

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO VENENO BRUTO E DETOXIFICADO DE *TITYUS*
SERRULATUS EM OVINOS PRODUTORES DE ANTIVENENO**

MARINA GUIMARÃES FERREIRA

Belo Horizonte

Escola de Veterinária-UFMG

2013

Marina Guimarães Ferreira

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO VENENO BRUTO E DETOXIFICADO DE *TITYUS*
SERRULATUS EM OVINOS PRODUTORES DE ANTIVENENO**

Tese apresentada a Escola de Veterinária da UFMG
como requisito parcial para obtenção de grau em
Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Toxicologia Animal

Orientadora: Marília Martins Melo

Co-Orientadores: Carlos Delfin Olortegui

Clara Guerra Duarte

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2013

F 383e

Ferreira, Marina Guimaraes, 1978-

Estudo da toxicidade do veneno bruto e detoxificado de *Tityus serrulatus* em ovinos produtores de antiveneno / Marina Guimaraes Ferreira. – 2013.

100-p. : il

Orientadora: Marília Martins Melo

Co-orientadores: Carlos Delfin Olórtgui, Clara Guerra Duarte

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Ovino – Teses. 2. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 3. *Tityus serrulatus* – Teses. 4. Escopião – Veneno – Teses. 5. Antivenenos – Teses. 6. Toxicologia Veterinária – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Olórtgui, Carlos Delfin. III. Guerra, Clara Duarte. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD-636.089 59

Tese defendida e aprovada em 08 de fevereiro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



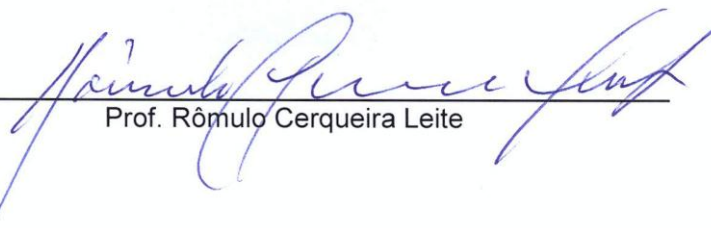
Prof^a. Marília Martins Melo
Presidente



Prof^a. Ana Flávia Ribeiro Machado Michel.



Prof. Rogério Carvalho Souza



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Benito Soto Blanco

*Aos meus pais, irmãos, sobrinhos,
amigos e mestres.*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que guardou minha vida, sustentou meus sonhos e me capacitou para realizá-los.

Agradeço a todos que tornaram possível a realização deste trabalho. Entre tantos, gostaria de lembrar:

Meus queridos pais, Paulo e Martha, pela intensidade e beleza de nossa relação onde construí meus valores e modeleí minhas escolhas.

Geralda, minha segunda mãe, que sempre cuidou tão bem de mim e vive cada conquista de minha vida.

Meus irmãos André e Rafael, pelo companheirismo, dedicação e cumplicidade.

Meus sobrinhos Tetê e Miguel, que com sua vivacidade e ternura me fazem reviver as coisas doces da vida tão esquecidas pelos adultos.

A Professora Marília, minha orientadora, pelo apoio e estímulo em todos os momentos. Obrigada pelo trabalho acurado, pelas intervenções sempre lúcidas, pelo vasto conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos e principalmente, pela certeza de sua amizade.

Meus co-orientadores Carlos Delfin Chávez Olórtegui e Clara Guerra Duarte que participaram da elaboração das idéias deste projeto, e com grande disposição disponibilizaram materiais que tão bem qualificaram e viabilizaram meu trabalho.

Os professores da Clínica de Ruminantes, em especial Lobão e Último, que tão carinhosamente esclareceram minhas dúvidas e me orientaram desde o início desta trajetória.

O professor Ernane Fagundes do Nascimento pela solidariedade e imenso apoio nas avaliações histopatológicas mesmo que solicitadas em rápido tempo.

Os professores Fabíola e Paulo Ricardo pela atenção carinhosa ao orientar meus questionamentos.

O professor Marcos Bryan Heinemann pela presteza no atendimento de minhas dúvidas.

A banca de qualificação por todas as sugestões e críticas apresentadas.

A todos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pela presteza e atenção aos meus pedidos, me acolhendo tão bem!

Toda equipe do laboratório de Toxicologia, em especial Ana Flávia pela experiência compartilhada na execução das eletroforeses; Maira pelo apoio na avaliação dos eletrocardiogramas; Lorena, Manuela e Danilo, pela colaboração nas atividades diárias e pela agradável convivência; Mailson e Lilian, pela ajuda incansável, pela disponibilidade e comprometimento e pelos frutos saborosos de nosso trabalho.

Euler Fraga pelos ensinamentos na realização dos eletrocardiogramas de maneira tão paciente e carinhosa.

A amiga Tati Fiúza, pela proximidade e carinho ao me ensinar o processamento dos materiais.

O amigo Leandro Caxito, pela constante disponibilidade, apoio e realização dos hemogramas.

“A família ruminantes”: Júlia, Luciele, Hélio, Passon, Emerson, Gustavo, Tiaguinho, Marrento, Letícia, Filipe, Marcella, Ronaldo e Helena, pelo convívio e bons momentos compartilhados.

Os queridos amigos Moisés, Rodrigo e José pelo apoio incondicional, boas risadas e que sempre estiveram presentes em todos os sentidos.

Os estagiários da Clínica de Ruminantes que tanto colaboraram na realização das atividades cotidianas com os animais, especialmente Diogo, Carol, Elias, Raisa, Danila, Deborah, Isabella e Sarah.

Danilo Barros, pela prontidão e paciência nas análises dos dados estatísticos.

Dani e Carol, amigas de muito tempo, sempre presentes nos momentos importantes de minha vida e, as novas amigadas, em especial Rafa e Nina, Fabi, Carol, Dhê e Luíza (gracinha), por tornarem meu dia a dia mais agradável.

Grazi e Cairo do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela inestimável ajuda ao disponibilizar instalações e materiais do Laboratório.

Todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFMG, em especial Adão, Sr. Isalto, Vaguinho, Luis, Sr. Narci, Kátia, João, Palhinha, Fábio e Nei que tanto me incentivaram com sua presteza e atenção.

O Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal, em especial Luzete, pela competência profissional demonstrada na condução dos trâmites administrativos indispensáveis à vida acadêmica.

Os colegas Fabiane Cassou e Guilherme, pela ajuda no fornecimento de feno para os ovinos do experimento.

A Fundação Ezequiel Dias (FUNED) por toda ajuda, principalmente pelo adjuvante e camundongos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – CAPES, pela concessão da Bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	17
1) INTRODUÇÃO.....	18
2) LITERATURA CONSULTADA	19
2.1) Escorpiões	19
2.1.1) Escorpiões no Brasil.....	20
2.2) Veneno Escorpiônico	22
2.3) Efeitos Clínicos.....	23
2.4) Classificação Clínica dos Acidentes Escorpiônicos	25
2.5) Alterações Sanguíneas.....	25
2.6) Exames Complementares	27
2.7) Tratamento.....	28
2.7.1) Soroterapia.....	28
3) OBJETIVOS	31
3.1) Objetivo Geral	31
3.2) Objetivos Específicos	31
4) MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1) Animais e local	32
4.2) Imunização dos animais	33
4.3) Exames Físicos	33
4.4) Eletrocardiogramas	34
4.5) Exames Laboratoriais.....	34
4.6) Reatividade de Anticorpos por ELISA.....	34
4.7) Eutanásia, necropsia e exames microscópicos.....	35
4.8) Neutralização in vivo em camundongos.....	36
5) ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
6) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.1) Determinação da DL ₅₀	36
6.2) Toxicidade do Veneno Conjugado.....	36
6.3) Caracterização Bioquímica do Veneno	37
6.4) Reatividade de anticorpos por ELISA.....	39
6.5) Avaliações Físicas.....	41
6.6) Eletrocardiograma (ECG).....	50
6.7) Análises Laboratoriais.....	52

6.7.1) Hematologia:.....	52
6.7.1.1) Contagem total de leucócitos.....	54
6.7.1.2) Contagem diferencial de leucócitos	55
6.7.1.3) Contagem total de eritrócitos	59
6.7.1.4) Concentração de hemoglobina	61
6.7.1.5) Volume Globular	61
6.7.1.6) Contagem total de plaquetas.....	62
6.7.2) Bioquímica Sanguínea	63
6.7.2.1) Proteínas plasmáticas totais.....	63
6.7.2.2) Proteínas plasmáticas fracionadas.....	65
6.7.2.3) Creatina quinase (CK)	75
6.7.2.4) Lactato Desidrogenase (LDH).....	76
6.7.2.5) Amilase	77
6.7.2.6) Gama-glutamyltransferase (GGT).....	79
6.7.2.7) Aspartato Aminotransferase (AST)	81
6.7.2.8) Glicose	82
6.7.2.9) Uréia e Creatinina	84
6.8) Avaliação Anátomo-histopatológica.....	87
6.9) Soroneutralização in vivo.....	87
7) CONCLUSÕES.....	90
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
9)ANEXOS	99

LISTA DE TABELAS	Pag
Tabela 1: Cálculo da DL ₅₀ do veneno bruto extraído de <i>T. serrulatus</i>	36
Tabela 2: Teste de toxicidade do veneno de <i>T. serrulatus</i> tratado com glutaraldeído em camundongos.	37
Tabela 3: Valores médios da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura (T), pulso arterial e movimentos ruminais dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	42
Tabela 4: Frequência Cardíaca (FC) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes momentos do protocolo de imunização.	43
Tabela 5: Frequência Respiratória (FR) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes momentos do protocolo de imunização.	45
Tabela 6: Temperatura retal (°C) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes momentos do protocolo de imunização.	46
Tabela 7: Pulso arterial de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes momentos do protocolo de imunização.	47
Tabela 8: Movimentos ruminais de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes momentos do protocolo de imunização.	49
Tabela 9: Valores médios de leucócitos totais (WBC), hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (VG) e proteínas totais (PT) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	53
Tabela 10: Contagem total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	54
Tabela 11: Valores médios de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	55
Tabela 12: Valores médios de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	57
Tabela 13: Valores médios de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	58
Tabela 14: Valores médios de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	59
Tabela 15: Contagem de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	60
Tabela 16: Concentração sanguínea de hemoglobina (g/dl) em ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	61
Tabela 17: Valores do volume globular (VG) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	62
Tabela 18: Valores médios de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	63
Tabela 19: Valores plasmáticos de proteínas totais (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	64

Tabela 20: Concentração plasmática de albumina (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	66
Tabela 21: Concentração plasmática de α -globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	67
Tabela 22: Concentração plasmática de β_1 -globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	68
Tabela 23: Concentração plasmática de β_2 -globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	69
Tabela 24: Concentração plasmática de gama-globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	71
Tabela 25: Relação albumina e globulinas do plasma de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	72
Tabela 26: Valores médios de creatinina (mg/dl), CK total (U/L), LDH (U/L), amilase (U/L), GGT (U/L), AST (U/L), uréia (mg/dl) e glicose (mg/dl) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno Bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	74
Tabela 27: Concentração de creatina quinase (CK) Total em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	75
Tabela 28: Valores séricos de LDH (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	76
Tabela 29: Valores séricos de amilase (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	78
Tabela 30: Valores séricos de GGT (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	80
Tabela 31: Valores séricos de AST (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e Veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	81
Tabela 32: Valores plasmáticos de glicose (mg/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	83
Tabela 33: Valores séricos de uréia (mg/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	84
Tabela 34: Valores séricos de creatinina (mg/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	86
Tabela 35: Soroneutralização <i>in vivo</i> de camundongos desafiados com veneno de <i>Tityus serrulatus</i> .	87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Reatividade individual de anticorpos por ELISA em ovinos que receberam PBS durante o protocolo de imunização para produção de antiveneno escorpiónico	40
Gráfico 2 -	Reatividade individual de anticorpos por ELISA em ovinos que receberam veneno detoxificado de <i>T. serrulatus</i> durante o protocolo de imunização para produção de antiveneno escorpiónico	40
Gráfico 3-	Reatividade individual de anticorpos por ELISA em ovinos que receberam veneno detoxificado de <i>T. serrulatus</i> durante o protocolo de imunização para produção de antiveneno escorpiónico	40
Gráfico 4-	Reatividade de anticorpos por ELISA dos soros de ovinos que receberam PBS (controle), veneno bruto e veneno detoxificado de <i>T. serrulatus</i> durante o protocolo de imunização.	41
Gráfico 5-	Frequências cardíacas (bpm) de ovinos inoculados com PBS (grupo1), veneno bruto (grupo 2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 3) em diferentes momentos.	43
Gráfico 6-	Frequências respiratórias (movimento respiratório/min) de ovinos inoculados com PBS (grupo1), veneno bruto (grupo 2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 3) em diferentes momentos.	45
Gráfico 7-	Temperatura retal média dos ovinos inoculados com PBS (grupo 1), veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 3) em diferentes tempos.	46
Gráfico 8-	Pulso arterial dos ovinos inoculados com PBS (grupo 1), veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 3) em diferentes tempos.	48
Gráfico 9-	Movimentos ruminais dos ovinos inoculados com PBS (grupo 1), veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (grupo 3) em diferentes tempos.	49
Gráfico 10-	Valores de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos imunizados com PBS(G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	54
Gráfico 11-	Comportamento de neutrófilos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	56
Gráfico 12-	Comportamento de linfócitos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	57
Gráfico 13-	Comportamento de monócitos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	58
Gráfico 14-	Comportamento de eosinófilos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	59
Gráfico 15-	Contagem de eritrócitos ($\times 10^6$ células/ μL) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	60
Gráfico 16-	Valores sanguíneos de hemoglobina (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> (G3) em diferentes momentos.	61

