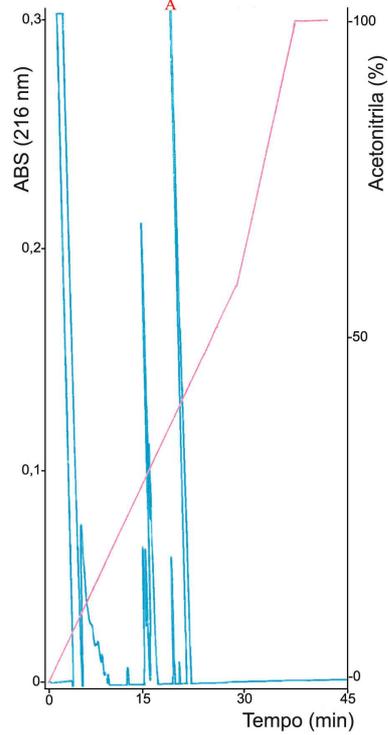
Total: 84 frações eluídas.

Cinquenta e sete frações, provenientes das diversas cromatografias de fase-reversa realizadas (Figura 17), foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) a fim de se determinar a massa molecular, o grau de pureza e a abundância dos componentes presentes em cada fração. Dezesete frações que apresentaram maior abundância e um bom grau de pureza, características determinadas pelo exame dos espectros de massas obtidos, foram então reduzidas e alquiladas para verificar, se presente, a quantidade de resíduos de cisteína em cada molécula. Dessas dezessete somente em nove frações foi possível se detectar tais quantidades (Tabela 3). As outras oito podem ter sido perdidas durante o processo de purificação, após a redução e alquilação, ou então não terem sido ionizadas durante os experimentos de MALDI-TOF.

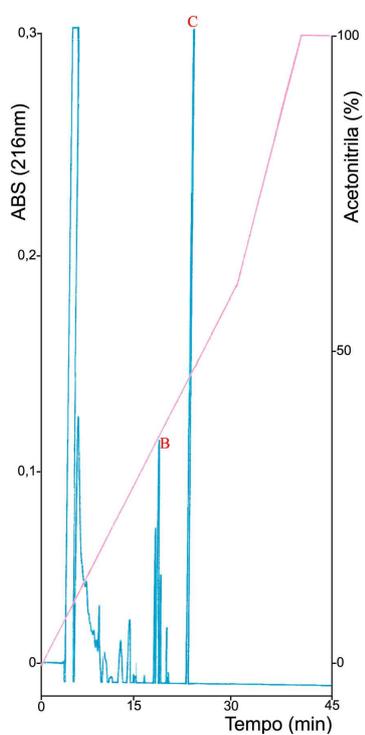
Fração 2



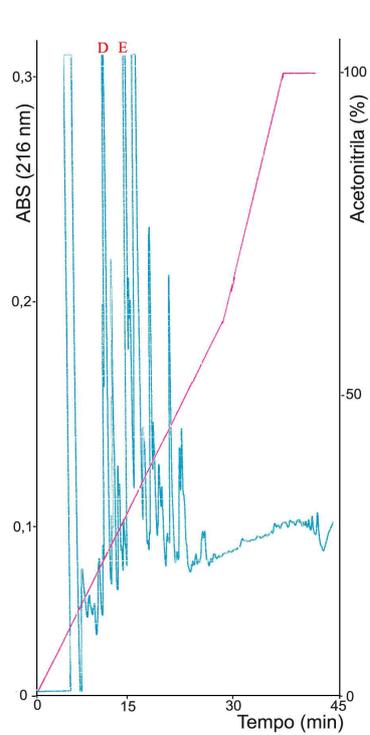
Fração 3



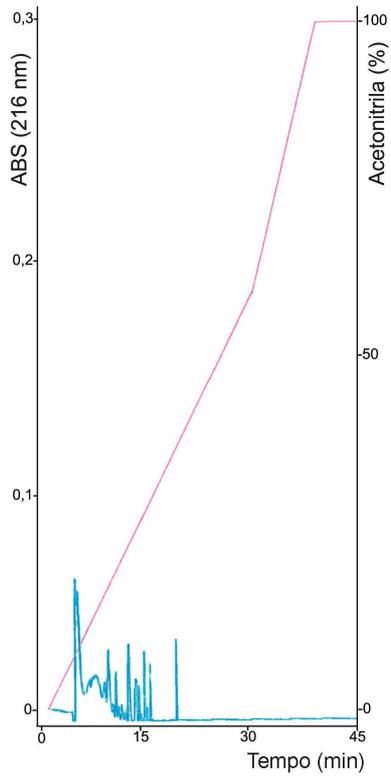
Fração 4



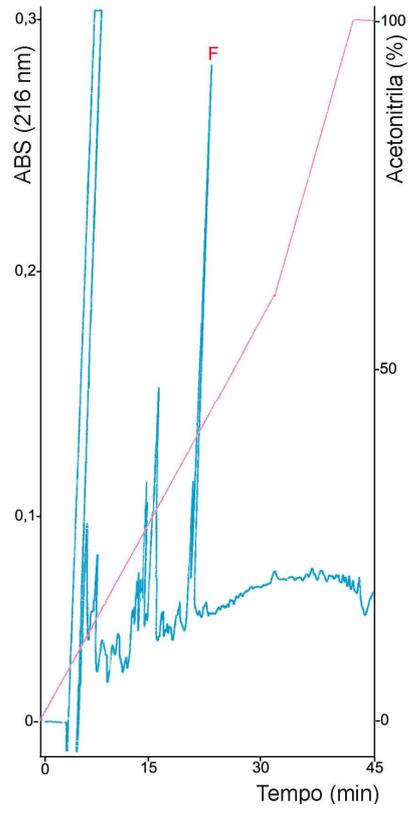
Fração 5



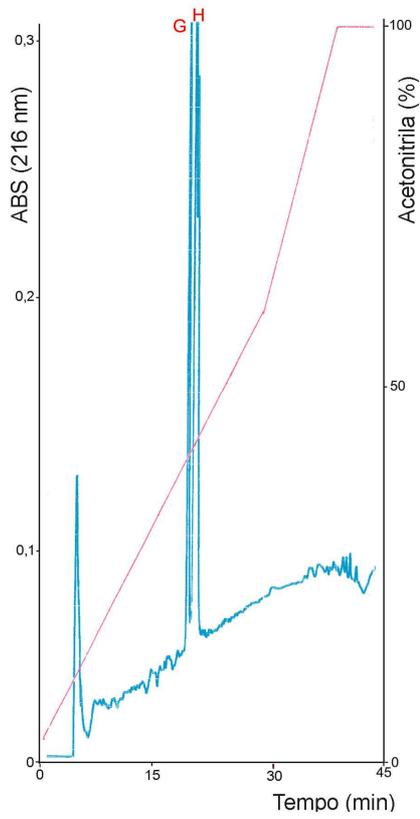
Fração 6



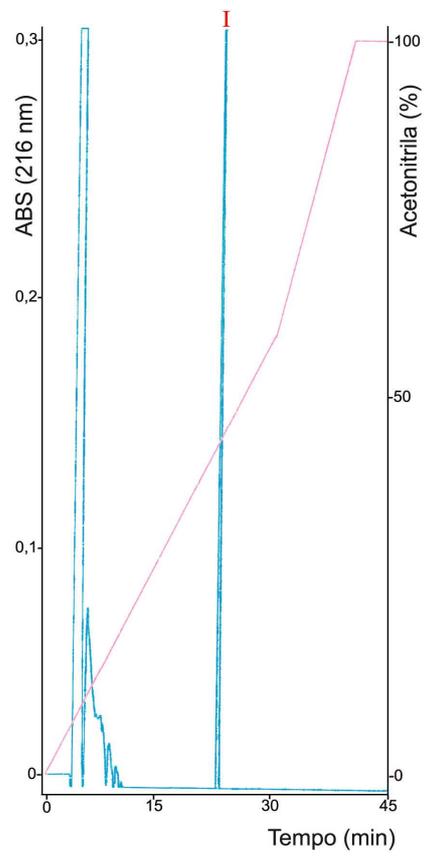
Fração 7



Fração 10



Fração 11



Fração 12

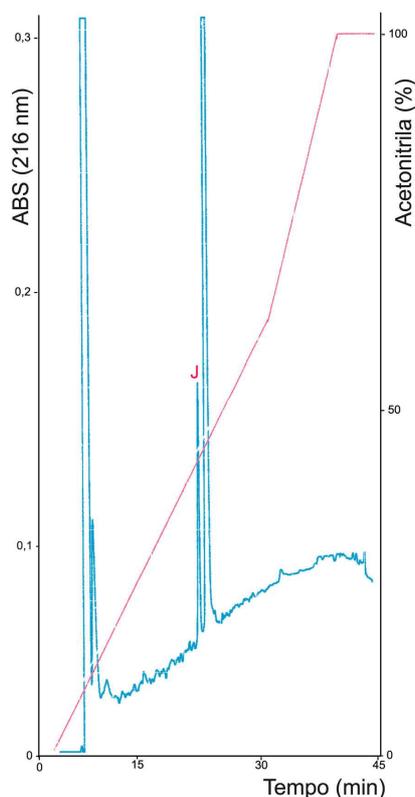


Figura 17. Perfis cromatográficos em coluna C₁₈ resultante do fracionamento das frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 e 12 provenientes da filtração em gel. As frações foram eluídas utilizando-se um gradiente linear de 0-60% de acetonitrila contendo TFA 0,1% (v/v) em 30 minutos, 60-100% de acetonitrila contendo TFA 0,1% (v/v) em 10 minutos e 5 minutos de lavagem com acetonitrila/TFA 0,1% (v/v) a um fluxo de 0,8 mL/min e detecção em 216 nm. As letras **A, B, C, D, E, F, G, H, I e J** marcadas sobre os picos indicam as frações submetidas à redução e alquilação.

ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQÜENCIAMENTO N-TERMINAL

Os dados obtidos em relação às massas moleculares desses 10 peptídeos, identificados na Figura 17 como frações A-J, antes e após o processo de redução e alquilação estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise por MALDI-TOF MS dos peptídeos que foram submetidos à redução e alquilação com 4-vinilpiridina.