Gráfico 17-	Comportamento dos valores médios do volume globular (%) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	62
Gráfico 18-	Comportamento de plaquetas dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	63
Gráfico 19-	Comportamento dos valores médios de proteínas plasmáticas totais (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	64
Gráfico 20-	Comportamento dos valores médios de albumina (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	66
Gráfico 21-	Comportamento dos valores médios de alfa-globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	67
Gráfico 22-	Comportamento dos valores médios de Beta ₁ -globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	69
Gráfico 23-	Comportamento dos valores médios de Beta ₂ -globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	70
Gráfico 24-	Comportamento dos valores médios de gama-globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	71
Gráfico 25-	Comportamento da relação albumina/globulinas em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> em diferentes tempos.	72
Gráfico 26-	Comportamento dos valores médios de CK (U/L) Total em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	75
Gráfico 27-	Comportamento dos valores médios de LDH (U/L) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	77
Gráfico 28-	Comportamento dos valores médios de amilase (U/L) sérica em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	78
Gráfico 29-	Comportamento dos valores médios de GGT (U/L) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	80
Gráfico 30-	Comportamento dos valores médios de AST (U/L) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	82
Gráfico 31-	Comportamento dos valores médios de glicose (mg/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	83

Gráfico 32-	Comportamento dos valores médios (mg/dl) de uréia em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	85
Gráfico 33-	Comportamento dos valores médios de creatinina (mg/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de <i>Tityus serrulatus</i> .	86
Gráfico 34-	Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de <i>Tityus serrulatus</i> e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido nos ovinos.	88
Gráfico 35-	Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de <i>Tityus serrulatus</i> e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido em ovinos do grupo controle.	89
Gráfico 36-	Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de <i>Tityus serrulatus</i> e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido nos ovinos do grupo imunizado com veneno bruto.	89
Gráfico 37-	Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de <i>Tityus serrulatus</i> e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido nos ovinos do grupo imunizado com veneno bruto.	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Morfologia do escorpião.	19
Figura 2-	Fêmea de <i>Tityus serrulatus</i> carregando filhotes no dorso.	21
Figura 3-	Molécula de glutaraldeído.	31
Figura 4-	Ovinos em baias coletivas no Galpão de Clínica de Ruminantes.	32
Figura 5-	Ovinos em baias coletivas no Galpão de Clínica de Ruminantes.	32
Figura 6-	SDS-PAGE (15%) dos principais componentes do veneno bruto e detoxificado de <i>Tityus serrulatus</i> , após coloração com Comassie-blue.	37
Figura 7-	<i>Western Blotting</i> individual dos ovinos imunizados com PBS (1-4), veneno bruto de <i>T. serrulatus</i> (5-8) e detoxificado com glutaraldeído (9-12).	38
Figura 8-	<i>Western Blotting</i> do <i>pool</i> de soros de cada grupo de ovinos imunizados.	39
Figura 9-	Ovino apresentando abscesso no local de aplicação do veneno detoxificado (G3) de <i>T. serrulatus</i> associado ao uso do adjuvante de Freund.	51
Figura 10-	Complexo QR em ovinos inoculados com veneno bruto ou detoxificado de <i>T. serrulatus</i> .	51
Figura 11-	Complexo QS em ovinos inoculados com veneno bruto ou detoxificado de <i>T. serrulatus</i> .	51
Figura 12-	Complexo qR em ovinos inoculados com veneno bruto ou detoxificado de <i>T. serrulatus</i> .	51
Figura 13-	Gel de agarose demonstrando o fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas dos ovinos.	65
Figura 14-	Perfil eletroforético demonstrando as cinco frações protéicas do plasma de ovinos.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A/G	Relação Albumina/Globulinas
AST	Alanina Aminotransferase
BPM	Aspartato Aminotransferase
CK	Batimento por minuto
CK-MB	Creatina quinase
CK-MM	Creatina quinase isoenzima cardíaca
cm	Creatina quinase isoenzima muscular
DL ₅₀	Centímetros
ECG	Dose Letal 50
ELISA	Eletrocardiograma
FA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC	Fosfatase Alcalina
FNT	Frequência Cardíaca
FR	Fator de necrose tumoral
GGT	Frequência Respiratória
HGB	Gama-glutamyltransferase
IgA	Concentração de Hemoglobina
IgE	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina M
IgD	Imunoglobulina G
IL-1	Imunoglobulina D
IL-6	Interleucina – 1
IV	Interleucina – 6
kg	Intravenoso
MHC	Quilogramas
mg	Complexo de Histocompatibilidade Principal
PBS	Miligramas
PT	Salina Tamponada em Fosfato Estéril
RBC	Proteínas Totais
Rpm	Red Blood Cells (Total de Eritrócitos)
T	Rotações por minuto
TPC	Temperatura
V	Tempo de perfusão capilar
VG	Voltagem
WBC	Volume globular
	White blood cells (Total de Leucócitos)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do veneno bruto de *Tityus serrulatus* e detoxificado com glutaraldeído na produção de antiveneno escorpiônico em ovinos e estudar a sua capacidade neutralizante em camundongos desafiados com veneno, como possível alternativa na substituição do protocolo de imunização adotado no país na produção de soros hiperimunes. Doze ovinos, saudáveis, peso médio 30 kg, foram distribuídos em três grupos (n=4): G1 (controle), G2 (veneno bruto) e G3 (veneno detoxificado), sendo o protocolo de imunização adotado com seis doses, três associadas ao adjuvante de Freund, com espaço de 21 dias entre elas e três sem adjuvante (reforços), espaçadas em três dias. Os animais do G1 receberam nas três primeiras imunizações solução salina tamponada em fosfato (PBS) associada ao adjuvante de Freund, numa proporção de 1:1, enquanto os outros dois grupos receberam 0,5 mg do veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) respectivamente, diluído em PBS, associado ao adjuvante. Os reforços contaram com aplicação de 1/3 da dose inicial, somente com PBS. Antes (tempo zero), 24 e 48h após as imunizações, todos os animais foram submetidos a exames físicos, eletrocardiogramas e exames hematológicos e bioquímicos, dosando-se AST, GGT, CK, LDH, uréia, creatinina, glicose, amilase pancreática e proteínas totais e fracionadas. Sete dias após o primeiro ciclo de imunização, todos os animais foram eutanasiados e realizados exames macro e microscópicos, não sendo encontrada nenhuma alteração. Somente os animais do G2 apresentaram alterações clínicas discretas sugestivas da ação do veneno de *Tityus serrulatus*. Não houve alteração significativa do número de leucócitos, neutrófilos e eosinófilos nos três grupos estudados e nas três primeiras imunizações. Observou-se aumento gradual da enzima GGT no G3, sugerindo uma possível e discreta ação hepatotóxica do glutaraldeído. Houve aumento da fração beta-2 especialmente nos grupos 2 e 3, nas imunizações com os reforços, demonstrando uma resposta inflamatória. Para os ensaios de soroneutralização foram utilizados camundongos Swiss, com peso médio de 26 g, divididos em 15 grupos (n=4): G1 a G4 (200 µl de antiveneno dos ovinos controle + veneno de *T. serrulatus*), G5 a G8 (200 µl de antiveneno dos ovinos imunizados com veneno bruto + veneno de *T. serrulatus*), G9 a G12 (200 µl de antiveneno dos ovinos imunizados com veneno detoxificado + veneno de *T. serrulatus*), G13 (veneno de *T. serrulatus*), G14 (soro anti-escorpiônico proveniente da FUNED + veneno de *T. serrulatus*) e G15 (pool de soro dos ovinos que receberam adjuvante de Freund sem veneno). Foram encontradas taxas de proteção de 25%, 56,3% e 43,8% para os soros oriundos do grupo G1, G2 e G3, respectivamente. Conclui-se que o veneno detoxificado com glutaraldeído pode ser utilizado como imunógeno, uma vez que os animais do G3 não apresentaram sinais de toxicidade quando submetidos a este protocolo de imunização e foram capazes de produzir anticorpos neutralizantes do veneno de *T. serrulatus* em camundongos desafiados.

Palavras-chave: antiveneno, detoxificação, ovinos, *Tityus serrulatus*, soroneutralização.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the toxicity of the crude venom of *Tityus serrulatus* and detoxified with glutaraldehyde in the production of scorpion antivenom in sheep, and study its neutralizing capacity in mice challenged with venom, as an alternative to replace the immunization protocol adopted in the country in production of antivenom. Twelve sheep, healthy, mean weight of 30 kg, were distributed into three groups (n=4): G1 (control), G2 (venom) and G3 (detoxified venom). It was used the immunization protocol (first cycle) adopted with six doses, three associated Freund's adjuvant, with space between them of 21 days and three with no adjuvant (booster) spaced three days. The G1 animals received the six immunizations with phosphate buffered saline (PBS) associated with Freund's adjuvant (1:1), while the other two groups received 0.5 mg of venom (G2) and detoxified venom (G3), respectively, diluted in PBS, associated with the Freund adjuvant. The boosters counted with applying 1/3 of the initial dose, with only PBS. Before (time zero), 24 and 48 hours after immunization, all animals underwent clinical examinations, electrocardiograms and hematological and biochemical exams, dosing the AST, GGT, CK, LDH, urea, creatinine, glucose, pancreatic amylase, total protein and fractionated. Seven days after the first cycle of immunization, all animals were euthanized and gross and microscopic exams were evaluated. Any amendment macro or microscopic been seen in animal studies. Only animals of G2 showed mild clinical changes suggestive of the action of *Tityus serrulatus*. Regarding hematological profile, significant change in the number of leukocytes, neutrophils and eosinophils was observed in the three groups and the first three immunizations, in which we used Freund's adjuvant. There was a gradual increase in the enzyme GGT in animals of G3, suggesting a possible hepatotoxic discrete action of glutaraldehyde. Regarding the fractionated proteins, the fraction beta2, especially in groups 2 and 3, was increased in the booster immunizations, showing an inflammatory response. For neutralization assays it was used Swiss mice, with an average weight of 26 g distributed into 15 groups (n = 4): G1 to G4 (200 ul of antivenom control sheep + *T. serrulatus* venom), the G5 to G8 (200 ul of antivenom sheep immunized with crude + venom *T. serrulatus* venom), the G9 to G12 (200 ul of antivenom sheep immunized with detoxified venom+ venom of *T. serrulatus*), G13 (*T. serrulatus* venom), G14 (antivenom from the FUNED + venom of *T. serrulatus*) and G15 (pool serum of sheep receiving Freund's adjuvant without venom). We found rates of protection of 25%, 56.3% and 43.8% for sera from the G1, G2 and G3, respectively. It is concluded that the venom detoxified with glutaraldehyde may be used as immunogen, since animals of G3 showed no signs of toxicity while undergoing this immunization protocol and they were able to produce neutralizing antibodies venom of *T. serrulatus* in mice challenged.

Keywords: antivenom, detoxification, sheep, *Tityus serrulatus*, neutralization.

1) INTRODUÇÃO

O envenenamento escorpiônico é um problema médico-sanitário e tem se mostrado alarmante devido ao aumento de acidentes nos últimos anos, principalmente em países tropicais e subtropicais, sendo responsável por óbitos em homens e animais. A soroterapia é uma ferramenta essencial para o tratamento deste envenenamento, sendo que atualmente muitas pesquisas se voltam para o desenvolvimento de soros antiescorpiônicos e imunógenos menos tóxicos para fabricação desses soros específicos.

No Brasil, o escorpião considerado mais nocivo pertence ao gênero *Tityus*, compreendendo principalmente as espécies *T. serrulatus*, *T. stigmurus* e *T. bahiensis*, sendo que *T. serrulatus* é responsável pela maioria dos acidentes e também pelos casos mais graves em humanos (Marcussi et al., 2011).

Os acidentes pelos escorpiões assumem grande importância não somente por sua alta incidência, mas também pela sua potencialidade em induzir quadros clínicos graves, muitas vezes fatais, principalmente em crianças, que podem desenvolver falência cardíaca e edema pulmonar (Martins et al., 2008).

Dados de 2008 apresentados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) demonstraram que de todos os acidentes com animais peçonhentos ocorridos no Brasil (16.214 casos), os escorpiões foram responsáveis por 39,3% deles (6.912), enquanto as serpentes e aranhas por 18,1 e 16,7% respectivamente (Marcussi et al., 2011).

No ano de 2010, foram notificados 50.126 acidentes, dos quais 88 evoluíram para o óbito, tendo uma incidência de 26,3 acidentes/100.000 habitantes. O maior número de acidentes ocorreu no Estado de Minas Gerais, com 12.016 casos, seguido da Bahia (8.910) e São Paulo (6.790) (Ministério da Saúde, 2012).

O tratamento recomendado no envenenamento escorpiônico consiste na imunoterapia com anticorpo específico anti-*Tityus* ou anti-aracnídeo e, suporte para resolução da sintomatologia observada. Atualmente a soroterapia é a prática mais comum para prevenir a morte de indivíduos críticos (Gazarian et al., 2005). O soro antiescorpiônico por via intravenosa está formalmente indicado em todos os casos graves e nos moderados apenas em crianças abaixo de sete anos de idade (Freire-Maia et al., 1994; Cupo et al., 2003).

A produção de antiveneno consiste na administração de injeções de material extremamente tóxico nos animais produtores,

principalmente equinos e ovinos, e as repetidas doses fazem com que o animal sofra os sintomas do envenenamento, devido às perturbações nos sistemas neuromuscular, cardiovascular e respiratório (Machado de Ávila et al., 2004). Dessa forma, os animais utilizados para produção de antiveneno possuem saúde debilitada e expectativa de vida reduzida (Chippaux e Goyffon, 1998; Gazarian et al., 2005), o que levanta importantes questões bioéticas a respeito da produção dos antivenenos.

O estudo de imunógenos eficazes na geração de anticorpos neutralizantes, mas que não sejam tóxicos para o animal produtor é de grande importância para a produção de antivenenos. Assim, o desenvolvimento de imunógenos alternativos é de grande interesse, tais como: peptídeos sintéticos, anatoxinas, toxinas recombinantes e as próprias toxinas detoxificadas (Devaux et al., 1997; Chavez-Olórtegui et al., 1997; Mendes et al., 2008; Marcussi et al., 2011). Especialmente, na Medicina Veterinária a administração destes imunógenos propicia uma melhoria nas condições de vida do animal produtor do antiveneno, além de outros benefícios, como a produção de imunoglobulinas mais específicas e de maior afinidade, direcionadas de fato para a neutralização dos agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno escorpiônico.

Uma alternativa seria a detoxificação dos venenos com glutaraldeído, que tem sido amplamente utilizado no preparo de vacinas. Trabalhos têm demonstrado que a inativação de bactérias, toxinas e vírus através deste composto químico pode produzir vacinas seguras, potentes e estáveis (Gupta et al., 1988; Keles et al., 1998).

Keles et al. (1998) demonstraram que a inativação do vírus sincicial respiratório bovino através do glutaraldeído foi eficiente na produção de resposta humoral e celular em cordeiros imunizados. Todavia, tentativas de inativação do vírus com formaldeído não foram efetivas na vacinação de crianças.

A inativação da bactéria para produção de vacina contra coqueluche foi eficaz quando utilizado o glutaraldeído numa concentração de 0,1% (Gupta et al., 1988; Arya et al., 1989). Da mesma forma, a produção de vacina contra difteria-tétano utilizando o glutaraldeído se mostrou melhor inóculo quando comparada às vacinas inativadas pelo tratamento térmico (com elevadas temperaturas) ou uso de formaldeído (Gupta et al., 1987).

Na imunização de cavalos soroprodutores contra venenos botrópico e crotálico, os animais que receberam venenos tratados com glutaraldeído (0,34%) não apresentaram reações locais ou sistêmicas ou estas foram clinicamente reduzidas e, o título de

anticorpos produzidos no soro foi muito semelhante ao dos animais imunizados com veneno não detoxificado (Guidolin et al., 1989). Portanto, alguns estudos têm demonstrado que o tratamento químico de toxinas ou venenos com glutaraldeído já é conhecido há algum tempo e pode possibilitar uma resposta imune efetiva.

Diante deste contexto, torna-se imperativo o estudo de imunógenos que sejam eficientes e menos tóxicos para os animais produtores de antiveneno, fornecendo informações relevantes à Medicina Veterinária e Humana.

2) LITERATURA CONSULTADA

2.1) Escorpiões

Os escorpiões são artrópodes, pertencentes à classe dos aracnídeos e ordem *Scorpiones*, seres predominantes nas zonas tropicais e subtropicais do mundo. São seres primitivos, dotados de mais de 450 milhões de anos e, devido às suas características rudimentares, são apontados como as primeiras criaturas a habitarem o ambiente terrestre

(Lourenço e Eickstedt, 2003; Melo et al., 2004). Estão distribuídos em nove famílias e hoje mais de 1.600 espécies são conhecidas. A família Buthidae possui ampla distribuição no Brasil e no mundo, sendo considerada a mais importante do ponto de vista epidemiológico (Dias et al., 2001).

O corpo do escorpião é dividido em cefalotórax, abdômen e cauda (Figura 1). A face dorsal do cefalotórax é constituída por uma carapaça quitinosa não segmentada que protege o animal da perda excessiva de líquido. Dessa forma, os escorpiões sobrevivem em condições adversas, suportando permanecer até seis meses sem água ou qualquer tipo de alimento. A cauda é formada por cinco segmentos e na sua extremidade há um artículo conhecido por télson ou vesícula, que termina em um ferrão. O télson contém um par de glândulas de veneno que desembocam em dois orifícios situados de cada lado da ponta do ferrão (Candido, 1999). Possuem quatro pares de patas articuladas e um par de pedipalpos com quelíceras apropriadas para preensão da presa e sua condução à boca (Cardoso et al., 2003).

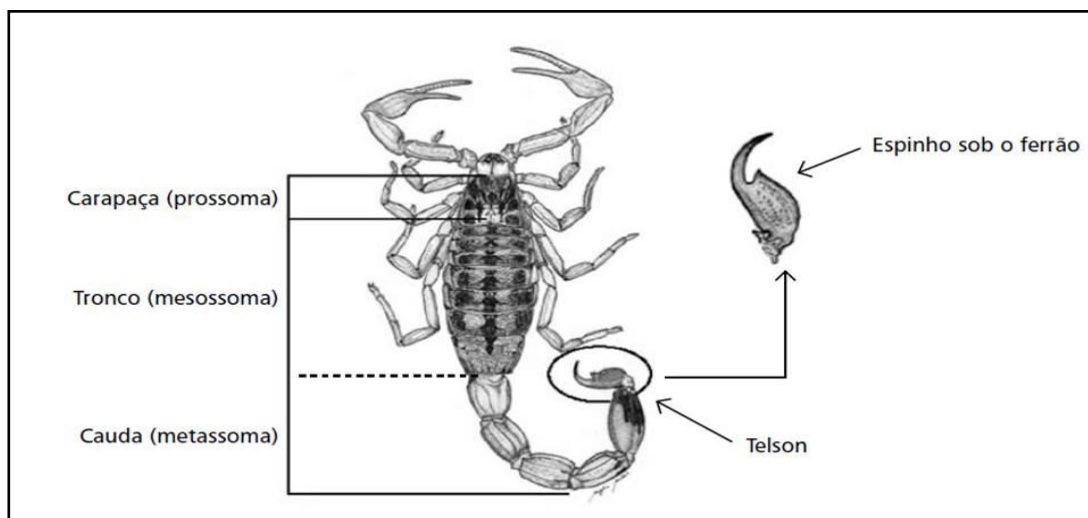


Figura 1: Morfologia do escorpião (Ministério da Saúde, 2009).

Os escorpiões se adaptaram aos mais variados tipos de habitat, dos desertos às florestas tropicais e do nível do mar a altitudes de até 4.400 metros. São seres de hábitos noturnos, sendo o verão o maior período de atividade, principalmente em épocas chuvosas. Alimentam-se de insetos e vivem por cerca de três a cinco anos, podendo sobreviver vários meses sem alimento e sem água (Marcussi et al., 2011). Habitam todos os continentes, exceto a Antártida e vivem em terra firme e em quase todos os

ecossistemas terrestres, como desertos, savanas, florestas temperadas e tropicais (Cruz, 1994). Podem ser encontrados sob pedras, madeiras, troncos podres, bromélias que crescem no chão ou em grandes alturas nas árvores (Polis, 1990).

Alimentam-se principalmente de insetos e aranhas, sendo que o canibalismo apesar de pouco comum, pode ocorrer em consequência da pouca oferta de alimento e espaço, contudo, se bem alimentados e o substrato oferecido for abundante, o canibalismo dificilmente ocorrerá (Matthiensen, 1984; Cruz, 1994). Possuem como

principais predadores camundongos, sapos, macacos, quatis, lagartos, corujas, galinhas, algumas aranhas, formigas e os próprios escorpiões. Mas sem dúvida o homem tem colaborado nesse sentido, através da utilização de agrotóxicos, fogo, desmatamento e crescimento urbano descontrolado (Guarnieri, 1998).

Os escorpiões são considerados subsociais, os jovens são carregados nas costas da mãe até a primeira muda dos filhotes. Podem viver isolados ou em grupos, como é o caso da espécie *Tityus serrulatus*. Possuem hábitos noturnos, passando o dia em buracos e fendas sob rochas, pedras, troncos caídos e saem à noite em busca de uma presa (Ministério da Saúde, 2001).

Todos os escorpiões produzem veneno, mas os pertencentes à família Buthidae são os mais nocivos, sendo encontrados 48 gêneros e aproximadamente 1.400 espécies, sendo 25 letais ao homem (Pardal et al., 2003). As subfamílias Buthinae e Tityinae são responsáveis por acidentes graves (Cardoso et al., 2003).

O escorpionismo ocorre mais frequentemente nos períodos quentes e chuvosos, principalmente por causa do desalojamento dos escorpiões de seus esconderijos, ocasionado pela água da chuva, e à maior mobilização, ao saírem à caça de insetos. A maior parte das picadas ocorre nas extremidades dos membros, sendo comum, porém, picadas em qualquer parte do corpo, quando o acidente ocorre durante o ato de vestir as roupas, onde o animal encontrava-se escondido (Campolina, 2006).

Nos acidentes escorpiônicos poucas espécies são incriminadas, principalmente devido ao fato de que os acidentados só procuram atendimento médico nos casos graves e, não há captura e identificação do escorpião (Lourenço et al., 1996; Lourenço et al., 2001).

2.1.1) Escorpiões no Brasil

No Brasil ocorrem cinco gêneros da família Buthidae: *Isometrus*, *Ananteris*, *Microtityus*, *Rhopalurus* e *Tityus*, este último representa o grupo de escorpiões mais perigosos ao homem e que se encontra distribuído por todo país (Lourenço, 2003; Wagner et al., 2003).

De acordo com o Ministério da Saúde, são relatados no Brasil mais de 35.000 casos por ano de envenenamento escorpiônico distribuídos em todos os Estados, tendo como representantes de maior importância nos acidentes quatro espécies do gênero *Tityus*: *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. paraensis* (Ministério da Saúde, 2009).

T. serrulatus é encontrado nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, enquanto a espécie *T. bahiensis* (escorpião preto ou marrom) foi descrito da Bahia até Santa Catarina e no Mato Grosso do Sul (Lourenço et al., 1996; Soares et al., 2002). *T. fasciolatus* se encontra na região central do Brasil, principalmente no Distrito Federal e Triângulo Mineiro (Barbosa et al., 2002; Wagner et al., 2003). Na região nordeste é relatado *T. stigmurus* (Lira-da-Silva et al., 2000), principalmente nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (Fundacentro, 2006).

A espécie *Tityus serrulatus* é popularmente conhecida como escorpião amarelo por esta ser sua cor predominante, possuindo o dorso de coloração escura (Figura 2). Mede até 7 cm de comprimento, suas populações são formadas apenas por fêmeas, cuja reprodução ocorre por partenogênese, ou seja, não há necessidade de fecundação (Candido, 1999; Ministério da Saúde, 2009). Cada fêmea pode ter três, quatro ou mais parições e cerca de 70 filhotes durante a vida (Matthiensen, 1971; Lourenço et al., 1996).



Figura 2: Fêmea de *Tityus serrulatus* carregando filhotes no dorso.

O nome da espécie é devido à presença de uma serrilha encontrada nos terceiro e quarto anéis da cauda. É considerado o escorpião mais venenoso da América do Sul devido à alta toxicidade de seu veneno (Martins et al., 2008). Vivem em locais úmidos e escuros, como pilhas de madeiras, entulhos, pedreiras, barrancos, construções antigas e serrarias, podendo se esconder em roupas e sapatos (Possani et al., 1992; Lourenço et al., 1996).

É a espécie mais estudada especialmente na região Sudeste. Isso se justifica pelo elevado percentual de acidentes, uma vez que 50% dos 10.000 acidentes anuais no Brasil ocorrem nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Diego-Garcia et al., 2005).

Dentre os fatores que ajudam a explicar o aumento na incidência do escorpionismo no território brasileiro, pode-se citar o crescimento urbano, com loteamentos colonizando novas áreas anteriormente não ocupadas pelo homem, favorecendo a expansão do escorpião *Tityus serrulatus*, principal espécie presente que, além de possuir reprodução partenogenética, apresenta hábitos domésticos e se adapta muito bem ao ambiente urbano, com o agravante de ser uma das espécies mais tóxicas conhecidas (Lourenço et al., 1996).

Embora o *Tityus serrulatus* seja primitivamente habitante de campos abertos e do cerrado, esta espécie conseguiu se adaptar à vida urbana, em virtude da rápida e desorganizada colonização do homem das regiões originalmente ocupadas por este animal. A disponibilidade de alimentos e abrigos, como lixo e entulhos, além da ausência de predadores e competidores, contribuíram ainda mais para adaptação e

proliferação deste aracnídeo nos centros urbanos e moradias humanas (Likes et al., 1984).