Fração proveniente da cromatografia por filtração em gel	Fração proveniente da cromatografia de fase-reversa	Massa molecular do peptídeo nativo (Da)	Massa molecular após redução e alquilação (Da)	Nº de cisteínas
3	A	11.002,44	-----	ND*
4	B	2.750,24	2.751,75	0
4	C	14.279,27	7.555,40	4
5	D	2.383,91	3.019,49	6
5	E	3.585,34	4.222,70	6
7	F	10.992,20	11.646,03	6
10	G	6.949,53	7.805,87	8
10	H	3.427,51**	7.712,63	
			3.856,18**	4
11	I	6.961,56	7.812,62	8
12	J	6.947,90	7.818,06	8

*ND = Não determinado ** $[M + 2H]^{+2}$ (íon duplamente carregado)

Como observado na Tabela 3, não foi possível, infelizmente, determinar o número de resíduos de cisteína presentes no peptídeo A. Isso ocorreu provavelmente pela grande perda de material durante os procedimentos de redução e alquilação.

A partir do grau de pureza e da quantidade de material apresentados, os peptídeos B, C e E foram escolhidos para serem submetidos ao processo de seqüenciamento N-terminal automático (Tabela 4).

Tabela 4. Seqüência N-terminal das frações B, C e E com suas respectivas massas moleculares teóricas e experimentais.

Fração	Massa molecular experimental (Da)	Massa molecular teórica (Da)	Seqüência N-terminal
B (Tf2.7)	2.750,24	2.751,14	¹ ADIDFRGVPENIVKQIKETNAKPPA ²⁵
C (Tf14)	7.555,40	-----	¹ KIYEX*CELAXELINXFNF ¹⁸
E (Tf3.5)	3.585,34	3.592,15	¹ TQKNCRSKRDCQTVCMVVDRRCQYGTCYCKGN ³⁰

*X = resíduo não identificado.

A diferença de massa existente entre a massa molecular experimental e a massa molecular teórica do peptídeo Tf 3.5 se deve a formação de pontes dissulfeto no estado nativo da molécula.

3.3. PEPTÍDEO Tf14

Como se pode observar na tabela 3, a fração C proveniente do pico 4 da filtração em gel (Figura 17) apresentou um comportamento interessante após redução e alquilação.

Na análise dessa fração por MALDI-TOF MS em condições nativas, pode-se observar a presença de dois componentes principais: um de 14.279, 27 Da e um outro de 7133,62 Da que, corresponde, provavelmente, à espécie duplamente carregada $[M + 2H]^{2+}$ (Figura 18A).

Entretanto, após o processo de redução e alquilação, o componente principal passou a ser o de 7 kDa, uma vez que o de 14 kDa diminuiu sensivelmente de intensidade (Figura 18B).

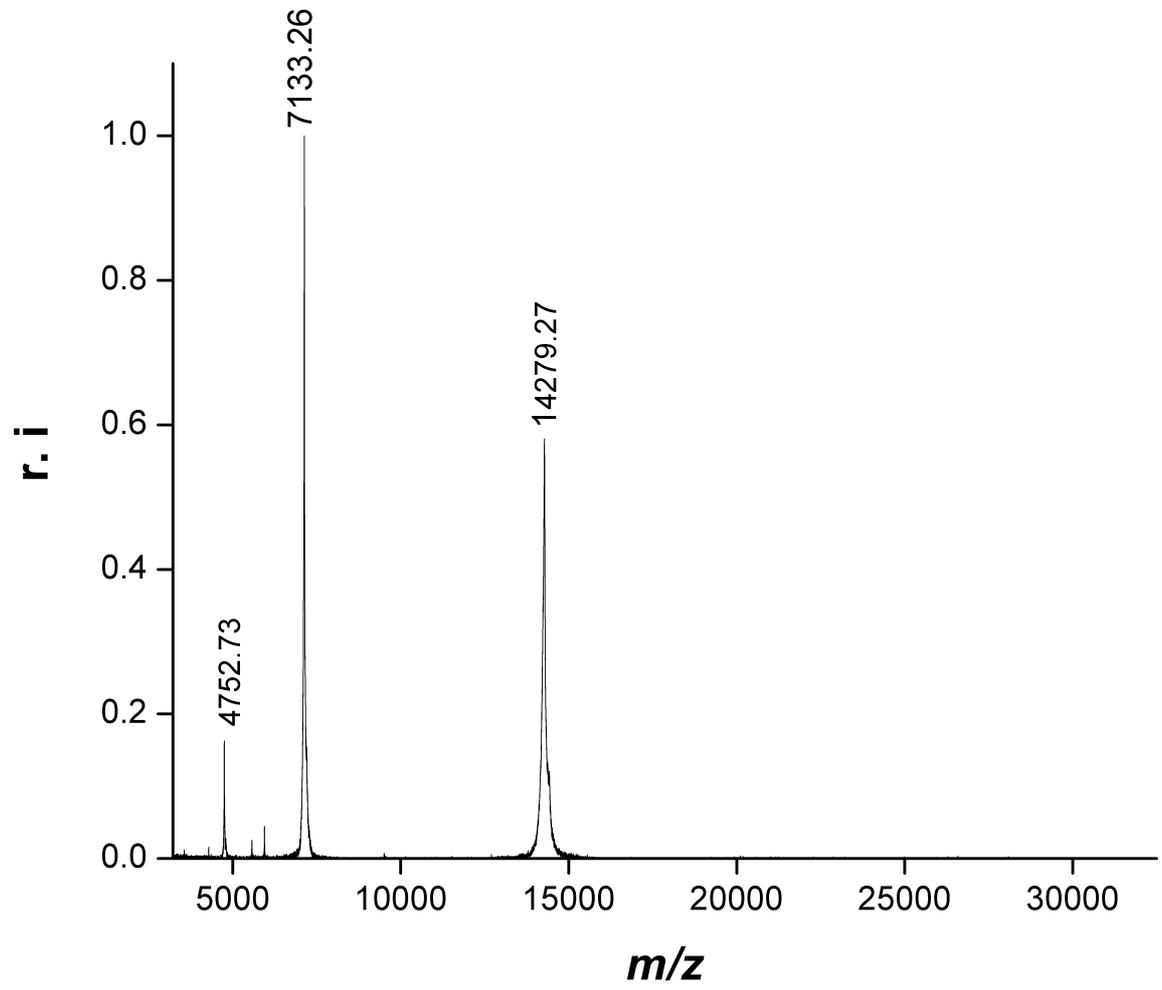
A Figura 18 apresenta no eixo Y a intensidade relativa dos íons presentes na amostras; mas no espectro original observamos a contagem total dos íons. No caso dessa amostra em particular, isso é importante porque a contagem total do íon de 14 kDa foi de aproximadamente 3.000 e, após a redução e alquilação, baixou para 100, mostrando que provavelmente muito material foi perdido durante o procedimento de redução e alquilação.

Também é possível notar, a partir da análise dos espectrogramas apresentados na Figura 18, a presença de uma molécula de massa molecular 4.752,53 Da que, após o processo de redução e alquilação, passou a ser 5.041,06 Da.

Algumas hipóteses podem explicar a baixa intensidade observada para o íon correspondente à molécula de 14 kDa. Uma delas, é que esses polipeptídeo pode ser, na verdade, um homodímero ligado por pontes dissulfeto. Ao serem desfeitas, durante o processo de redução e alquilação, os monômeros se separaram. A presença então do componente de 15.124,78 Da sugere que, provavelmente, ocorreu uma alquilação parcial, fazendo com que os homodímeros permanecessem ligados.

Entretanto, dividindo o componente de massa molecular 14,2 kDa por três, encontra-se uma massa muito aproximada do componente molecular de 4,7 kDa, podendo sugerir que Tf14 possa ser na realidade, um trímero e não um dímero, uma vez que quando reduzido e alquilado o componente de massa 4.752,73Da, agora 5.041,06 Da, passa ter maior intensidade justamente por terem sido desfeitas as pontes dissulfeto. Nesse contexto, a molécula de massa molecular 7.133.26 Da poderia ser apenas um contaminante.

A.



B.

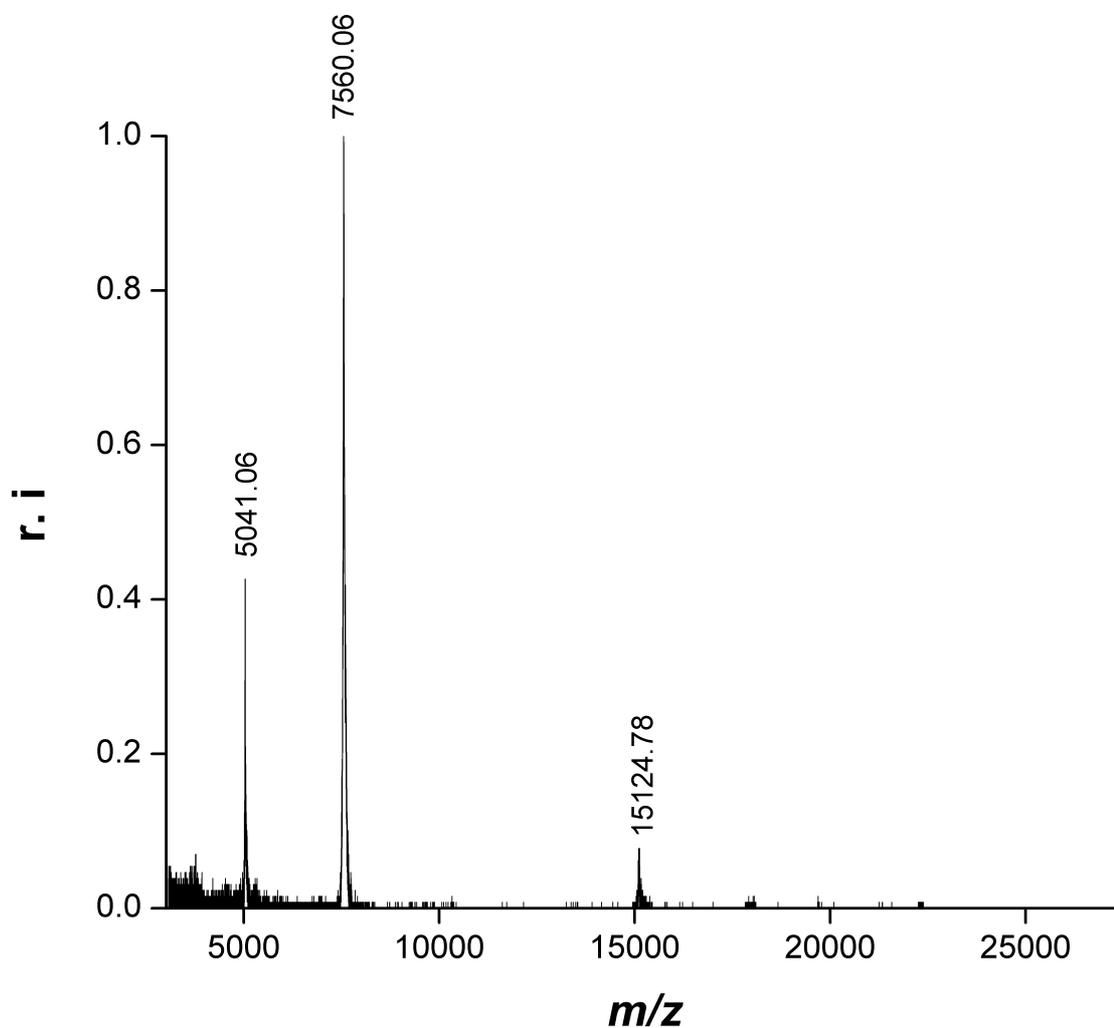
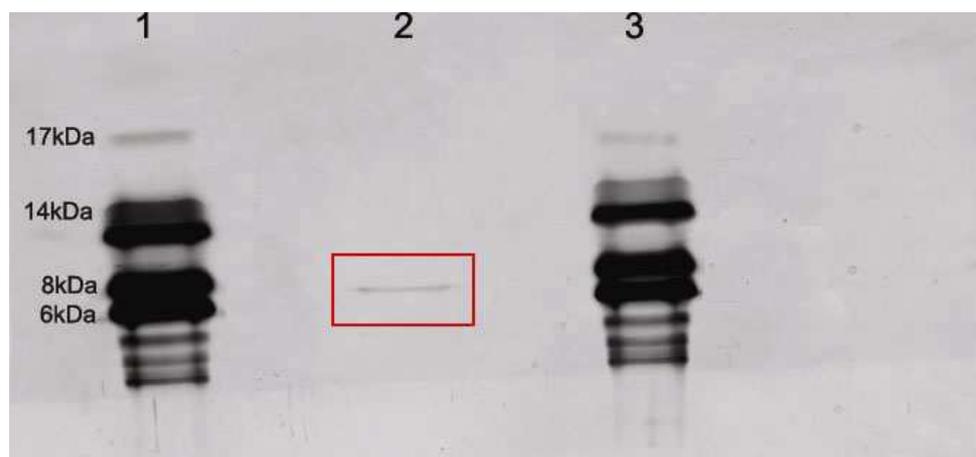