Em 1988 foi implantado pelo Ministério da Saúde o Programa Nacional de Controle dos Acidentes por Animais Peçonhentos e, a partir daí, os acidentes escorpiônicos no Brasil passaram a ser notificados. Dessa forma, aumentou significativamente o número de casos notificados. Os dados do Ministério da Saúde indicam que ocorrem cerca de 8.000 acidentes por ano, no Brasil, com coeficiente de incidência de três casos para cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2001). Cerca de 50% dos acidentes são diagnosticados nos estados de Minas Gerais e São Paulo, mas têm-se registrado aumento de notificações provenientes da Bahia, Rio Grande do Norte, Alagoas e Ceará (Ministério da Saúde, 2001; Soares et al., 2002, Cupo et al., 2003). Cardoso et al. (2003) levantaram 10.000 acidentes escorpiônicos notificados entre os anos de 1990 e 1993 em todo o Brasil e determinaram taxa de mortalidade em 1,1%.

No Estado de Minas Gerais, no ano de 2003, foram notificados à Coordenadoria de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde (SMS), 6.224 casos com 25 óbitos, sendo a maioria absoluta das picadas causadas pelo *T. serrulatus*. No mesmo ano, o Serviço de Toxicologia do Hospital João XXIII em Belo Horizonte atendeu 1.104 casos, com três óbitos (Campolina, 2006). A grande maioria dos casos clínicos dentro do Estado é considerada de baixa gravidade (3% são graves), o que contribui para a baixa letalidade dos envenenamentos por escorpiões (Soares et al., 2002).

A cidade de Belo Horizonte está localizada em “solo escorpionífero” (Bucherl,

1969; Alves et al., 2005). Em 2004, na capital mineira, foram realizados diretamente pelo Serviço de Toxicologia 5.780 atendimentos por acidentes com animais peçonhentos, entre eles escorpiões, lagartas, abelhas, serpentes, aranhas, vespas, marimbondos e formigas. Constatou-se que a grande maioria dos acidentes foi causada pelos escorpiões (59,5%), sendo que a espécie *T. serrulatus* foi identificada como agente causador principal (Campolina, 2006). Em 2010, esse comportamento prevaleceu, sendo notificados 50.126 casos de acidentes escorpiônicos no Brasil, principalmente em Minas Gerais (12.016), Bahia (8.910) e São Paulo (6.790) (Ministério da Saúde, 2012).

2.2) Veneno Escorpiônico

O veneno dos escorpiões é resultado da secreção de um par de glândulas de origem tegumentar, localizadas no télson. Este possui formato bulbar e termina no aguilhão, responsável pela inoculação do veneno na presa (Mendes, 2007). Apenas a família Buthidae possui espécies que produzem neurotoxinas. Estima-se que os escorpiões produzam 100.000 toxinas, porém apenas 1% destas é conhecido (Cupo et al., 2003).

É uma substância mucosa, opalescente, de aspecto leitoso e solúvel em água. Pode ser obtida através de maceração da glândula ou estímulo elétrico (Guarnieri et al., 1998). Possui complexa constituição, sendo composta de muitas proteínas de baixo peso molecular, aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídios, aminas bioativas, sendo desprovida de atividade hemolítica, fibrinolítica e fosfolipásica (Possani, 1984; Gwee et al., 1996), embora já se conheça ação de enzimas proteolíticas, que aumenta a permeabilidade do veneno e facilita sua difusão pelos tecidos (Almeida et al., 2002) e efeito hipotensor em função do relaxamento do endotélio vascular (Verano-Braga et al., 2008).

As neurotoxinas presentes nas peçonhas dos escorpiões têm como objetivo o ataque e imobilização das presas, mas também desempenham papel importante na defesa contra predadores (Bosmans e Tytgat, 2007). São considerados os componentes mais importantes do veneno e afetam os mecanismos de permeabilidade iônica de membranas excitáveis através da interação específica com canais iônicos (Possani et al., 1999).

Alguns venenos, como o do *T. serrulatus*, possuem outras substâncias, como uma proteína de alto peso molecular com atividade hialuronidase (Possani et al., 1977; Becerril et al., 1997). Essa contribui para a toxicidade do veneno e ajuda a distribuir as toxinas pelos tecidos podendo, até mesmo,

restringir a eficácia da soroterapia (Pessini et al., 2001). Santana et al. (1996) demonstraram que a absorção do veneno do local de inoculação para o sangue é rápida, assim como sua distribuição para os tecidos (30 minutos). Sua afinidade tecidual é alta, porém sua excreção lenta, ocorrendo em tempo 5,5 vezes maior que a distribuição.

Revelo et al. (1996) analisaram a distribuição corporal do veneno de *Tityus serrulatus* injetado por via subcutânea em camundongos. O veneno foi absorvido do sítio de inoculação em duas horas, alcançou sua concentração máxima no plasma, pulmões, coração e baço em 30 minutos e nos rins e no fígado em 15 minutos depois da inoculação. Dessa forma, a absorção do veneno e sua distribuição foram rápidas, sendo sua eliminação completa com 8 horas, uma vez que a meia vida de eliminação é 5,5 vezes maior que a meia vida de distribuição.

O estudo da farmacocinética do veneno do escorpião *Androctonus amoreuxi* demonstrou que a concentração máxima do veneno nos rins ocorreu em 15 minutos, no fígado e pulmão em 5-15 minutos e coração em 5 minutos após aplicação do veneno bruto em coelhos (Ismail e Abd-Elsalam, 1988).

É sabido que as toxinas dos escorpiões agem nos canais iônicos no sistema nervoso periférico, culminando com a liberação de mediadores químicos como acetilcolina e catecolaminas (Marcussi et al., 2011).

Os componentes melhor estudados são as neurotoxinas. Essas possuem caráter básico e são divididas em quatro famílias distintas, classificadas de acordo com sua especificidade de ligação com os canais iônicos: atuação nos canais de sódio (Na^+), canais de potássio (K^+), canais de cloro (Cl^-) e canais de cálcio (Ca^{++}) (Marcussi et al., 2011). De acordo com o tamanho, as toxinas escorpiônicas podem ser constituídas por pequenos peptídeos (menores que 40 aminoácidos), como as que afetam os canais de potássio e cloro (Debin et al., 1993) e, longos peptídeos (60-70 aminoácidos), que vão afetar os canais de sódio (Rochat et al., 1979), mas todas elas possuem em comum a estabilização por pontes dissulfeto (Vega e Possani, 2005). As toxinas que bloqueiam os canais de cálcio pertencem a um grupo extremamente heterogêneo, composto por cadeias longas e curtas (Olamendi-Portugal et al., 2002).

De forma geral, as toxinas que atuam nos canais de potássio e cloro são descritas como bloqueadoras, enquanto as de canal de sódio são moduladoras (Batista et al., 2000). As toxinas escorpiônicas que interferem nos canais de sódio são classificadas como α e β , e apresentam

grande importância na clínica do envenenamento (Cestéle e Caterral, 2000). As α -toxinas são voltagem dependente, diferente das β -toxinas, cuja ligação independe do potencial de membrana. As α -toxinas induzem o prolongamento da fase de repolarização do potencial de ação, enquanto as β -toxinas mudam o limiar de ativação do canal para potenciais mais negativos, interferindo, assim, no fechamento do canal durante a repolarização, o que culmina com repetidos potenciais de ação após uma única estimulação (Gonçalves et al., 2003; Gazarian et al., 2005).

Dessa forma, os canais iônicos sensíveis à voltagem mudam sua conformação para aberto, fechado ou inativado, em função da voltagem da membrana, o que culmina com a movimentação rápida de íons específicos a favor de seu gradiente eletroquímico para dentro ou para fora da célula com posterior despolarização ou hiperpolarização de sua membrana. A despolarização da membrana pode acarretar a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica e excitação do neurônio seguinte ou de células efectoras tais como o músculo esquelético. Vão ser vistos efeitos adrenérgicos e colinérgicos de intensidade variável em diversos órgãos (Catterall, 1984).

Através da realização de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), verificou-se concentrações variáveis de alfa e beta toxinas em 23 diferentes espécimes de *T. serrulatus*, capturados em Belo Horizonte. Foi detectada maior concentração de α -toxinas nas primeiras extrações de veneno, logo que o escorpião foi capturado, ao passo que o veneno extraído 40 dias depois apresentou maior concentração de β -toxinas. Uma observação extremamente importante é que os venenos ricos em α -toxinas apresentaram maior letalidade, o que demonstra a importância da utilização de *pools* de venenos de vários indivíduos de uma mesma região para produção de antivenenos, devido às diferenças individuais e geográficas entre animais de uma mesma espécie (Kalapothakis e Chávez-Olórtegui, 1997).

2.3) Efeitos Clínicos

O escorpião injeta seu veneno na camada subcutânea e intradérmica da vítima e este vai para a circulação sanguínea, sendo absorvido em poucas horas. A gravidade dos acidentes com *Tityus serrulatus* se relaciona com a concentração do veneno no plasma e nos sítios de ação (Rezende et al., 1996).

O prognóstico do envenenamento depende de uma série de fatores, tais como: espécie de escorpião, condições do tétson e do ferrão no momento do acidente, número de

ferroadas, quantidade de veneno injetado, idade, peso e saúde da vítima, presença de doenças concomitantes como cardiopatias, diabetes e hipertensão (Dehesa-Dávila e Possani, 1994).

Os acidentes envolvendo escorpiões sempre devem ser considerados como um agravo que necessita de atendimento imediato, pois o início das manifestações clínicas é precoce. A grande maioria dos acidentes é classificada como leve, entretanto, crianças (principalmente com idade inferior a sete anos) apresentam maiores riscos de complicações sistêmicas e óbitos (Barbosa, 2011).

O principal efeito das toxinas escorpiônicas sobre os canais iônicos é a liberação excessiva de neurotransmissores, principalmente acetilcolina e noradrenalina por neurônios na membrana pós-sináptica e, adrenalina, diretamente na circulação sanguínea, pela glândula adrenal (Ismail, 1995; Cupo et al., 2003; Sakate, 2008). De acordo com Ismail (1995) a manifestação clínica do envenenamento escorpiônico está diretamente relacionada com a liberação maciça desses neurotransmissores importantes.

As manifestações clínicas decorrentes do acidente com *T. serrulatus* podem ser classificadas didaticamente em locais e sistêmicas, que vão definir o acidente como leve, moderado e grave (Horta et al., 2007).

O quadro clínico local é composto por efeitos que podem surgir na região da picada ou à distância. Caracteriza-se por dor de intensidade variável, ardor, queimação e “ferroadas”. Os sinais inflamatórios são pouco evidentes, sendo pouco comum a localização da marca do ferrão (Cupo et al., 2003). A dor é relatada como o sinal clínico mais comum, predominante no escorpionismo humano em praticamente 100% dos casos. É progressiva, dependente da quantidade de veneno inoculado e da sensibilidade individual de cada pessoa, podendo ser discreta (restrita ao local de inoculação do veneno) ou até mesmo insuportável, podendo irradiar-se até a raiz do membro atingido, exacerbando a palpação. O local da picada é difícil de ser detectado algumas vezes, podendo-se encontrar hiperemia e edema discretos, acompanhados ou não de sudorese e piloereção local (Cupo e Hering, 2002; Soares et al., 2002; Campolina, 2006). Na maioria dos casos a hiperemia se manifesta por um halo róseo em torno da picada (Hering et al., 1992).

Nos envenenamentos graves, a dor pode ser mascarada pelos sinais sistêmicos, mas assim que as condições gerais do paciente melhoram esta pode surgir (Cupo et al., 2003). Algumas vezes, porém, apesar do paciente sentir a picada não há dor. Isso pode ser explicado pelo fato de que não tenha ocorrido inoculação do veneno ou

o escorpião não o possuísse naquele momento, por deficiência do mesmo ou por tê-lo consumido antes em alguma presa (Campolina e Dias, 2005).

Ribeiro et al. (2011) relataram em cães após inoculação experimental do veneno de *T. serrulatus* manifestação de dor imediata, no local de aplicação do veneno. Os animais andavam e corriam sem apoiar o membro inoculado, não conseguiam sentar e quando deitavam mantinham o membro flexionado. Além disso, apresentaram desconforto, demonstrado pela lambertura do local da inoculação por diversas vezes, vocalização e inquietação. Ocorreu hipersensibilidade local quando realizada palpação, além de hipertermia. Pinto et al. (2010) também observaram em ratos inoculados com *T. serrulatus*, desconforto, representado por dispnéia, padrão respiratório abdominal e intensificação da contração da musculatura respiratória durante a expiração.

Os sinais sistêmicos incluem agitação, tremores generalizados que, com o agravamento do quadro, podem ser substituídos por profundo torpor ou coma (Hering et al., 1992), sudorese acompanhada ou não de alterações da temperatura corporal (hipotermia), além de sialorreia, rinorreia e lacrimejamento, que aparecem precocemente junto com a dor (Cupo e Hering, 2002; Cupo et al., 2003). Em casos mais graves, podem ser observados tosse e espirros, resultante da hipersecreção traqueal e faríngea (Hering et al., 1992). Ribeiro et al. (2011) observaram em cães que receberam veneno de *T. serrulatus* espirros frequentes, sialorreia e rinorreia, enquanto Pinto et al. (2010) relataram em ratos presença de secreção ocular amarelada, espirros, protusão dos olhos (búftalmia), secreção oro-nasal e edema das pálpebras.

Na verdade, o envenenamento leva a um conjunto de sinais clínicos devido a alterações nos sistemas nervoso, cardiovascular e respiratório, o que pode causar insuficiência cardíaca e edema pulmonar (Cupo e Hering, 2002). Entre os efeitos cardiovasculares, cita-se o aumento da pressão arterial pela liberação de catecolaminas das adrenais e terminações pós-ganglionares. Posteriormente pode ocorrer hipotensão arterial em função de efeitos cardíacos e perdas hídricas resultantes de hipovolemia secundária a vômitos, sudorese e aumento da permeabilidade vascular. Relatam-se ainda, arritmias cardíacas como taquiarritmias extra-sístoles, bradiarritmias e bloqueios átrio-ventriculares. O veneno possui efeito cardiotoxico direto, alterando a contratilidade do miocárdio e o fluxo coronariano (Cardoso et al., 2003).

No trato gastrointestinal observa-se aumento de secreções e motilidade, o que resulta em dor abdominal. Além disso, ocorre contração dos canalículos esplênicos, o que também contribui para as dores abdominais (Cardoso et al., 2003). Em humanos, perdas hídricas por sialorreia, vômitos e diarreias podem levar a desidratação e desequilíbrio hidroeletrólítico, com expressiva diminuição do potássio (Freire-Maia et al., 1994). Embora Ribeiro et al. (2011) também tenham relatado a presença de vômitos nos cães envenenados, não foi detectada a diminuição deste íon. Outro efeito gastrointestinal importante é a pancreatite aguda, causada por ação adrenérgica e colinérgica, o que culmina com o aumento da função exócrina do órgão com consequente elevação dos níveis séricos de amilase, ampliando a dor abdominal (Sofer et al., 1991; Campolina, 2006).

Ribeiro et al. (2011) também relataram em cães após inoculação do veneno de *T. serrulatus*, dor durante a palpação abdominal, que pode ser explicada pelo aumento da motilidade intestinal (efeito parassimpático). E, como já descrito anteriormente, a presença dos vômitos, é indicativo de hipersecreção gástrica decorrente da liberação de acetilcolina por ação do próprio veneno.

A pancreatite pode cursar com hiperglicemia, situação comum em envenenamentos em humanos. Cupo e Hering (2002) detectaram níveis plasmáticos de glicose até três vezes acima do limite superior de normalidade em vítimas de acidentes escorpiônicos, enquanto Bucarety et al. (1995) verificaram um aumento na ordem de cinco vezes.

O veneno escorpiônico age diretamente também no tecido nervoso e em células cardíacas, além de promover aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-pulmonar, facilitando a instalação do edema pulmonar de origem não cardiogênica (Amaral e Rezende, 1997). Em casos graves, quando o sistema nervoso é acometido, podem ocorrer tremores musculares, espasmos, fasciculações, convulsões, letargia ou agitação, mioclonia, hemiplegia, opistótonos, inconsciência, além de coma. Alguns autores citam que a vasoconstrição provoca congestão, hipóxia e infartos, todos decorrentes da liberação de catecolaminas (Cupo et al., 2003).

Os óbitos, quando ocorrem, são de rápida evolução. De forma geral, são em consequência de convulsões, lesões cardíacas, insuficiência cardiorespiratória, coma, acidente vascular cerebral por hipóxia (casos raros), edemas pulmonares agudos, hipotensão e choque (Campolina, 2006).

2.4) Classificação Clínica dos Acidentes Escorpionicos

A instalação da sintomatologia clínica é rápida, o que torna essencial o diagnóstico precoce, uma vez que quanto menor o tempo decorrido entre a picada e o estabelecimento do tratamento, melhor será o prognóstico (Marcussi et al., 2011).

O escorpionismo humano pode ser classificado em graus crescentes de gravidade, levando em consideração os principais sinais clínicos apresentados pelos pacientes: casos leves, casos moderados e casos graves, o que vai influenciar diretamente o tratamento e o prognóstico de cada caso (Ministério da Saúde, 2001) (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação, manifestações clínicas e tratamento dos acidentes escorpionicos.

Classificação	Sinais Clínicos	Tratamento Específico	Tratamento Geral
Leve	Sinais exclusivamente locais, dor em 100% dos casos.	-	Combate a dor e observação do paciente por 6-12 horas.
Moderado	Sinais locais e alguns sistêmicos, tais como: sonolência, agitação, náuseas, sudorese, poucos vômitos, aumento da pressão arterial, taquicardia e taquipnéia.	Soroterapia anti-escorpionica (2 a 4 ampolas de soro)	Combate a dor, tratamento sintomático, observação do paciente durante 12-24 horas.
Grave	Sinais locais e sistêmicos. Vômitos profusos, frequentes, náuseas, lacrimejamento, sialorréia, sudorese, agitação, hipertensão, taquicardia, taquipnéia, tremores, espasmos musculares, paralisias, convulsões. O quadro clínico pode evoluir para bradicardia, bradpnéia, edema pulmonar agudo, colapso cardiorespiratório, coma e morte.	Soroterapia anti-escorpionica (4 a 8 ampolas de soro)	Combate a dor, internação hospitalar com cuidados intensivos, tratamento sintomático e monitorização e manutenção das funções vitais.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2001).

2.5) Alterações Sanguíneas

Algumas alterações sanguíneas podem ser detectadas nos acidentes com escorpiões em humanos, como por exemplo, leucocitose com neutrofilia (Cupo e Hering, 2002), também identificada em cães (Ribeiro et al., 2009) e ratos (Pinto et al., 2010). O mecanismo mais provável que justifica essa alteração é o estresse causado pela dor, que potencializa a descarga de adrenalina e provoca desprendimento de leucócitos do *pool* marginal dos vasos sanguíneos (Jain, 1993; Thrall, 2007).

Ribeiro et al. (2009) detectaram em alguns cães envenenados com *T. serrulatus* aumento do eritrograma (hemácias, hematócrito e hemoglobina), causado provavelmente pela contração esplênica em função da dor e por ação de catecolaminas sobre o baço. Além disso, é sabido que o veneno escorpionico não causa anemia, hemólise, lesões vasculares ou interferências na medula óssea. Andrade et al. (2004) também observaram aumento

significativo do hematócrito de ratos 60 minutos após a inoculação do veneno da mesma espécie de escorpião.

Outra espécie escorpionica (*Androctonus amoreuxi*) produziu em coelhos aumento considerável na contagem total de leucócitos uma hora após aplicação do veneno. Houve aumento sérico de neutrófilos, mas linfócitos e monócitos não se alteraram (Ismail e Abd-Elsalam, 1988).

A hiperglicemia é considerada como um dos efeitos mais importantes do veneno, incluindo efeitos diretos dos neurotransmissores sobre o fígado, pâncreas e tecido adiposo, uma vez que as catecolaminas induzem glicogenólise hepática (Murthy e Haghazari, 1999). Além disso, o estresse eleva os níveis de glicocorticóides, sendo o cortisol um dos mais importantes dentre os produzidos naturalmente pelo organismo. Seu mecanismo de ação se relaciona com o aumento da glicemia por meio da gliconeogênese (Cunningham, 2004).

Ismail e Abd-El Salam (1988) também verificaram em coelhos o aumento da glicose sérica cinco minutos após aplicação do veneno do escorpião *Androctonus amoreuxi*, atingindo pico cinco horas após injeção.

São relatados ainda, como efeitos do veneno, a hipocalemia, além da diminuição de sódio e cálcio, provavelmente pelo excesso de perda de fluidos corporais pela salivação intensa e lacrimejamento (Andrade et al., 2004).

Também já foi descrito o aumento sérico da amilase, indicando alteração da função pancreática. É sabido que a amilase é uma enzima que possui meia vida longa, com valores de referência com amplo intervalo. Nos casos de pancreatite, as concentrações se mostram elevadas, como em decorrência da inflamação por acidentes escorpiônicos em humanos (Cupo et al., 2003; Marcussi et al., 2011). Em 2003, D'Suze e colaboradores identificaram correlação positiva entre a liberação de interleucina 6 (IL-6), liberada nos casos de pancreatite e aumento dos níveis de amilase em pacientes picados por escorpião *Tityus discrepans*.

Alguns autores demonstraram o aumento da amilase em ratos que receberam veneno de *Tityus serrulatus* (Novaes et al., 1982; Correa et al., 1997; Novaes et al., 2002; Cusinato et al., 2010; Pinto et al., 2010) diferente de Ribeiro e colaboradores (2010) que não detectaram essa mesma alteração em cães.

As lesões de miocárdio são identificadas laboratorialmente por meio de dosagens de enzimas de origem muscular, tais como aspartato-aminotransferase (AST), lactato-desidrogenase (LDH) e creatina-quinase (CK) e principalmente sua isoenzima MB (CK-MB), liberada especificamente pelo músculo cardíaco lesado (Cupo et al., 2003). Pinto et al. (2010), estudando as principais alterações decorrentes do envenenamento do *Tityus fasciolatus* em ratos, detectaram alterações das enzimas CK, CK-MB e LDH, confirmando a lesão no miocárdio. Todavia, Ribeiro et al. (2010) estudando o envenenamento por *T. serrulatus* em cães adultos não observaram aumento dos níveis de CK e LDH, apenas aumento significativo das enzimas AST e ALT, sugestivo de lesão hepática.

Correa et al. (1997) relataram aumento máximo de CK uma hora após aplicação do veneno escorpiônico na veia caudal de ratos, em decorrência de danos no miocárdio, posteriormente comprovados na histopatologia. Cusinato et al. (2010) também observaram aumento da enzima CK em ratos, seis horas após aplicação de veneno de *T. serrulatus*.

Em cães que receberam veneno de *T. serrulatus*, até 72 horas após sua inoculação, não houve relato do aumento de creatinina e uréia séricas, indicando que o veneno não foi capaz de

alterar a função renal desses animais (Ribeiro et al., 2010). Entretanto, o veneno desta espécie escorpiônica foi capaz de provocar insuficiência renal aguda em ratos, demonstrado pelo aumento dos valores destes parâmetros analisados (Pinto et al., 2010).

Correa et al. (1997) traçaram o perfil bioquímico após envenenamento por *Tityus serrulatus* em ratos. A glicose sanguínea e glicogênio hepático também foram determinados. Ocorreu aumento sérico de AST, CK, amilase e LDH, provavelmente decorrente de lesões musculares, principalmente na musculatura cardíaca. Ocorreram hiperglicemia e diminuição do glicogênio hepático, possivelmente pela liberação de catecolaminas no sangue pela ação do próprio veneno. Entretanto, não houve diferença de gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e ALT.

Com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos do veneno de *T. serrulatus* no sistema renal, Alves et al. (2005) avaliaram o fluxo urinário em ratos, a taxa de filtração glomerular e o transporte de sódio, cloro e potássio pelos túbulos renais. Foram verificadas diminuição do fluxo urinário e da taxa de filtração glomerular, provavelmente pela ação vasoconstritora do veneno (liberação de noradrenalina), o que poderia gerar aumento de creatinina e uréia sérica.

No estudo de Cusinato et al. (2010), ratos receberam doses diferentes de veneno de *T. serrulatus* (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg e 0,67 mg/kg) e foram acompanhados durante 24 horas. A hiperglicemia foi observada em todos os tempos avaliados (30 minutos, 2, 6 e 24 horas) e teve um pico duas horas após a aplicação do veneno, sendo considerada dose-dependente. Os valores de amilase aumentaram aos 30 minutos e de CK às seis horas.

O proteinograma também é uma ferramenta que pode ser utilizada no diagnóstico laboratorial do envenenamento. Existe um grupo de proteínas séricas denominadas proteínas de fase aguda, que auxiliam na avaliação de infecção, trauma e inflamações nos animais domésticos, uma vez que nestas condições há aumento de sua síntese e liberação pelo fígado, em resposta principalmente da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (Eckersall, 2008).

O perfil eletroforético pode sugerir a ocorrência de processos inflamatórios agudos e crônicos, disfunções hepáticas, perdas proteicas, síndromes nefróticas e alterações das globulinas que ajudam o entendimento da resposta imunológica. Através da eletroforese ocorre separação das proteínas que podem ser

identificadas e quantificadas em duas frações principais, albumina e globulinas, sendo esta última subdividida em três sub-frações, denominadas α , β e γ -globulinas (Naoum, 1990).

A albumina possui a migração mais rápida, sendo que algumas espécies possuem a pré-albumina. É considerada a principal proteína do soro (35-50%) e sua função é regular a pressão osmótica e transportar algumas substâncias, tais como ácidos graxos, colesterol, ácidos biliares, bilirrubina, cálcio, hormônios e medicamentos.

Seguidamente migram a α , β e γ -globulinas respectivamente (Thrall, 2007; Eckersall, 2008; Silva et al., 2008).

O grupo das α -globulinas é composto por α -1-glicoproteína ácida, α -1-antiquimotripsina, α -2-macroglobulina, α -1-antitripsina, ceruloplasmina, amilóide-A e haptoglobina. Em ruminantes (bovinos e ovinos), a haptoglobina- α é um dos melhores indicativos de inflamação, possuindo ação bacteriostática por se ligar à hemoglobina e indisponibilizar o ferro para o crescimento bacteriano, constituindo-se dessa forma, numa importante proteína de fase aguda positiva, podendo aumentar sua concentração em até 100 vezes nestas espécies.

No grupo das β -globulinas estão, a transferrina, ferritina, proteínas do complemento (C3 e C4), proteína C reativa, hemopexina- β 1-globulina e fibrinogênio, esse último considerado indicativo de resposta inflamatória importante em ruminantes (González et al., 2007; Thrall, 2007; Eckersall, 2008).