Figura 18. Espectrogramas (MALDI-TOF MS) do peptídeo Tf14. **A.** Espectrograma do peptídeo nativo. **B.** Espectrograma do peptídeo após o processo de redução e alquilação.

Na tentativa de se comprovar se esse polipeptídeo é realmente um homodímero ou um homotrímero, foi realizada uma eletroforese desnaturante em sistema Tris-Tricina com a amostra tendo sido previamente reduzida e alquilada (Figura 19).

A.



B.

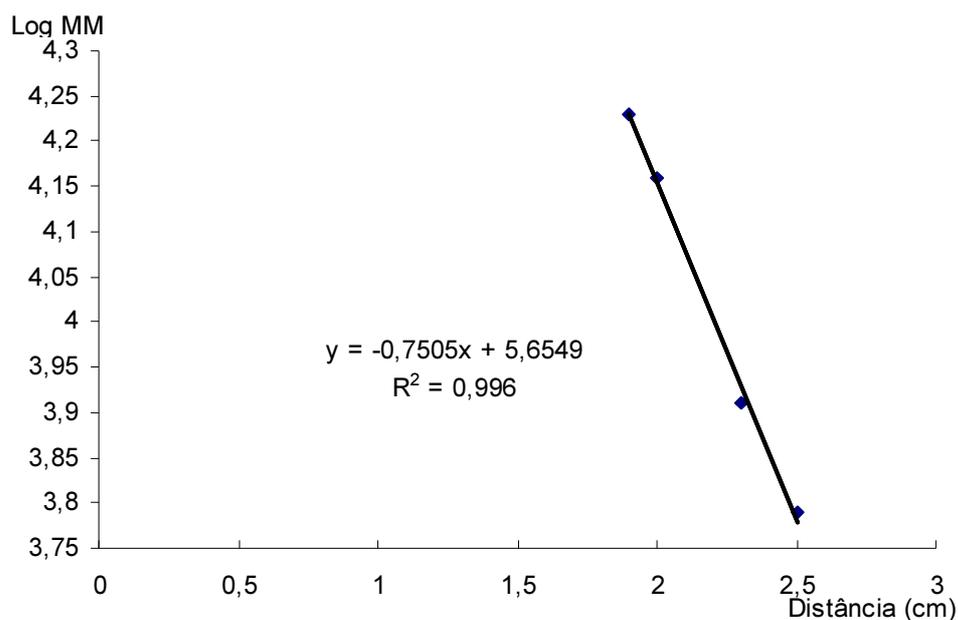


Figura 19. A. Eletroforese em sistema Tris-Tricina. Nos poços 1 e 3 foram aplicados marcadores de massa molecular; no poço 2, o peptídeo Tf14 reduzido e alquilado que está marcada com o retângulo vermelho. **B.** Regressão linear obtida a partir dos componentes do marcador de massa molecular.

Após a coloração do gel, observou-se apenas uma banda de massa molecular aproximadamente igual a 7,3 kDa. Esse resultado pode ser considerado um indício de que a molécula de massa molecular igual a 14 kDa é de fato um homodímero ligado covalentemente por pontes dissulfeto.

Diversas toxinas fosfolipásicas possuem massa molecular em torno de 14 kDa. Em virtude desse fato, foi realizado um ensaio fosfolipásico com o peptídeo nativo. Entretanto, na concentração testada, o peptídeo Tf14 não apresentou nenhuma atividade fosfolipásica (resultados não apresentados).

Em seguida, o peptídeo Tf14 foi submetido ao seqüenciamento N-terminal (Tabela 4) e, em virtude da baixa quantidade de amostra disponível, foi obtida uma seqüência parcial de 18 resíduos de aminoácidos com algumas regiões dúbias. Buscas em bancos de dados de proteínas foram realizadas a fim de se detectar similaridades estruturais com outras moléculas já descritas na literatura, porém não foi encontrada nenhuma similaridade significativa. Isto indica que essa molécula pode representar uma nova família de peptídeos presentes na peçonha de escorpiões.

Esses resultados, no entanto, são ainda preliminares. Outros estudos visando uma melhor caracterização química e biológica deste peptídeo devem ser realizados no futuro.

3.4. PEPTÍDEO Tf3.5

Ao longo desse trabalho, também foi possível o isolamento e a caracterização química de um novo peptídeo denominado Tf3.5 (Tabela 4). A diferença de massa molecular observada entre a massa teórica e a massa experimental (aproximadamente 6 Da) é devida à presença de três pontes dissulfeto. O peptídeo Tf3.5 apresentou identidade maior que 55% com duas toxinas bloqueadoras de canais de potássio, ambas isoladas de *Mesobuthus martensii*, espécie endêmica da China (Figura 20). Também observamos uma taxa de identidade igual a 22% entre o peptídeo Tf3.5 e um peptídeo isolado da peçonha de *Androctonus australis* ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

```

TXKs4      MKFIIIVLILISVLIATIVPVNEAQTQCQSVRDCQYCL-TPDRCSYGTCTCYCKTTGK 55
Bmkk4      -----ZTQCQSVRDCQYCLITPDRCSYGTCTCYCKTT-- 31
Tf3.5      -----TQKNCRSKRDCQTVCM-VVDRCQYGTCTCYCKGN-- 31
           :  :*: * **** * :   *** *****

```

Figura 20. Multi-alinhamento entre a seqüência do peptídeo Tf3.5 e os peptídeos BmKK4 e TXKs4 isolados da peçonha do escorpião *B. martenssi*. O símbolo “*” indica resíduos idênticos entre as seqüências e o símbolo “:”, substituições conservativas (Clustal W).

Esses resultados indicam que provavelmente a toxina Tf3 pertence à classe das toxinas bloqueadoras de canais de potássio e que pode possuir potencial antimicrobiano. A baixa concentração deste peptídeo, entretanto, não permitiu que os ensaios biológicos fossem realizados.

3.5. PEPTÍDEO Tf2.7

Outro peptídeo isolado nesse trabalho apresentou massa molecular igual a 2,75 kDa e a ausência de pontes dissulfeto, aspecto bastante interessante, uma vez que, atualmente, apenas 10 peptídeos sem pontes dissulfeto foram isolados da peçonha de escorpiões. Vale ressaltar que a maioria desses peptídeos apresenta atividade antimicrobiana^[11].

Essa fração foi inicialmente isolada e parcialmente caracterizada pela Dra. Simone Wagner durante seus trabalhos de doutoramento^[6]. Por meio de ensaios neurotóxicos, foi constatado efeitos sobre a corrente de potássio. Essa é outra característica interessante, já que como citado anteriormente, moléculas pertencentes à classe das neurotoxinas que atuam em canais de potássio possuem geralmente três a quatro pontes dissulfeto.

A sua seqüência completa foi obtida por meio da degradação de Edman em seqüenciador automático, sendo confirmada por meio da técnica de PSD em MALDI-TOF MS.

Devido a uma diferença de massa de aproximadamente 1 Da entre a massa molecular teórica e a experimental, foi levantada a possibilidade dessa molécula apresentar a porção C-terminal amidada. Para verificar a presença de tal modificação pós-traducional, o peptídeo foi metilado por meio da esterificação de Fisher^[56]. Tal reação consiste em metilar resíduos de aspartato e glutamato presentes na molécula, bem como o resíduo C-terminal, caso este esteja livre.

Nesse caso, o peptídeo de interesse apresenta 5 sítios possíveis para metilação (2 aspartatos, 2 glutamatos e o C-terminal). Após a reação, observou-se um acréscimo de 70 Da na massa molecular do peptídeo indicando que todos os sítios estavam livres e que, portanto, o C-terminal não se encontrava amidado. Essa diferença de 1 Da pode ter ocorrido devido a diferenças na calibração do espectrômetro de massa durante a análise.

3.5.1. ANÁLISE ESTRUTURAL POR DICROÍSMO CIRCULAR

Dicroísmo circular (DC) é um método espectroscópico que possui diversas aplicações, dentre elas, a determinação do conteúdo de estruturas secundárias de uma proteína ou peptídeo em diferentes meios.

Em linhas gerais, pode se dizer que um feixe de luz polarizada é composto por dois componentes circulares polarizados de igual magnitude, porém de sentido opostos (um no sentido horário, R e o outro no sentido anti-horário, L). O espectro de DC é obtido por meio da diferença de absorção desses componentes, ou seja, se ao passar pela amostra, os componentes R e L forem absorvidos em diferentes graus, o resultado da radiação será uma elipse polarizada sendo possível sua detecção [57].

As estruturas secundárias como α -hélice e folha- β , bem como a não formação de nenhuma estrutura definida (estrutura randômica) possuem uma curva típica sendo facilmente identificadas (Figura 21).