A γ -globulina é uma fração composta por imunoglobulinas, IgA, IgG, IgM, IgE e IgD, porém algumas delas (IgM e IgA) podem se estender para a região de β -globulinas, especialmente quando na resposta imunológica há predomínio de IgM (Jackson, 2007). Essas proteínas são sintetizadas nos tecidos linfóides em resposta a um estímulo antigênico (Thrall, 2007).

Muitos estudos apontam que os efeitos do veneno escorpionico estão intimamente relacionados com a liberação de mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda. Meki e El-Dean (1998) avaliaram concentrações séricas da interleucina-1 (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e α -1-antitripsina em crianças vítimas de acidentes com escorpião e puderam concluir que os níveis destas citocinas pró-inflamatórias e da proteína de fase aguda estão diretamente relacionadas com a severidade do envenenamento, ou seja, vítimas fatais foram as que apresentaram os mais altos valores dessas substâncias, em decorrência da liberação de catecolaminas pela ação do veneno. Além disso, os pacientes mais graves clinicamente foram os que apresentaram

leucocitose mais acentuada. A participação da IL-1 também foi constatada por Pessini et al. (2006) na indução de febre em ratos inoculados com veneno de *Tityus serrulatus*.

Não foram detectadas alterações na concentração plasmática de albumina e globulinas no proteinograma de cães após aplicação de veneno de *Tityus serrulatus*, na dose de 250 μ g/kg, ou seja, o veneno não foi capaz de induzir a síntese de proteínas de fase aguda (Ribeiro e Melo, 2012). Em ratos já se demonstrou o efeito do veneno bruto desta espécie de escorpião e sua toxina sobre as vias, clássica e alternativa, do sistema complemento ocorrendo aumento de interleucinas e produção hepática de proteínas de fase aguda (Bertazzi et al., 2003).

Para uma boa interpretação do proteinograma, valores de cada fração protéica gerada na eletroforese, relação albumina/globulinas e a determinação da proteína total devem ser avaliados. A proporção albumina em relação à globulina (A/G) constitui-se geralmente na primeira indicação de uma anormalidade protéica, sendo que em ovinos a concentração de albumina fica ligeiramente maior que a de globulinas (A/G>1) (Thrall, 2007). Esta relação permanecerá dentro de valores normais em casos de desidratação (aumento na concentração de ambas as frações) ou hemorragias e hiperhidratação, em que se vê hipoalbuminemia e hipoglobulinemia (Thrall, 2007; Eckersall, 2008).

A diminuição de A/G é detectada quando ocorre redução da albumina e/ou aumento das globulinas. A hipoalbuminemia pode advir de menor produção (insuficiência hepática, má nutrição, parasitismo gastrointestinal, má absorção intestinal) ou maior perda (doenças glomerulares principalmente) e a hiperglobulinemia se relaciona com inflamação aguda (síntese de proteínas de fase aguda) e estimulação antigênica (Thrall, 2007; Jackson, 2007; Eckersall, 2008).

O aumento de A/G ocorre principalmente na diminuição das globulinas (γ -globulina), em situações de falha de transferência passiva, uma vez que hiperalbuminemia com concentração de globulina normal é difícil de ocorrer (Jackson, 2007; Eckersall, 2008).

2.6) Exames Complementares

Os exames complementares que podem auxiliar o clínico no diagnóstico do envenenamento escorpionico são: eletrocardiograma, ecocardiograma e radiografia torácica (Marcussi et al., 2011).

O eletrocardiograma é de grande utilidade no acompanhamento dos pacientes,

podendo evidenciar alterações características como taquicardia sinusal, bradiarritmias (bradicardias, bloqueios variados), extra-sístoles, padrão infarto-símile (presença de ondas Q, supra e infradesnívelamento de ST) (Marcussi et al., 2011). Essas alterações podem desaparecer em média após três dias, na grande maioria dos casos, mas podem perdurar por mais dias nos casos de acidentes graves (Gueron et al., 1992).

Cada vez mais, são descritas alterações de ecocardiograma, auxiliando o diagnóstico e o tratamento das cardiopatias da “Síndrome do Envenenamento Escorpiônico”, como: disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, dependente de hipó ou acinesia difusa ou regional do ventrículo esquerdo, com diminuição das frações de ejeção e de encurtamento de fibras (com espessura normal da parede); hipocinesia do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo; discinesia septal; regurgitação mitral e diminuição da velocidade das ondas E e A do fluxo mitral. Esses achados refletem, basicamente, distúrbios do músculo cardíaco, principalmente em decorrência do aumento da demanda de oxigênio e da expressiva liberação de catecolaminas na circulação (Ismail, 1995; Dávila et al., 2002).

A radiografia de tórax pode evidenciar o aumento da área cardíaca e também o edema pulmonar agudo. Além disso, também se faz importante no acompanhamento de processos infecciosos em pacientes classificados como graves, já que nestes indivíduos é comum o desenvolvimento de infecções pulmonares (Cupo et al., 2003).

Podem-se empregar técnicas de imunodiagnóstico para detecção do veneno circulante nos pacientes, tais como o método de ELISA. Esse teste pode ser utilizado para monitoração da concentração de veneno no soro de pacientes com envenenamento sistêmico e tem algumas vantagens como ser de fácil execução, baixo custo e não envolver material radioativo (Chávez-Olortegui et al., 1994).

Essa técnica tem sido utilizada para detectar veneno no sangue, urina e outros fluidos corporais de pacientes que receberam a picada recentemente. Permite a caracterização do gênero do animal envolvido no acidente, a quantificação e a determinação da cinética do veneno circulante, o que possibilita a sua correlação com a gravidade do envenenamento. O exame de ELISA possibilita racionalizar a terapêutica com antivenenos específicos, através da avaliação da eficácia das doses necessárias aplicadas para neutralizar o veneno (FUNASA, 2001).

2.7) Tratamento

O tratamento dos acidentes escorpiônicos possui como finalidade a manutenção da vida do paciente, neutralização do veneno e proteção contra as complicações que podem ocorrer desencadeadas pela inoculação do veneno, além de aliviar o sofrimento da vítima. Dessa forma, quando se pensa em tratamento para acidentes com *Tityus serrulatus*, alguns pontos fundamentais devem ser bem estabelecidos: (1) suporte à vida aos pacientes graves; (2) administração do soro específico o mais rápido possível, antes que o veneno atue em seus sítios de ação e desenvolva o quadro de envenenamento; (3) combate aos sinais clínicos e (4) alívio do paciente (Campolina, 2006).

Todo paciente picado por escorpião deve permanecer em observação por pelo menos quatro a seis horas nos casos classificados como leve e 24 horas nos casos moderados. A dor local pode ser combatida com anestésicos sem vasoconstritor, ou analgésicos orais ou parenterais. Caso o paciente esteja apresentando vômitos profusos deve-se estabelecer o uso de antieméticos e realização da correção hidroeletrólítica. Pacientes com envenenamento grave devem receber por via intravenosa soro antiescorpiônico, bem como crianças abaixo de sete anos de idade mesmo que receba a classificação de caso moderado (Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004; Campolina, 2006). Na Medicina Veterinária não há disponibilidade de soro antiaracnídio, portanto, os animais domésticos devem receber tratamento sintomático, baseado no controle da dor e das funções vitais (Melo et al., 2004; Sakate, 2008).

2.7.1) Soroterapia

A produção de soro contra animais peçonhentos teve início no final do século XIX, através da observação de Calmette, Phisalix e Bertrand, que detectaram produção de anticorpos neutralizantes dos venenos em animais que receberam toxinas como imunógenos. Desde então, esse método de produção de anticorpos vêm sendo estudado e aplicado em todo país (Espino-Solis, 2005).

Todos os animais vertebrados são capazes de produzir anticorpos no processo de imunização (Gibbs e Harrison, 1976), entretanto, coelhos, galinhas, cobaias (*Cavia porcellus*) e ratos são os mais comumente mencionados na bibliografia. Quando objetiva-se grandes quantidades de soro, pode-se utilizar animais maiores como ovelhas, cabras e cavalos, mas nestes casos, necessita-se de uma maior quantidade de imunógeno para imunização, além

de serem animais mais caros e difíceis de manutenção (Ball et al., 1990).

A produção de soros antipeçonhentos no Brasil consiste na aplicação do veneno em cavalos, que pela facilidade de resposta ao estímulo e seu grande porte, favorece a produção de grande volume de sangue rico em anticorpos (Fan e França, 1992).

O cavalo permaneceu no último século como animal de escolha para a produção de antivenenos, devido à facilidade de manuseio e contenção durante a sangria e plasmaferese. Além disso, os métodos de purificação das antitoxinas obtidas a partir do sangue de equinos, são mais conhecidos e estudados em relação a outros animais (Sjostrom et al., 1994).

Existem grandes vantagens em se utilizar os equinos na produção de antivenenos, como fácil adaptação a vários climas, coleta de grandes volumes de sangue (acima de 10 litros) e utilização de um ou mais venenos de uma só vez na imunização. Apesar das desvantagens, existem importantes razões para considerar sua substituição na produção dos soros, tais como: são animais caros para aquisição e manutenção, não são amplamente disponíveis e tem poderosa resposta imune mediada por células que pode resultar na formação de grandes abscessos no local da aplicação (Sjostrom et al., 1994).

Existem pacientes que são sensíveis ao soro equino e, nestes casos são instituídas terapias menos eficientes (Russel et al., 1970). A administração de imunoglobulinas do soro equino pode ocasionar reações de hipersensibilidade. Dessa forma, os cavalos têm sido substituídos cada vez mais por ovelhas na produção de antivenenos, com intuito de se obter um soro mais eficaz, seguro e barato, além da possibilidade de sua utilização em pacientes sensíveis às proteínas equinas (Smith et al., 1992; Chulasugandha, 2003).

As ovelhas estão amplamente distribuídas na maioria dos países e são relativamente baratas tanto para sua compra quanto para sua manutenção. Também não existem fatores emotivos contra seu uso para a produção de anti-venenos (Sjostrom et al., 1994; Landon e Smith, 2003). Segundo os mesmos autores, estes animais são fáceis de manusear, podendo-se imunizá-los em múltiplos locais e a sangria pode ser feita pela veia jugular externa.

A substituição de cavalos por ovelhas para a produção de antivenenos tem duas grandes vantagens: primeira, um pequeno número de animais (frequentemente menos que 5%), que falham em desenvolver altos títulos de anticorpos, pode ser facilmente substituído; segunda e mais importante, cada ovelha no rebanho é imunizada somente com um veneno e, portanto, produzem produto específico. Um soro

oriundo de um único veneno é significativamente mais protetor do que aquele advindo de venenos diferentes aplicados em associação (Sjostrom et al., 1994).

Dart et al. (1994) testaram antivenenos, obtidos de ovelhas, em pacientes humanos verificando que não havia desenvolvimento de reações alérgicas imediatas ou tardias e que estes se mostraram eficientes na soroneutralização.

Sjostrom et al. (1994) produziram antivenenos em ovelhas e compararam então com o antiveneno equino comercial. As ovelhas apresentaram boa tolerância aos adjuvantes de Freund e outros adjuvantes, sem apresentarem lesões locais importantes. Altos títulos de anticorpos de alta afinidade eram rapidamente desenvolvidos, mas anticorpos que podem causar hipersensibilidade, observada nos equinos, não foram detectados.

Para obtenção de soro hiperimune, os animais são inoculados com diversas doses de veneno que normalmente possuem atividade tóxica elevada. Assim, apesar da administração do veneno bruto fornecer títulos de anticorpos elevados, é frequentemente mal tolerado pelos animais podendo causar a morte dos mesmos (Guidolin et al., 1989). Para diminuir este problema, toxóides têm sido preparados por detoxificação biológica do veneno com preservação de sua imunogenicidade (Chippaux e Goyffon, 1998).

O imunógeno pode ser injetado no animal de várias formas: intravenosa, intramuscular (normalmente no músculo da coxa), intradérmica ou subcutânea (no tecido conectivo da pele do dorso) ou diretamente num nódulo linfático. É sabido que são produzidos mais anticorpos para determinado imunógeno quando este é dividido e aplicado em pequenas quantidades durante um determinado período de tempo do que quando todo administrado numa só injeção (Gibbs e Harrison, 1976). Por outro lado, a quantidade que deve ser aplicada deve ser a menor possível, com objetivo de minimizar reações indesejadas (Ball, 1974; Torrance, 1992).

No caso de aplicação pela via subcutânea, o imunógeno deve ser preparado numa mistura com adjuvantes que aumentem sua imunogenicidade. O mais usado atualmente é o adjuvante de Freund, que pode se apresentar de duas diferentes formas: incompleto, que consiste numa parafina mineral (85%) e num agente emulsificante (15% de oleato de manitol) e o completo, que contém ainda 0,05% de *Mycobacterium butyricum* morta e liofilizada. O objetivo do adjuvante é atuar como reservatório de antígeno no tecido, permitindo uma liberação lenta e gradual, estimulando a produção de mais anticorpos do que se a mesma quantidade de imunógeno fosse aplicada numa solução aquosa

(Ball et al., 1990). Na verdade, o adjuvante forma uma capa protetora envolvendo o antígeno, protegendo-o do rápido catabolismo, além de estimular uma resposta imune não específica pelo aumento na liberação de linfocinas (Harlow e Lane, 1988).