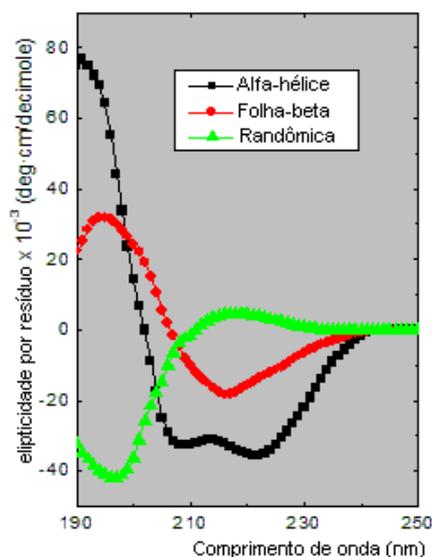


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular da poli-lisina nas três diferentes conformações (α -hélice, folha- β e estrutura randômica) (Fonte: http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm).

A fim de se determinar o conteúdo de estrutura secundária do peptídeo Tf2.7, experimentos de dicroísmo circular foram realizados em diferentes condições experimentais.

Primeiramente, o peptídeo (80 μM) foi colocado em meio aquoso em pH 4,3 e depois em pH 7,0 (pH fisiológico) (Figura 22).

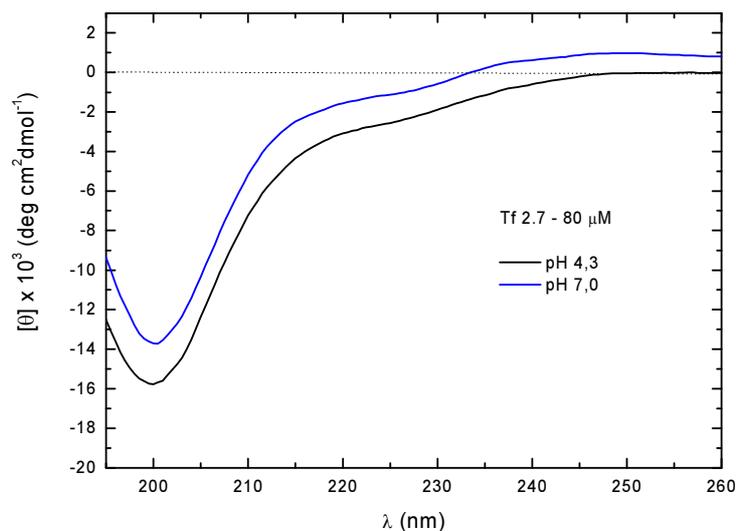
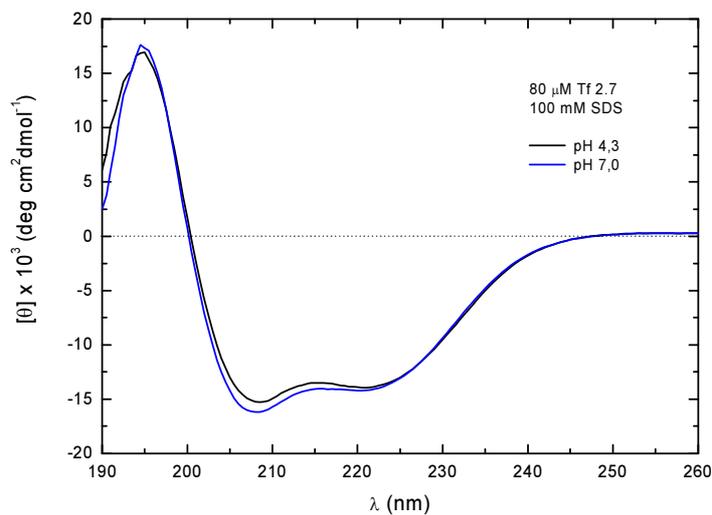


Figura 22. Espectro de DC do peptídeo Tf2.7 em meio aquoso nos pHs 4,3 e 7,0.

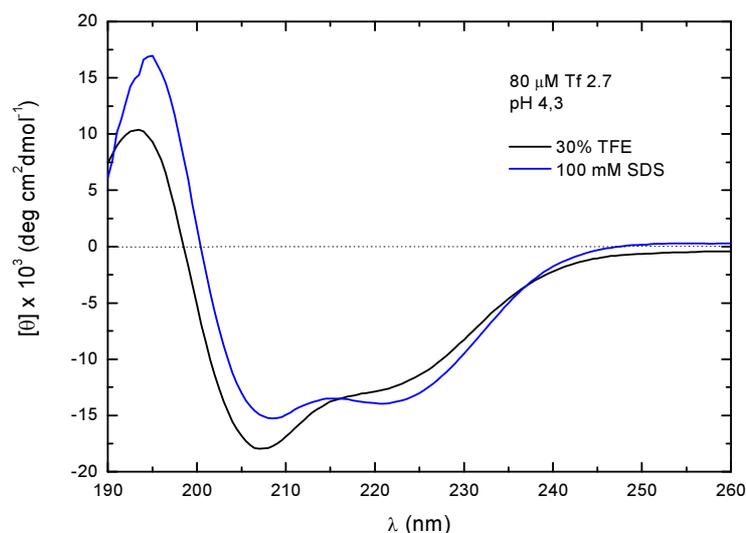
Em ambas as situações, o peptídeo apresentou estrutura randômica.

Posteriormente, o peptídeo Tf2.7 foi incubado em condições que simulam a presença de membranas biológicas: 1) SDS micelar (100 mM) em pHs 4,3 e 7,0; 2) TFE 30% (v/v) em pH 4,3 e finalmente 3) 50 mM de micelas de lisofosfatidilcolina (LPC) em pHs 4,5 e 7,5 (Figura 23).

A. SDS



B. TFE e SDS



C. LPC

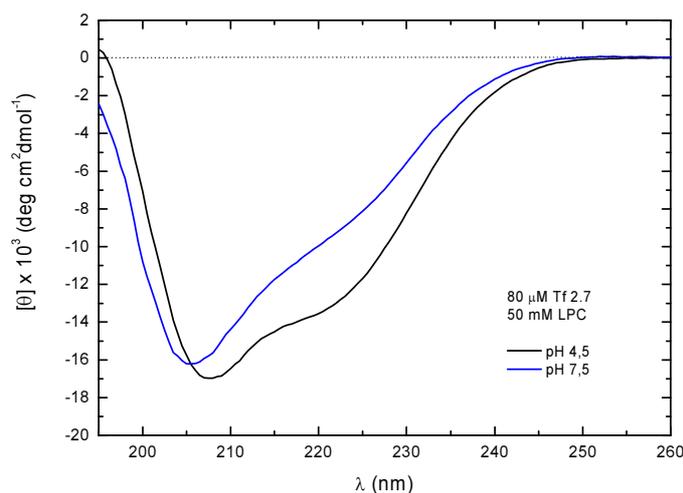


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Tf2.7 incubado em condições que simulam a presença de membranas biológicas. A. SDS (pHs 4,3 e 7,0), B. TFE (pH 4,3) e C. LPC (pHs 4,5 e 7,0).

A partir da Figura 23, observa-se que o peptídeo Tf2.7 adquire conformação helicoidal (em torno de 40% de hélice). Entretanto, na presença de TFE e LPC o peptídeo adquire conformação tendendo a hélice, indicando que as concentrações utilizadas, TFE 30% (v/v) e LPC 50mM, provavelmente, não foram suficientes para fazer com que o peptídeo alcançasse sua conformação final. Para se comprovar essa hipótese, seria necessária a realização de experimentos de titulação com o peptídeo nesses meios.

Tendo em vista o fato de que muitos dos peptídeos lineares previamente isolados da peçonha de escorpiões e venenos de outros animais como anfíbios, possuem efeito antimicrobiano e que a maioria deles forma α -hélice em meio hidrofóbico, a atividade antimicrobiana do peptídeo Tf2.7 foi avaliada. Entretanto, foi observado que em uma concentração inicial de 128 μ M, tal peptídeo mostrou-se incapaz de inibir o crescimento das bactérias patogênicas testadas (*E. coli* e *S. aureus*).

3.5.2. ENSAIOS NEUROTÓXICOS (*WHOLE-CELL PATCH-CLAMP*)

Foram realizados ensaios eletrofisiológicos (*whole-cell patch-clamp*) a fim de se determinar a atividade neurotóxica deste peptídeo. O peptídeo Tf2.7 apresenta um leve efeito reversível sobre a corrente transiente de potássio. Os canais transientes, aqueles de cinética rápida de abertura e fechamento, são abertos no início da repolarização. Como essa toxina inibe a abertura deste canal é possível inferir que, quando em contato com o peptídeo Tf2.7, o tempo de repolarização do potencial de ação da membrana celular é prolongado (Figura 24).

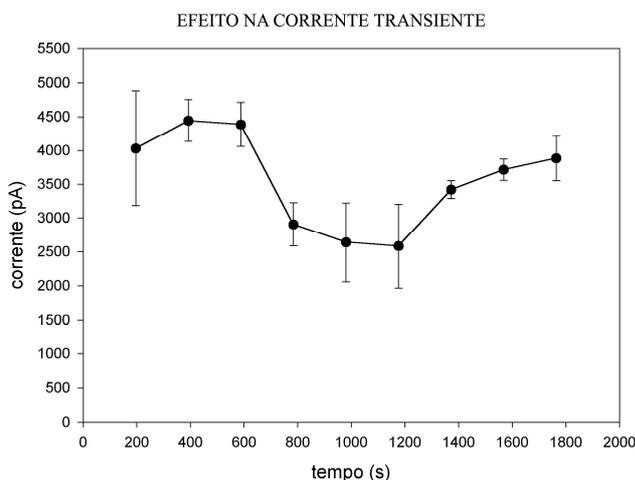


Figura 24. Efeito do peptídeo TF2.7 sobre a corrente transiente de potássio em células GH3.

Também foi avaliado o efeito do peptídeo Tf2.7 sobre a corrente estacionária dos canais lentos. Como apresentado na Figura 25, nenhum efeito sobre essa corrente foi detectado.