O adjuvante de Freund proporciona a produção de um antiveneno mais concentrado, uma vez que provoca uma reação inflamatória local que influencia positivamente a formação de anticorpos (Bercks et al., 1972). A forma completa faz com que a concentração de anticorpos no animal decresça mais lentamente, ou seja, é mais eficaz na indução da resposta imunológica (Gibbs e Harrison, 1976). Quando se segue um processo de imunização, normalmente na primeira aplicação utiliza-se adjuvante completo de Freund e nas seguintes é administrada sua forma incompleta, com objetivo de diminuir a possibilidade de desenvolvimento de abscessos no local das injeções (Ball et al., 1990).

Devido justamente a algumas reações adversas causadas pelos adjuvantes, tais como granulomas, desconforto e dor, têm sido realizados esforços no sentido de identificar novos adjuvantes eficientes para a produção de antivenenos (Resende et al., 2004; Stills Jr., 2005). Os efeitos clínicos decorrentes da inoculação subcutânea do adjuvante completo de Freund no dígito de humanos foram avaliados e observou-se eritema, grande desconforto, sensação de pressão e edema, além de sensação dolorosa quando exercida alguma força no local de aplicação por meses (Harry, 2000).

2.7.1.1) Histórico

Os primeiros estudos a respeito do envenenamento escorpionico no Brasil foram realizados no Instituto Butantan, por Vital-Brazil. Em 1905, fez os primeiros testes para produção de soro em decorrência da gravidade de acidentes gerados pela picada dos escorpiões do gênero *Tityus*. Entretanto, a falta de exemplares para obtenção de veneno suficiente para imunização dos animais fez com que ele interrompesse seu projeto (Lucas, 2003).

No ano de 1915, Heitor Maurano, médico e aluno de Vital Brazil, produziu soro a partir do veneno do escorpião *Buthus quinquestratus* (escorpião do Egito), que não foi eficiente contra o gênero *Tityus*, demonstrando a importância de soro específico no tratamento de acidentes escorpionicos (Lucas, 2003).

Posteriormente, em 1918, produziu-se pela primeira vez em ampla escala, soro anti-escorpionico usando cavalos produtores de anticorpos, com veneno do escorpião *Tityus*

bahiensis, o mais encontrado na época em São Paulo.

Como o escorpião *Tityus serrulatus* só foi descrito em 1922 por Mello Campos e Dr. Lutz, os soros produzidos em Belo Horizonte até então eram contra o *T. bahiensis*. Mas como o principal causador de acidentes nesta cidade era o escorpião amarelo (*T. serrulatus*), os soros passaram a ser feitos contra esta espécie.

Hoje em dia, soros anti-escorpionicos são produzidos rotineiramente por diversas instituições do mundo. Sendo que diferentes espécies de animais são usadas para a produção, tais como carneiros, cabras, camelos e cavalos, estes últimos os mais comuns (Theakston et al., 2003). No Brasil, o Instituto Butantan (São Paulo) e a Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte) são os principais fornecedores de soro anti-escorpionico. O soro é produzido através da imunização de cavalos com veneno bruto obtido por estimulação elétrica da glândula do escorpião (Barrio e Vital-Brazil, 1949).

O soro utilizado na terapia em humanos é obtido pela imunização de cavalos com o veneno escorpionico total. A eficácia do tratamento se relaciona diretamente com a rapidez da administração, afinal as toxinas de baixo peso molecular se difundem rapidamente pelo organismo, o que dificulta sua captura pelos anticorpos específicos. A qualidade do soro é importante, pois o mesmo neutraliza apenas ou predominantemente as neurotoxinas no compartimento vascular, sendo que tratamentos tardios ou com doses insuficientes são pouco eficazes e podem levar o indivíduo à morte (Kalapothakis e Chavez-Olortegui, 1997).

2.7.1.2) Imunógenos Alternativos

Quando se pensa na soroterapia para tratamento de picadas de escorpiões existem alguns aspectos importantes a serem considerados, tais como dificuldade na obtenção do veneno que é matéria prima para a produção do soro, custo elevado na produção do soro, principalmente na manutenção dos animais produtores e utilização de componentes do veneno que não estão ligados ao processo neutralizante, pois o que é utilizado é o veneno total e não suas frações tóxicas (Mendes, 2007).

Além disso, como o veneno escorpionico é uma mistura complexa de vários compostos, muitos deles não significantes para o efeito tóxico do veneno, geram um efeito de diluição dos anticorpos realmente importantes para a neutralização, já que também incitariam a produção de anticorpos contra eles no animal produtor (Maria et al., 2005). Muitas vezes, os componentes mais tóxicos dos venenos representam apenas uma pequena parte de sua

composição total, o que compromete a geração de anticorpos contra eles (Martin-Eauclaire et al., 2006).

Nesse sentido, pesquisadores de vários países estudam a possibilidade de se produzir um soro de melhor qualidade, o que pode ser alcançado utilizando-se apenas as frações tóxicas do veneno, após a retirada da toxicidade das proteínas, já que a alta toxicidade destas moléculas dificultaria seu uso (Mendes, 2007).

Após o uso da radiação gama, venenos foram utilizados na imunização de animais para produção de soro anti-crotálico (Ferreira Júnior et al., 2005) e anti-escorpiônico (Boussag-Abib e Laraba-Djerabi, 2011) e se mostraram eficientes na produção de anticorpos específicos. Assim, este processo foi capaz de tornar o imunógeno menos tóxico para os animais, mas preservou sua imunogenicidade.

Vários métodos hoje podem ser empregados na detoxificação dos venenos, tais como polimerização com glutaraldeído (Guidolin et al., 1989), método em que as moléculas detoxificadas são capazes de induzir a produção de anticorpos que neutralizam os efeitos tóxicos dos venenos escorpiônicos.

O glutaraldeído é uma molécula bidentada com dois grupamentos aldeído em suas extremidades. Este tipo de grupamento, presente tanto na forma monomérica quanto na forma polimérica do glutaraldeído, pode se ligar a aminas primárias presentes em diferentes biomoléculas, como proteínas dos mais diversos tipos.

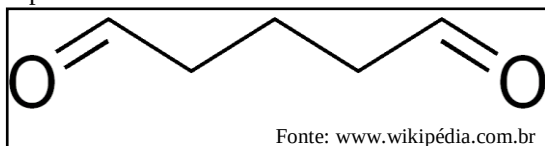


Figura 3: Molécula de glutaraldeído

O acoplamento de proteínas via glutaraldeído se baseia na propriedade desta molécula de formar ligações cruzadas através da formação de uma base de Schiff entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais de dois resíduos de lisina presentes em duas espécies diferentes de natureza protéica ou entre os grupamentos amino terminal das cadeias polipeptídicas (Campbell et al., 1951, citado em Avrameas e Ternynck, 1969).

Guidolin et al. (1989) verificaram o nível de resposta imunitária em cavalos hiperimunizados em que os venenos crotálico e botrópico tiveram a sua atividade tóxica reduzida pela ação de glutaraldeído. As reações locais e sistêmicas observadas nos cavalos que receberam veneno total foram consistentemente reduzidas ou ausentes nos animais em que se utilizou veneno detoxificado. O título de anticorpos em ambos os grupos foi praticamente o mesmo

(veneno total e veneno detoxificado), ou seja, o glutaraldeído reduziu a atividade tóxica dos venenos sem alterar sua imunogenicidade.

Segundo Machado de Ávila et al. (2004), a conjugação do veneno com glutaraldeído interligaria os componentes protéicos do veneno, principais responsáveis pelos efeitos tóxicos e letais observados. A formação desta “rede” molecular impediria as toxinas de se ligarem aos seus alvos moleculares para exercício de sua toxicidade, tornando o veneno inócuo.

O glutaraldeído além de ser empregado nos processos de detoxificação de venenos, na medicina humana é excelente opção no tratamento de membranas biológicas, tais como pericárdio bovino para confecção de válvulas cardíacas para implante. É facilmente encontrado, econômico, age rapidamente, melhora a estabilidade dos materiais biológicos, tornando-os mais resistentes e muitas vezes de menor antigenicidade quando utilizado em concentrações a 4% (Oliveira et al., 2009).

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo Geral

Avaliar os efeitos tóxicos do veneno bruto de *Tityus serrulatus* e detoxificado com glutaraldeído em ovinos submetidos a um ciclo de imunização na produção de antiveneno escorpiônico.

3.2) Objetivos Específicos

- Caracterização protéica e bioquímica do veneno de *T. serrulatus*;
- Realização da DL_{50} do veneno de *T. serrulatus* e teste de toxicidade do glutaraldeído;
- Avaliação dos ovinos após a imunização com veneno de *T. serrulatus* bruto e detoxificado com glutaraldeído, por meio de:
 - Exame físico completo;
 - Exame eletrocardiográfico;
 - Perfil hematológico;
 - Perfil bioquímico sanguíneo dosando AST, ALT, GGT, CK, amilase pancreática, glicose, creatinina, uréia, proteínas totais e fracionadas (albumina, α , β e γ -globulinas);
 - Exame necroscópico;
 - Avaliação histopatológica dos fragmentos de coração, pulmões, fígado, rins, cérebro, baço, rúmen, retículo, omaso e abomaso;

- Reatividade de anticorpos de ovinos imunizados com veneno de *T. serrulatus* bruto e detoxificado com glutaraldeído, por meio do ELISA;
- Avaliação da reatividade *in vitro* dos anticorpos produzidos pelos ovinos utilizando a técnica de *Western Blotting*;
- Avaliação do potencial de neutralização *in vivo* (utilizando camundongos) dos anticorpos produzidos pelos ovinos.

4) MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA), sob protocolo número 202/2012.

4.1) Animais e local

Antes do início do experimento os animais permaneceram nas instalações do Hospital Veterinário por um período de 60 dias, com objetivo de diminuir o estresse e possíveis interferências no estudo.

Este foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na imunização dos ovinos para produção de soro contra o veneno de *T. serrulatus*, enquanto a segunda fase se destinou na avaliação da eficácia dos soros produzidos (antiveneno total e antiveneno detoxificado com glutaraldeído) em animais desafiados com o veneno em questão.

Foram utilizados 12 ovinos sem raça definida, com sete meses de idade, peso médio de 30 kg, clinicamente saudáveis, vacinados contra clostridioses e vermifugados, oriundos de uma propriedade rural localizada no Município de Baldim – MG.

Os animais ficaram alojados em baias coletivas na Escola de Veterinária da UFMG, onde receberam dieta à base de ração granulada comercial (300 gramas/animal/dia), sal mineral para ovinos em fase de crescimento, feno e água *ad libitum*.

Formaram-se, por sorteio, três grupos com quatro ovinos em cada: grupo 1 (PBS), grupo 2 (veneno total de *T. serrulatus*) e grupo 3 (veneno total de *T. serrulatus* detoxificado).

Os ovinos ficaram em baias para facilitar sua identificação e manuseio (Figuras 4 e 5).



Figuras 4 e 5: Ovinos em baias coletivas no Galpão de Clínica de Ruminantes (Escola de Veterinária da UFMG, 2012).

4.2) Imunização dos animais

Para preparação dos imunógenos escorpiões *Tityus serrulatus* foram coletados na região de Belo Horizonte e mantidos no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, do ICB, UFMG, de Belo Horizonte. O veneno foi obtido por eletroestimulação do télson, e armazenado a -20°C no escuro até seu uso e gentilmente cedido pelo Professor Dr. Carlos Chávez-Olórtegui.

Após a obtenção de um *pool* de veneno, estimou-se a concentração protéica utilizando o método de Lowry e calculada a dose letal média (DL₅₀).

O imunógeno “veneno detoxificado” foi preparado através do método de ligação cruzada por glutaraldeído em apenas um passo, como previamente descrito (Machado de Ávila et al., 2004).

Para o acoplamento via glutaraldeído, 10 mg do veneno foram diluídos em 1,0 ml de salina tamponada em fosfato estéril (PBS) (NaCl 137mM, 10 mM de fosfato, KCl 2,7 mM e 7,4 pH). Sob agitação constante, 1,0 ml de uma solução de glutaraldeído 1% foi adicionado à solução de veneno, à temperatura ambiente. A reação se processou por mais uma hora nessas condições e então o veneno conjugado foi congelado a -20°C.

No Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, além de determinar a DL₅₀ do veneno bruto em camundongos, testou-se a toxicidade do veneno conjugado com glutaraldeído, com o objetivo de verificar a eficácia da conjugação na detoxificação do veneno. Para avaliar a dose letal média (DL₅₀) do veneno de *T.serrulatus*, grupos de quatro camundongos Swiss receberam injeções via subcutânea (s.c) com diferentes doses de veneno diluído em 0,2mL de PBS-BSA 0,1%. Vinte quatro horas depois, as mortes foram contabilizadas e a DL₅₀ foi calculada usando o programa de análise *Probit* (Finney, 1971), com intervalo de confiança de 95%.

Para verificar a eficácia da conjugação via glutaraldeído em detoxificar o veneno, quantidades equivalentes a 2, 4, 8 e 16 vezes a DL₅₀ encontradas nesse estudo do veneno detoxificado foram injetadas por via subcutânea em grupos de quatro animais. As mortes foram contabilizadas 48 horas depois.

Realizou-se caracterização bioquímica do veneno de *T.serrulatus* bruto e detoxificado, através de eletroforese com Gel SDS Poliacrilamida (SDS-PAGE) seguindo o método de Laemmli (1970). Foi utilizado gel 15%, sendo aplicados 5, 10 e 20 µg de veneno no gel e a eletroforese realizada a 120 V, com duração de 90 minutos. Utilizou-se padrão de peso

molecular *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder*¹. O gel foi corado com Comassie-blue.