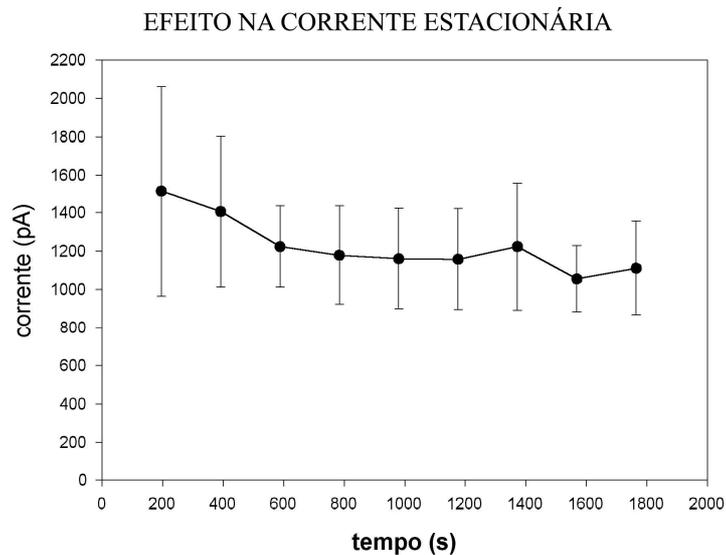


Figura 25. Efeito do peptídeo Tf2.7 sobre a corrente estacionária dos canais lentos de potássio.

A reversibilidade dos efeitos do peptídeo Tf2.7 sobre a corrente de potássio também foi comprovada após a lavagem das células como apresentado na Figura 26.

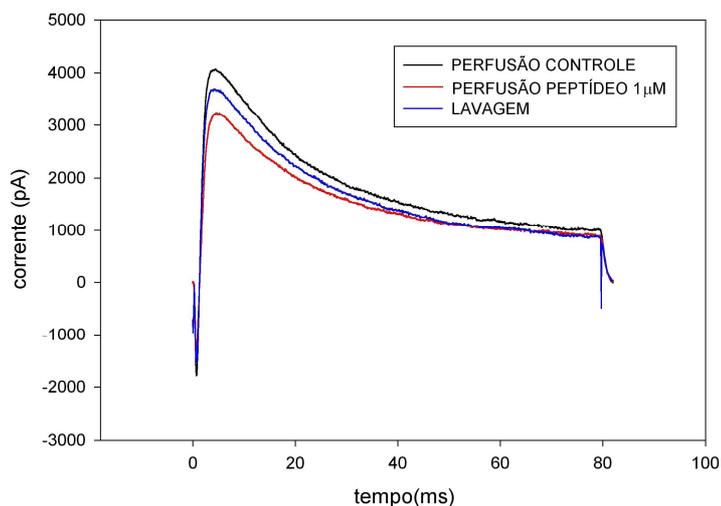


Figura 26. Efeito da lavagem do peptídeo Tf2.7 sobre a corrente de potássio.

Diferentemente do potencial de ação presente no axônio, o potencial elétrico do miocárdio ventricular é caracterizado pela sua longa duração podendo ser

observado 5 fases distintas: 0 (despolarização rápida), 1 (repolarização rápida), 2 (platô), 3 (repolarização lenta) e 4 (potencial de repouso). Como se pode observar a fase de repolarização rápida é interrompida por um platô de duração variável (Figura 27)^[58].

Em cada fase desse potencial de ação, canais iônicos específicos estão envolvidos. De um modo geral a despolarização ocorre devido à abertura dos canais de sódio, a repolarização rápida com a abertura dos canais de potássio transientes e o platô, ocorre, porque tanto as correntes despolarizantes (abertura dos canais de cálcio do tipo L) quanto as repolarizantes (fechamento dos canais de potássio transientes) são pequenas e de amplitude quase iguais. As duas últimas fases são caracterizadas pela abertura dos canais lentos de potássio com subsequente estabelecimento do potencial de repouso^[58].

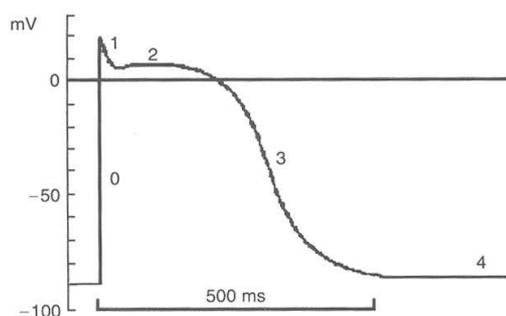


Figura 27. Registro esquemático de um potencial de ação de uma célula do miocárdio ventricular^[58].

A partir dos dados de *patch-clamp*, sabe-se que o peptídeo Tf2.7 atua inibindo a corrente nos canais de potássio transientes. É de se esperar, então, que uma vez em contato com as células do miocárdio ventricular, a duração da fase de repolarização rápida deva ser prolongada na presença deste peptídeo.

3.5.3. ENSAIOS CARDIOTÓXICOS (CORAÇÃO *IN SITU* DE *R. catesbeiana*)

A fim de avaliar a atividade cardiotoxica deste peptídeo, foi realizado, primeiramente, um ensaio em coração *in situ* de *Rana catesbeiana*.

A Figura 28 apresenta os registros elétricos e mecânicos obtidos antes da administração do peptídeo Tf2.7 (256 μ M) e 42 minutos após a perfusão do peptídeo.

A administração do peptídeo Tf2.7 foi capaz de alterar significativamente a atividade elétrica do coração de rã, prejudicando a condução elétrica e, conseqüentemente, reduzindo a atividade contrátil.

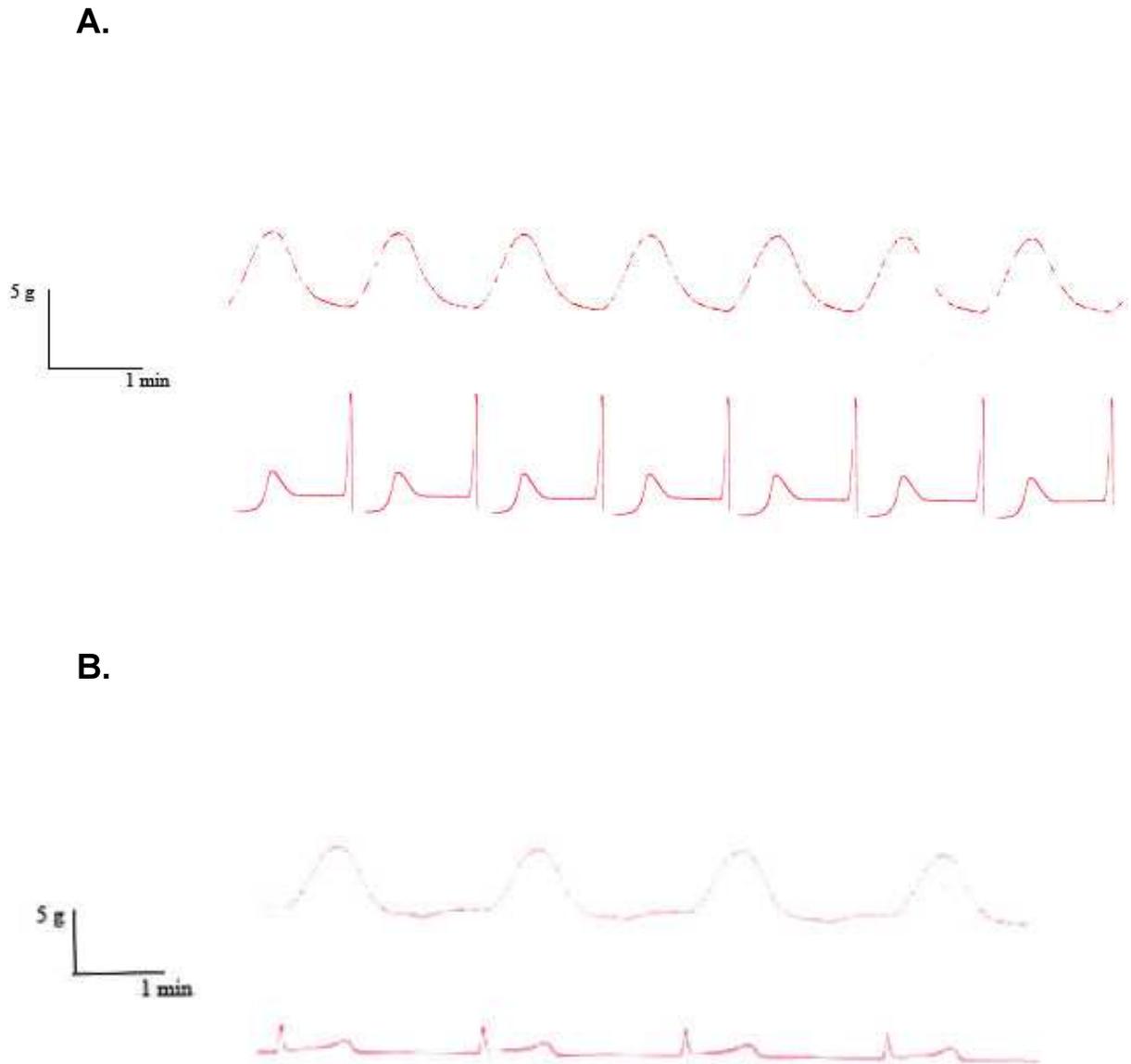


Figura 28. Atividade cardiotoxica do peptídeo Tf 2.7 no coração de *Rana catesbeiana*. A linha de cima do registro mostra a força de contração muscular enquanto a de baixo mostra a resposta elétrica, para as partes A e B. **A.** Controle, antes da aplicação do peptídeo. **B.** Eletrocardiograma registrado após 42 minutos da administração do peptídeo.

3.5.4. DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A PRESSÃO DE PERFUSÃO MESENTÉRICA

As células endoteliais desempenham um importante papel no controle local do tônus vascular por meio da produção de potentes agentes vasoativos como óxido nítrico (NO) e prostaciclina, membro da família das prostaglandinas^[59, 60]. A síntese de NO ocorre durante a transformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina, em uma reação mediada pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), com a presença de vários co-fatores como oxigênio, NADPH e cálcio (Figura 29)^[61].

A liberação desse gás é estimulada por dois fatores principais: 1) atrito exercido pelo fluxo sanguíneo sobre as células do endotélio e 2) ligação a receptores celulares da superfície endotelial de substâncias vasodilatadoras como: acetilcolina (ACH), bradicinina (BK), histamina, serotonina, entre outras.

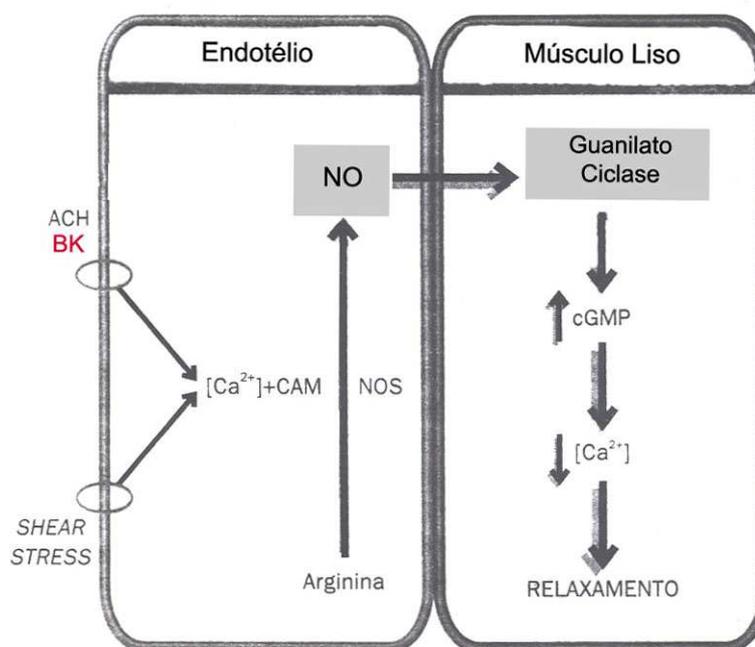


Figura 29. Esquema dos estímulos e respostas decorrentes da ligação em receptores por agonistas específicos ou pelo aumento da pressão sobre a célula endotelial (*shear stress*). A produção de NO ativa a guanilato ciclase levando à formação de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) que diminui as concentrações internas de Ca²⁺ resultando no relaxamento do vaso e queda na pressão arterial^[61].

Tendo em vista os efeitos carditóxicos do peptídeo Tf2.7, foi avaliado, também, seus efeitos sobre a pressão de perfusão mesentérica de ratos normais que foi medida em função da resistência uma vez que o fluxo sanguíneo era constante.

Na preparação com leito mesentérico perfundido, observou-se que o peptídeo Tf2.7 foi capaz de induzir relaxamento vascular a partir da dose de 25 μg , revelando-se um agente vasodilatador, mas de potência bastante inferior à bradicinina e acetilcolina (cerca de 1000 vezes menos potente do que a bradicinina) (Figura 30).

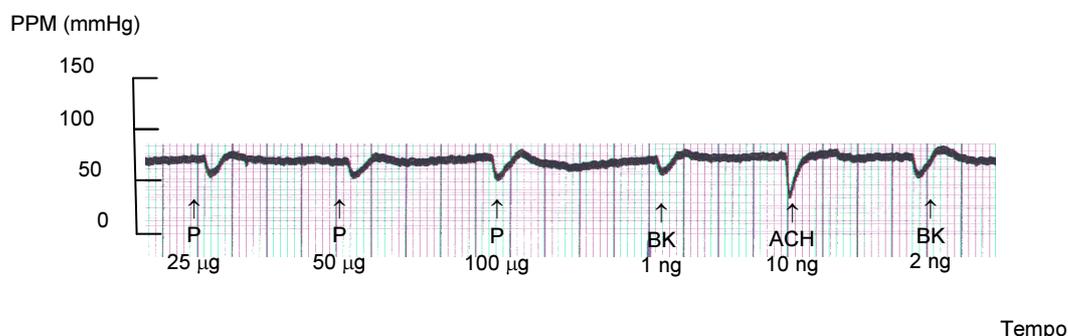


Figura 30. Efeitos da aplicação de bradicinina (BK), acetilcolina (ACH) e do peptídeo Tf2.7 (P) sobre a pressão de perfusão mesentérica.

Como os efeitos provocados pelo peptídeo Tf2.7 sobre a pressão de perfusão mesentérica apresentaram um comportamento similar ao da bradicinina, foram realizados experimentos na presença de lisinopril (um inibidor da ACE) o qual potencializa o efeito de bradicinina (Figura 31).

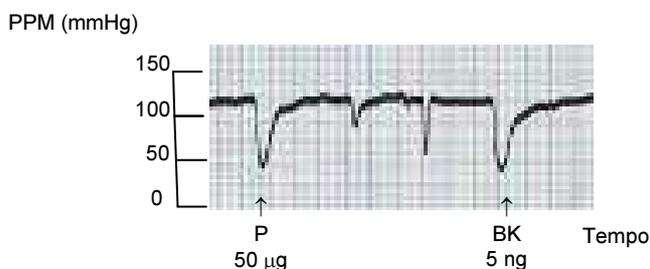


Figura 31. Efeitos da aplicação de bradicinina (BK) e do peptídeo Tf2.7 (P) sobre a pressão de perfusão mesentérica na presença do inibidor lisinopril.

O resultado mostrado na Figura 31 indica claramente que o peptídeo Tf2.7 parece estar sendo potencializado por um mecanismo semelhante ao da bradicinina.

A fim de se avaliar esse efeito tipo-bradicinina do peptídeo Tf2.7, foram realizados os mesmos experimentos nas condições acima citadas, porém os efeitos foram analisados antes e após a adição de HOE140, um antagonista do receptor B2 da bradicinina (Figura 32).

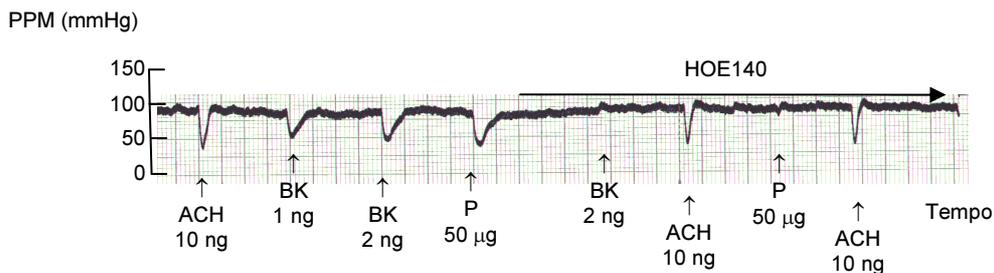


Figura 32. Efeitos da aplicação de bradicinina (BK) e do peptídeo Tf2.7 (P) sobre a pressão de perfusão mesentérica na presença do antagonista HOE 140.

Baseado no resultado da Figura 28, pode se inferir que o HOE140 se ligou ao receptor B2 impedindo que o peptídeo Tf2.7 ou a bradicinina se ligassem ao mesmo. Dessa forma, pode se dizer que o peptídeo Tf2.7 é uma molécula que parece ser um agonista dos receptores B2 muito pouco potente quando comparado à bradicinina.

Na literatura, conforme já citado, estão descritos apenas dois peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs): o peptídeo T isolado de *Tityus serrulatus* e o K12 de *Buthus occitanus*.

Com os dados obtidos até o momento, pode se inferir que o peptídeo TF2.7 têm uma ação parecida com a bradicinina podendo ser chamado, por esse motivo, de peptídeo tipo-bradicinina. Para afirmar que essa molécula é também um BPP é necessário a realização de ensaios que mostrem como se comporta a BK na presença de Tf2.7. Se o efeito vasodilator for aumentado, Tf2.7 será então o terceiro peptídeo potencializador de bradicinina isolado da peçonha de escorpiões. Um outro ensaio importante a ser feito é a verificação do efeito de Tf2.7 na enzima ACE, a fim de observar se ele é capaz de inibir a atividade desta enzima, outra característica dos BPPs.

A partir do alinhamento entre as seqüências dos peptídeos T, K12 e Tf2.7, observa-se que há uma baixa homologia entre eles. Entretanto a região C-terminal do K12 e do Tf2.7 são idênticas (2 prolina seguida de uma alanina) (Figura 33).

Peptídeo Tf2.7	ADIDFRGVPENIVKQIKETNAKPPA	25
Peptídeo T	-KKD--GYPVEYDRAY-----	13
	* * * : :	
Peptídeo Tf2.7	ADIDFRGVPENIVKQIKETNAKPPA	25
Peptídeo K12	----LRDYANRVINGGPVEAAGPPA	21
	:* : ::: * **	
Peptídeo K12	LRDYANRVINGGPVEAAGPPA	21
Peptídeo T	-----KK--DGYPVEYDRAY-	13
	:: :* **	

Figura 33. Alinhamento dos BPPs isolados de escorpiões e do peptídeo Tf2.7. O peptídeo T foi isolado de *Tityus serrulatus*, o peptídeo K12 de *Buthus occitanus* e o peptídeo Tf2.7 de *Tityus fasciolatus* (Clustal W). O símbolo “*” representa os resíduos idênticos e os “:”, representa substituições conservativas.

Em 1949, Silva *et al.*, descobriram que a peçonha de *Bothrops jararaca* induzia, quando em contato com a corrente sanguínea da presa, a produção de bradicinina. Em 1965, entretanto, Ferreira *et al.* observaram que, além de induzir a produção de BK, o veneno possuía moléculas que aumentavam intensamente o efeito hipotensivo da BK (BPP) provocando um choque vascular na presa, geralmente pequenos mamíferos^[46,62].

Desde então, vários BPP presentes na peçonha de *Bothrops jararaca* foram identificados. Eles se caracterizam por serem moléculas pequenas de até 13 resíduos de aminoácidos, ricos em prolina e possuem um resíduo de ácido piroglutamato na região N-terminal e prolina na região C-terminal (Figura 34)^[63].

BPP-9a	EWPR PQIPP
BPP-10a	ESWPG PNIPP
BPP-10b	ENWPR PQIPP
BPP-13a	EGGWPRPG PEIPP

Figura 34. BPPs isolados da peçonha de *Bothrops jararaca*. **E** representa o ácido piroglutâmico^[63].

lanzer *et al.* em 2004^[64] comprovaram que o motivo PXIPP presente na região C-terminal do BPPs é essencial para que ocorra a inibição da ACE. Comparando este dado com as seqüências dos BPPs isolados da peçonha de escorpiões observa-se que os peptídeos K12 e o Tf 2.7 possuem na região C-terminal o motivo AXPPA o que nos leva a pensar que essas duas prolinas possa também atuar na inibição da ACE. O mecanismo de inibição do peptídeo T, entretanto, seria diferente

uma vez que ele apresenta uma única prolina na posição 6 ao longo da sua estrutura primária. Se for comprovado que o peptídeo Tf 2.7 é capaz de inibir a ACE, um estudo visando mutagenizar a região C-terminal inserindo um resíduo de isoleucina antes da prolina (AIPPA) e em um outro momento adicionar uma prolina antes da isoleucina poderia ser feito a fim de observar se haveria um aumento na atividade potencializadora.

Um outro aspecto interessante a ser abordado é em relação à capacidade da bradicinina de modular canais iônicos. Um estudo realizado em 1989 por Villarroel *et al.* demonstrou que a BK é capaz de inibir a corrente tipo M em canais de potássio voltagem-dependentes em ratos^[65]. Entretanto, em um outro estudo, mais recente, desenvolvido na Universidade de Nottingham, UK, observou-se que a bradicinina é capaz de ativar os pequenos canais de potássio cálcio-dependentes presentes em células da musculatura lisa das vias aéreas^[66]. Esses resultados são interessantes, pois, como o Tf2.7 se assemelha em vários aspectos à BK, ele pode, além de inibir a corrente transiente dos canais de potássio voltagem-dependentes como observado, também ativar as correntes dos canais de potássio cálcio-dependentes. Ensaios que mostrem a atividade desse peptídeo nesses canais devem ser realizados futuramente.

Finalmente, em 2002, Kowalska *et al.* observaram que a bradicinina possui atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas, negativas como contra *Candida albicans*^[67]. Fato muito interessante uma vez que diferente da maioria dos peptídeos antimicrobianos conhecidos, ela não forma α -hélices; ao contrário, possui uma estrutura inteiramente randômica (figura 35).



Figura 35. Predição da estrutura secundária da bradicinina. c significa estrutura randômica (SOPMA/Expasy).

4. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar peptídeos bioativos presentes na peçonha do escorpião endêmico do cerrado *Tityus fasciolatus*. Foi possível constatar a grande diversidade de moléculas presentes na peçonha deste escorpião, uma vez que mais de 50 moléculas foram isoladas e tiveram suas massas moleculares determinadas por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) sendo que para 10 delas foi possível também se determinar o número de resíduos de cisteína presentes em suas estruturas primárias.

Foram realizados estudos mais aprofundados com três peptídeos isolados nesse trabalho. O primeiro, denominado Tf14, possui uma massa molecular de 14,2 kDa e, quando reduzido e alquilado, de 7,56 kDa. Esses dados, associados aos obtidos pela análise em sistema de eletroforese desnaturante Tris-Tricina, indicam que essa molécula deve ser um homodímero ligado por pontes dissulfeto que ao serem desfeitas fazem com que os monômeros se dissociem. Sua seqüência N-terminal sugere tratar-se de uma nova família de peptídeos presentes na peçonha de escorpiões, uma vez que não foi possível encontrar similaridades estruturais com outros peptídeos já descritos na literatura.

O peptídeo denominado Tf3.5 apresentou uma massa molecular de 3,58 kDa e 6 resíduos de cisteína. A seqüência de aminoácidos dessa molécula foi determinada por seqüenciamento automático N-terminal. Trata-se de uma molécula de 30 resíduos de aminoácidos que apresenta uma alta similaridade estrutural com peptídeos capazes de bloquear a corrente de potássio isolados do escorpião *Buthus martensii*, O peptídeo Tf3.5 provavelmente atua por um mecanismo semelhante.

O último peptídeo estudado foi o Tf2.7, um peptídeo linear formado por 25 resíduos de aminoácidos. A partir dos dados obtidos por dicróismo circular, observou-se que essa molécula forma uma α -hélice bem característica na presença de SDS micelar, mas não possui efeito antimicrobiano contra *E. coli* e *S. aureus*. Utilizando-se a técnica de *whole-cell patch-clamp* verificou-se que o peptídeo Tf 2.7 é capaz de bloquear a corrente transiente de canais de potássio voltagem-dependentes. O Tf 2.7 também possui atividade vasodilatadora, embora menos potente que a bradicinina, sendo capaz de se ligar a receptores B2 específicos para a bradicinina.

Na literatura não existe nenhum registro de um peptídeo isolado da peçonha de escorpiões com atividade tipo bradicinina e sim de dois peptídeos que são potencializadores de bradicinina, ou seja, aumentam a atividade da bradicinina, além de inibirem a enzima ACE. É de suma importância a realização de ensaios que demonstrem o comportamento do peptídeo Tf 2.7 na presença da bradicinina e da ACE para se determinar se esse peptídeo é de fato um potencializador da bradicinina.

Estudos de caracterização biológica de peptídeos são de suma importância, pois além de estarem envolvidos em diferentes processos fisiológicos, inclusive patológicos, propiciam o desenvolvimento de novos medicamentos. Um exemplo disso é o CAPTOPRIL, que foi desenvolvido a partir de BPPs isolados de serpentes. Do mesmo modo, outras drogas mais potentes e específicas podem ser descobertas a partir de estudos desta natureza.

5. REFERÊNCIAS

1. Barnes, RD. (1996) OS QUELICERADOS. IN: ZOOLOGIA DOS INVERTEBRADOS. 4ª. Ed. São Paulo: Roca, pp. 650-654.
2. FUNASA, 2001. MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. 2ª. ed. Brasília – DF, pp. 37-44.
3. Wagner, S.; Castro, M.S.; Barbosa, J.A.R.G.; Fontes, W.; Schwartz, E.F.; Sebben, A.; Pires, O.R.; Sousa, M.V.; Schwartz, C.A., 2003. PURIFICATION AND PRIMARY STRUCTURE DETERMINATION OF TF4, THE FIRST BIOACTIVE PEPTIDE ISOLATED FROM THE VENOM OF THE BRASILIAN SCORPION *Tityus fasciolatus*. *Toxicon* 41, 737-745.
4. Sissom, W.D.; Polis, G.A.; Watt, D.D., 1990. SYSTEMATIC, BIOGEOGRAPHY, PALEONTOLOGY. In: Polis, G.A. (Ed.). *The biology of scorpions*. Stanford: Stanford University Press, 64-153.
5. Lourenço, W.R., 1984. LA BIOGÉOGRAPHIE DÈS SCORPIONS SUD-AMÉRICAINS (PROBLÉMAS ET PERSPECTIVES). *Spixiana*, Munchen, 71, 11-18.
6. Wagner, S. ESTUDOS DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS DAS PEÇONHAS DE ESCORPIÕES DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL. Tese (Doutorado em Biologia Animal), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.
7. Lourenço, W.R.; Cloudsley-Thompson, J.L.; Cuellar, O.; Von Eickstedt, V.R.D.; Barraviera, B.; Knox, M.B., 1996. THE EVOLUTION OF SCORPIONISM IN BRAZIL IN RECENT YEARS. *J. Venom. Ani. Toxins* 2, nº 2.
8. Maria Amélia Cavalcanti Yoshizawa. ACIDENTES ESCORPIÔNICOS NO DISTRITO FEDERAL NO PERÍODO DE 1991-2000. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

-
9. Rodríguez, R.C.; Possani, L.D., 2004. CURRENT VIEWS ON SCORPION TOXINS SPECIFIC FOR K⁺ - CHANNELS. *Toxicon* 43, 865-875
10. Martín, B.M.; Ramírez, A. M.; Gurrola, G.B.; Nobile, M.; Prestipino, G.; Possani, L.D., 1994. NOVEL K⁺ -CHANNEL-BLOCKING TOXINS FROM THE VENOM OF THE SCORPION *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *The Biochemical Journal* 304, 51-56.
11. Batista, C.V.F.; Pozo, L.; Zamudio, F.Z.; Contreras, S.; Becerril, Z.; Wanke, E.; Possani, L.D., 2004. PROTEOMICS OF THE VENOM FROM THE AMAZONIAN SCORPION *Tityus cambridgei* AND THE ROLE OF PROLINES ON MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF TOXINS. *J. of Chromatography B* 803, 55-66.
12. Xian-Chun, Z.; Corzo, G.; Hahin, R. 2005. SCORPION VENOM PEPTIDE WITHOUT DISSULFIDE BRIDGE. *IUBMB Life* 57(1):13-21.
13. Conde, R.; Zamudio F. Z.; Rodríguez, M.H.; Possani, L.D., 2000. SCORPINE, AN ANTI-MALARIAL AND ANTI-BACTERIAL AGENT PURIFIED FROM SCORPION VENOM. *FEBS Letters* 471, 165-168.
14. Xian-Chun, Z.; San-Xia, W.; Wen-Xin, L., 2002. IDENTIFICATION OF BMKAPI, A NOVEL TYPE OF SCORPION VENOM PEPTIDE WITH PECULIAR DISULFIDE BRIDGE PATTERN FROM BUTHUS MARTENSII KARSCH. *Toxicon* 40(12):1719-1722.
15. Corzo G.; Escoubas, P.; Villegas, E.; Barnham, K.J.; He, W.; Norton, R.S., et al. 2001. CHARACTERIZATION OF UNIQUE AMPHIPATHIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM VENOM OF THE SCORPION *Pandinus imperator*. *Biochem J* 359, 35-45.
16. Torres-Larios, A.; Gurrola, G.B.; Zamudio, F.Z.; Possani, L.D., 2000. HAUDRUIN, A NEW ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM THE VENOM OF THE SCORPION *Hadrus azectus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5023-5031.

-
17. Xian-Chun, Z.; San-Xia, W.; Yan, Z.; Shun-Yi, Z.; Wen-Xin, L., 2004. IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NOVEL SCORPION VENOM PEPTIDES WITH NO DISULFIDE BRIDGE FROM *Buthus martensii* KARSCH. *Peptides* 25, 143–150.
18. Yamaji, N.; Dai, L.; Sugase, K.; Andriantsiferana, M.; Nakajima, T.; Iwashita, T., 2004. SOLUTION STRUCTURE OF ISTX A MALE SCORPION TOXIN FROM *Opisthacanthus madagascariensis* (ISCHNURIDAE). *Eur. J. Biochem.* 271, 3855–3864.
19. Dhawan, R.; Joseph, S.; Sethi, A.; Lala, A.K., 2002. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A SHORT INSECT TOXIN FROM THE VENON OF THE SCORPION *Buthus thalamus*. *FEBS Letters* 528, 261-266.
20. Yeh, L.; Jan, Y.N. 1989. Voltage-sensitive Ion Channel – *Cell*, 56:13-25.
21. Randall, D.; Burggren, W.; French, K., 2001. The physical basis of neuronal function. In: ECKERT ANIMAL PHYSIOLOGY – MECHANISM AND ADAPTIONS. 5^a. ed. New York, pp 113-149.
22. Rudy, B. DIVERSITY AND UBIQUITY OF K CHANNEL. 1988. *Neuroscience*, 3:729-749
23. Vega, R.C.R.; Merino, E.; Becerril, B.; Possani, L.D. 2003. NOVEL INTERACTIONS BETWEEN K⁺ CHANNELS AND SCORPION TOXINS. *Trends in Pharmacological Sciences* 24(5), 222-227.
24. Mackinnon, R. 2003. POTASSIUM CHANNEL. *FEBS Letters* 555, 62-65.
25. Dreyer, F., 1990. PEPTIDE TOXINS AND POTASSIUM CHANNELS. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 115, 93-136.
26. Sperelakis N., 1995. ELETROGENESIS OF MEMBRANE EXCITABILITY. In: *Cell Physiology*. 1^a ed. California, pp. 255-278.

-
27. Moczydlowski, E.G., 2004. BK CHANNEL NEWS: FULL COVERAGE ON THE CALCIUM BOWL. *J. Gen. Physiol.* 123(5):471-3.
28. Neher, E., 1992. ION CHANNELS FOR COMMUNICATION BETWEEN AND WITHIN CELLS. *The EMBO Journal* 11, n° 5, 1673-1679.
29. Rodríguez de la Vega, R.C.; Possani, L.D., 2005. OVERVIEW OF SCORPION TOXINS SPECIFIC FOR Na⁺ CHANNELS AND RELATED PEPTIDES:BIODIVERSITY, STRUCTURE-FUNCTION, RELATIONSHIPS AND EVOLUTION. *Toxicon*, 1-14 (article in press).
30. Goudet, C.; Chi, C.W.; Tytgat, J., 2002. AN OVERVIEW OF TOXINS AND GENESFROM THE VENOM OF THE ASIAN SCORPION *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239-1258.
31. Cestéle, S.; Catterall, W.A., 2000. MOLECULAR MECHANISM OF NEUROTOXIN ACTION ON VOLTAGE-GATTED SODIUM CHANNELS. *Biochimie* 82, 883-892.
32. Doyle, D.A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R.A.; Kuo, A.; Gulbis, J.M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T. and MacKinnon, R, 1998. THE STRUCTURE OF THE POTASSIUM CHANNEL: MOLECULAR BASIS OF K⁺ CONDUCTION AND SELECTIVITY. *Science* 280,69-77.
33. Sitges M.; Possani, L.D.; Bayon, A., 1986. NOXIUSTOXIN, A SHORT-CHAIN TOXIN FROM THE MEXICAN SCORPION *Centruroides noxius*, INDUCES TRANSMITTER RELEASE BY BLOCKING K⁺ PERMEABILITY. *The Journal of Neuroscience* 6(6), 1570-1574.
34. Batista, C.V.F.; Gómez-Lagunas, F.; Lucas, S.; Possani, L.D., 2000. TC1, FROM *Tityus cambridgei*, IS THE FIRST MEMBER OF A NEW SUBFAMILY OF SCORPION TOXIN THAT BLOCKS K⁺-CHANNELS. *Febs Letters* 486, 117-120.

-
35. Pimenta, A.M.; Mansuelle, P.; Diniz, C.R.; Martin-Eauclaire, M.F., 2003. COVALENT STRUCTURE AND SOME PHARMACOLOGICAL FEATURES OF NATIVE AND CLEAVED A-KTX₁₂₋₁, A FOUR DISULFIDE-BRIDGED TOXIN FROM *Tityus serrulatus* VENOM. *Journal of Peptide Science* 9, 132-140.
36. Pimenta, A.M.; Stöcklin, R.; Favreau, P.; Bougis, P.E.; Martin-Eauclaire, M.F., 2001. MOVING PIECES IN A PROTEOMIC PUZZLE: MASS FINGERPRINTING OF TOXIC FRACTIONS FROM THE VENOM OF *Tityus serrulatus* (SCORPIONES, BUTHIDAE). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15, 1562-1572.
37. Debin, J.A.; Maggio, J.E.; Strchartz, G.R., 1993. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHLOROTOXIN, A Cl⁻ CHANNEL LIGAND FROM THE VENOM OF THE SCORPION. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 264, C361-C369
38. Wu, J.J.; Dai, L.; Lan, Z.D.; Chi, C.W., 2000. THE GENE CLONING AND SEQUENCING OF Bm-12, A CHLOROTOXIN-LIKE PEPTIDE FROM THE SCORPION *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 38, 661-668.
39. Moreau, M.E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N.; Marceau, F.; Adam, A., 2005. THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM: CURRENT AND FUTURE PHARMACOLOGICAL TARGETS. *Journal of Pharmacological Sciences* 99, 6-38.
40. Meki, A.M.M.; Nassar, A. Y.; Rochat, 1995. A BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDE (PEPTIDE K₁₂) ISOLATED FROM THE VENOM OF EGYPTIAN SCORPION *Buthus occitanus*. *Peptides* 16(8), 1359-1365.
41. Stanisavljevic, S.; Ignjatovic, T.; Deddish, P. A.; Brovkovich, V.; Zhang, K.; Erdos, E.G.; Skidgel, R.A., 2005. ANGIOTENSIN I – CONVERTING ENZYME INIBITORS BLOCK PKC ϵ BY ACTIVATING BRADYKININ B1 RECEPTORS IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS. *Journal of Pharmacology and Experiments Therapeutics* November, 1-25.

-
42. Bascands, J.L.; Schanstra, J.P.; Couture, R.; Girolami, J.P., 2003. LES RÉCEPTEURS DE LA BRADYKININE: DE NOUVEAUX RÔLES PHYSIO-PATHOLOGIQUES. *Médecine Sciences* 19(11), 1093-1100.
43. Bürrning, P.; Holmquist, B.; Riordan, J.F., 1983. SUBSTRATE SPECIFICITY AND KINETIC CHARACTERISTICS OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME. *Biochemistry* 22, 103-110.
44. Fernandez, J.H.; Neshich, G.; Camargo, A.C.M., 2004. USING BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDE STRUCTURES TO DEVELOP NEW ANTIHYPERTENSIVE DRUGS. *Genetics and Molecular Research* 3(4), 554-563.
45. Ferreira, L.A.F.; Alves, W.E.; Lucas, M.S.; Habermehl, G.G., 1996. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A BRADYKININ POTENTIATING PEPTIDE (BPP-S) ISOLATED FROM *Scaptocosa raptoria* VENOM. *Toxicon* 34(5), 599-603.
46. Ferreira, S.H.; Barlet, D.C.; Greene, L.J., 1970. ISOLATION OF BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDES FROM *Bothrops jararaca* VENON. *Biochemistry* 9(13), 2583-2593.
47. Pimenta, A.M.C.; Lima, M.E., 2005. SMALL PEPTIDES, BIG WORLD: BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL IN NEGLECTED BIOACTIVE PEPTIDES FROM ARTRHOP VENOMS. *Journal of Peptide Science* 11, 670-676.
48. Lien, S.; Lowman, H.B., 2003. THERAPEUTIC PEPTIDES. *TRENDS in Biotechnonology* 21(12), 556-562.
49. Barret, C.T.; Barret, J.F., 2003. ANTIMICROBIALS: ARE THE ENTRIES ENOUGH TO DEAL WITH THE EMERGING RESISTANCE PROBLEMS? *Current Opinion in Biotechnonology* 14, 621-626.
50. Ulvatne, H., 2003. ANTIMICROBIAL PEPTIDES: POTENTIAL USE IN THE SKIN INFECTIONS. *American Journal of Clinical Dermatology* 4(9):591-595.

-
51. Aitken, A.; Learmonth, M., 1996. THE PROTEIN PROTOCOLS HANDBOOK. 1st ed. New Jersey. Humana Press.
52. Blum, H.; Bier, H.; Gross, H.J., 1987. IMPROVED SILVER STAINING OF PLANT PROTEINS, RNA AND DNA IN POLYACRILAMIDE GELS. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-95.
53. Fontes, W.; Cunha, R.B.; Sousa, M.V.; Morhy, L., 1998. IMPROVING THE RECOVERY OF LYSINE IN AUTOMATED PROTEIN SEQUENCING. *Anal. Biochem.* 258, 259-267.
54. Atherton, E.; Sheppard, R. C., 1989. SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS: A PRATICAL APPROACH. Oxford: I.R.L. Oxford University Press.
55. Chen, Y. H.; Yang, J. T.; and Chau, K. H., 1974 DETERMINATION OF THE HELIX AND α FORM OF PROTEINS IN AQUEOUS SOLUTION BY CIRCULAR DICHROISM. *Biochemistry* 13, 3350-3359.
56. Hunt, D.; Yates; J.R. 3rd; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C.R., 1986. PROTEIN SEQUENCING BY TANDEM MASS SPECTROMETRY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6233-6237.
57. Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C., 2005. HOW TO STUDY PROTEINS BY CIRCULAR DICHROISM. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751, 119-139.
58. Aires, M. M., 1999. FISILOGIA. Ed. Guanabara Koogan S.A. 2^a. ed. Rio de Janeiro – RJ. pp. 325-351.
59. Schuster, A.; Bény, J.L.; Meister, J.J., 2003. MODELLIN THE ELECTROPHYSIOLOGICAL ENDOTHELIAL CELL RESPONSE TO BRADYKININ. *Eur. Biophys. J.* 32, 370-380.

-
60. Vane, J.R.; Bergström, S., 1980. PROSTACYCLIN. Raven Press Books. 2^a ed. New York, USA. Pp119-133.
61. Fernandes, P.D.; Assreuy, J.,1994. CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL. *Ciência Hoje* 18(103), 6-10.
62. Fernandez, J.H.; Neshich, G.; Camargo, A.C.M., 2004. USING BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDE STRUCTURES TO DEVELOP NEW ANTIHYPERTNSIVE DRUGS. *Genetics and Molecular Research* 3(4), 554-563.
63. Hayashi, M.A.F.; Camargo, A.C.M., 2005. THE BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDES FROM VENOM GLAND AND BRAIN OF *Bothrops jararaca* CONTAIN HIGLY SITE SPECIFIC INHIBITORS OF THE SOMATIC ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME. *Toxicon* 45, 1163-1170.
64. Ianzer, D.; Konno, K. Marques-Porto, R. Portaro, F.C.V.; Stöcklin, R.; Camargo, A.C.M.; Pimenta, D.C.,2004. IDENTIFICATION OF FIVE BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDES (BPPs) FROM *Bothrops jararaca* CRUDE VENOM BY USING ELECTRSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY AFTER A TWO-STEP LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Peptides* 25, 1085-1092.
65. Villarroel, A.; Marrion, N.V.; Lopez, H.; Adams, P.R., 1989. BRADYKININ INHIBITS A POTASSIUM M-LIKE CURRENT IN RAT PHEOCHROMOCYTOMA PC12 CELLS. *FEBS Letters* 255(1), 45-46.
66. Liu, B. Freyer, A.; Hall, I.P., 2003. BRADYKININ ACTIVATES CALCIUM-DEPENDENT POTASSIUM CHANNEL OF SMALL CONDUCTANCE IN CULTURED HUMAN AIRWAY SMOOTH MUSCLE CELLS. *Proceedings of the British Pharmacological Society* 1(3), 059P abstract.
67. Kowalska, K.; Carr, D.B.; Lipkowski, A.W., 2002. DIRECT ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF SUBSTANCE P. *Life Sciences* 71, 747-750.