O esquema de imunização dos animais produtores de antiveneno contra *T. serrulatus* seguiu o protocolo do primeiro ciclo empregado na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), responsável por atender ao “Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde”. Portanto, foram aplicadas três doses: primeira dose (dia 0), segunda dose (dia 22), terceira dose (dia 43), utilizando-se 0,5mg de veneno total ou detoxificado. O protocolo ainda contou com a administração de três reforços (dia 50, dia 53 e dia 56), utilizando-se 0,2 mg sem adjuvante totalizando, portanto, seis imunizações por animal.

A sangria foi efetuada 11 dias após o último reforço (dia 67), retirando-se cerca de 50 ml de sangue de cada animal.

Na 1ª imunização os imunógenos preparados com salina tamponada em fosfato estéril (PBS) foram diluídos na proporção de 1:1 em adjuvante de Freund completo: grupo 1 (1,5ml de adjuvante + 1,5 ml de PBS), grupo 2 (1,5 ml de adjuvante + 1,5 ml de veneno) e grupo 3 (1,5 ml de adjuvante + 1,5 ml de veneno detoxificado). As duas imunizações subsequentes consistiram do emprego de adjuvante incompleto de Freund associado aos imunógenos, seguindo a mesma proporção da primeira dose.

A emulsão completa do antígeno com o adjuvante foi garantida com auxílio do banho ultrassônico. As duas substâncias foram transferidas em volumes iguais para tubos de ensaio esterilizados, mantidos cerca de 20 minutos em banho ultrassônico até a obtenção de uma mistura homogênea. Posteriormente foram transferidas para seringas estéreis de 5 ml e mantidas refrigeradas em isopor com gelo reciclável até o momento da aplicação nos animais.

O local de inoculação de todos os grupos foi a região dorso-lombar, dividido em dois pontos, pela via subcutânea, precedido do uso de algodão embebido com álcool iodado.

As três doses aplicadas sem adjuvante (três reforços) contaram com a associação do veneno bruto ou detoxificado (0,2 ml numa concentração de 0,2mg) com PBS, totalizando 1,2 ml de volume final aplicado via subcutânea em apenas um ponto no dorso próximo ao pescoço do animal.

4.3) Exames Físicos

Os ovinos foram submetidos a exames físicos antes das inoculações (tempo zero) e após serem realizadas as imunizações. Os exames

¹ Fermentas®

foram realizados com 20 minutos, 24 e 48 horas após as imunizações. Os parâmetros avaliados foram: comportamento, frequência cardíaca, frequência respiratória, pulso arterial, temperatura retal, frequência dos movimentos ruminais, coloração das mucosas (ocular e oral), tempo de perfusão capilar (TPC) e linfonodos (retrofaríngeo, mandibular, parotídeo, cervical superficial, subilíaco e poplíteo), averiguação do local de inoculação e grau de desidratação dos animais, de acordo com Pugh (2002).

Os parâmetros avaliados foram anotados em fichas próprias e alguns classificados em escores (Anexo 1) (Adaptado de Dirksen et al., 1990; Ferreira, 2001).

4.4) Eletrocardiogramas

Eletrocardiogramas (ECG) foram realizados em aparelho eletrocardiográfico² em todas as derivações, antes da administração dos tratamentos (Tempo zero) e durante 15 minutos ininterruptos em cada animal após aplicação dos imunógenos. O exame foi feito com o animal em repouso, em decúbito lateral direito, em mesa apropriada e, aplicada uma leve contenção manual, sem sedação. Foram avaliadas as frequências cardíacas, as ondas P, T, o complexo QRS e o comportamento geral do traçado na derivação DII.

4.5) Exames Laboratoriais

Os grupos foram submetidos às coletas de sangue nos dias das imunizações (dia zero, 22, 43, 50, 53 e 56), além dos dias em que foram realizados os exames clínicos nos animais, totalizando 18 coletas/animal. As coletas foram feitas através de punção da veia jugular com agulha para coleta a vácuo, em frascos com vácuo, com anticoagulante (EDTA a 10% e fluoreto de sódio) e sem anticoagulante para obtenção de plasma e soro, respectivamente, após centrifugação (3.000 rotações por minuto por 10 minutos), no Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Após centrifugação as amostras foram aliquotadas em dois tubos, identificados com o número do animal e data da coleta, sendo posteriormente congeladas a -20°C até seu processamento. O plasma obtido com fluoreto de sódio se destinou à dosagem de glicose.

Foram realizados hemogramas em contador eletrônico Celm e esfregaços sanguíneos, em lâminas de vidro e corados com panótico para posterior contagem diferencial de leucócitos e total de plaquetas de acordo com

Thrall (2007). O volume globular (VG) foi determinado através do método do microhematócrito.

O perfil bioquímico foi traçado por meio das dosagens séricas de creatina quinase (CK), desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), uréia, creatinina e amilase pancreática por método colorimétrico cinético utilizando kits comerciais³ no analisador bioquímico semi-automático⁴, no laboratório de Toxicologia Veterinária.

A concentração de proteínas totais foi avaliada por refratometria, e o perfil protéico fracionado foi obtido por eletroforese horizontal em gel de agarose a 12% e tampão TRIS, utilizando as amostras de plasma congeladas. Os géis foram corados com amido negro e descorados em uma série de etanol e ácido acético. A leitura foi feita por um scanner com software⁵. A concentração protéica (g/dL) foi determinada através da multiplicação do percentual de cada fração obtida pela concentração da proteína total.

No final do protocolo de imunização adotado realizou-se sangria em cada animal através da punção da veia jugular com agulha para coleta a vácuo, em frascos a vácuo sem anticoagulante. De cada animal foram retirados 50 ml de sangue e, o soro obtido após centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos foi congelado (-20°C) e posteriormente levado ao Laboratório do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para verificar a produção de anticorpos contra o veneno bruto de *T. serrulatus* (G2) e detoxificado (G3), por meio do ELISA.

4.6) Reatividade de Anticorpos por ELISA

Placas flexíveis de microtitulação foram sensibilizadas durante toda noite a 4°C com 100 µl de uma solução de tampão carbonato pH 9.6 contendo 10 µg/ml de veneno total de *T. serrulatus*. Após lavagem com solução salina contendo 0,05% de Tween, os poços foram bloqueados com leite em pó desnatado 3% em PBS por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados novamente e em seguida foram adicionados soros dos carneiros imunizados em diferentes diluições (1:100 a 1: 50.000) em PBS leite 0,1%, sendo incubados por 1 hora a 37°C.

As placas foram lavadas e a IgG anti-carneiro conjugada com peroxidase foi incubada por 1 hora a 37°C na diluição de 1:4000.

³ Bioclin®

⁴ TP Analyzer

⁵ Celm (SE-250).

²TEB ECGPC

Após lavagem das placas foram adicionados 100 µl de o-fenilenediamina (0,33 mg/ml em tampão citrato, pH 5,2, na presença de 0,04% de peróxido de hidrogênio). A reação foi parada após 20 minutos pela adição de 20 µl de uma solução de ácido sulfúrico (1:20).

Os valores de absorbância foram determinados a 492 nm usando leitor de placas de ELISA⁶. Os experimentos foram feitos em duplicata e as médias foram calculadas.

Os soros obtidos foram testados através da realização de *Western Blotting*, com uso de soros individuais e também com *pool* de soros de cada grupo no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas.

Realizou-se eletroforese SDS-PAGE e após a corrida o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Towbim, 1979). Esta foi bloqueada por uma hora com PBS contendo 0,35% de Tween. Depois de três lavagens de cinco minutos com PBS-Tween 0,05%, a membrana foi incubada por 1 hora e 30 minutos com os soros de carneiro imunizados anti-*T. serrulatus* na diluição de 1:1.000.

Foi realizado um experimento utilizando os soros individuais e outro utilizando um *pool* de soros de cada grupo.

A membrana foi lavada (PBS-Tween 0,05%) mais três vezes e então foi incubada por 1 hora com IgG anti-carneiro conjugada com peroxidase (1:2.000). Após três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05%, as proteínas imunorreativas foram detectadas utilizando DAB/cloronaftol de acordo com as instruções do produtor.

Como controle positivo, foi utilizado soro de carneiro anti-*T. serrulatus*, previamente produzido no laboratório citado.

4.7) Eutanásia, necropsia e exames microscópicos

Antes da eutanásia, realizou-se punção da veia jugular com agulha 40x12 cm acoplada em um cateter, sendo coletados aproximadamente 500 ml de sangue de cada animal em tubos tipo falcon de 50 ml sem anticoagulante. Estes foram mantidos em isopor com gelo até a formação do coágulo, sendo posteriormente centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos no Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. O soro obtido foi acondicionado em tubos de ensaio de 10 ml devidamente identificados com o número do animal e mantidos à -20°C.

A eutanásia foi realizada por meio da aplicação de xilazina (0,05 mg/kg/IV) para

sedação e lidocaína 2% (10 ml) no forame magno.

Realizou-se necropsia e coleta de fragmentos de coração, pulmões, fígado, rins, baço, retículo, rúmen, omaso, abomaso e cérebro, fixados em formol 10% tamponado. Os fragmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de cada tecido foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica.

4.8) Neutralização *in vivo* em camundongos

Avaliou-se a capacidade dos anticorpos circulantes do soro previamente produzido nos ovinos imunizados em neutralizar o veneno solúvel de *T. serrulatus*, por meio do ensaio de neutralização *in vivo*. Assim, utilizaram-se camundongos da linhagem Swiss, machos e fêmeas, peso médio de 26 gramas, oriundos do biotério da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), desafiados com 52µg/camundongo de veneno de *T. serrulatus*, via intraperitonal, diluído em 38,2µl de PBS 0,1%.

O veneno foi incubado durante uma hora a 37°C, sob agitação constante com 200µl de soro anti-escorpiônico, dividido por grupo e animal produtor, sendo inoculado em cada camundongo um volume final de 250 µl.

Foram formados aleatoriamente 15 grupos distintos com quatro indivíduos em cada, sendo dois machos e duas fêmeas, que receberam os tratamentos da seguinte forma:

G1: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 1 inoculado com PBS + adjuvante de Freund;

G2: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 2 inoculado com PBS + adjuvante de Freund;

G3: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 3 inoculado com PBS + adjuvante de Freund;

G4: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 4 inoculado com PBS + adjuvante de Freund;

G5: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 5 imunizado com veneno bruto de *T. serrulatus*;

G6: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 6 imunizado com veneno bruto de *T. serrulatus*;

G7: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 7 imunizado com veneno bruto de *T. serrulatus*;

G8: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 8 imunizado com veneno bruto de *T. serrulatus*;

⁶(BIO-RAD, 680 models).

G9: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 9 imunizado com veneno detoxificado de *T. serrulatus*;

G10: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 10 imunizado com veneno detoxificado de *T. serrulatus*;

G11: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 11 imunizado com veneno detoxificado de *T. serrulatus*;

G12: veneno de *T. serrulatus* e 200 µl de soro oriundo do ovino 12 imunizado com veneno detoxificado de *T. serrulatus*;

G13: veneno de *T. serrulatus* (controle negativo);

G14: antiveneno escorpiônico da FUNED associado ao veneno (controle positivo);

G15: pool de antiveneno dos ovinos inoculados (200 µl), para se verificar possíveis reações ao ser administrado nos camundongos.

Cada grupo ficou separado em uma caixa para facilitar a identificação dos animais nas dependências do Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram observados ininterruptamente por três horas, a fim de visualizar o aparecimento de sintomas clássicos do envenenamento por escorpião, e a mortalidade verificada até 24h após o desafio. Os principais sinais avaliados foram comportamento, sudorese, salivação, sangramento, tipo de respiração, prurido, hiperresponsividade a estímulos externos, lacrimejamento e morte.

5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo de parcelas sub-subdivididas, conforme preconiza Sampaio (2007). As parcelas correspondem aos grupos (controle, veneno total e veneno detoxificado), as subparcelas aos períodos de imunização (primeira a sexta imunização) e as sub-subparcelas aos momentos de coleta (zero, 24 e 48 horas) dentro de cada imunização. Nas variáveis que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação de dados (logaritmo), sendo a comparação de médias através do teste de Tukey.

Na contagem diferencial de leucócitos, a variável eosinófilo sofreu análise não paramétrica Kruskal-Wallis na comparação dos grupos e Friedman para os tempos de coleta. No exame clínico, a análise da frequência de movimentos ruminais também foi através destes testes.

6) RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1) Determinação da DL₅₀

A DL₅₀ encontrada foi de 20,14 µg/animal, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Cálculo da DL₅₀ do veneno bruto extraído de *T. serrulatus*.

Grupo	Dose (µg/animal)	Sobrevivência
1	15	4/4
2	18,5	2/4
3	21,6	2/4
4	25,92	¼
5	31,04	0/4

Para o cálculo da dose letal (DL₅₀), aplicou-se inicialmente 15 µg/animal do veneno de *T. serrulatus* nos camundongos (1,16 mg/kg) conforme descrito por Lira da Silva et al. (2000). Na dose de 15 µg/animal houve 100% de

sobrevivência, enquanto na dose de 31,11 µg/animal, todos camundongos morreram.

6.2) Toxicidade do Veneno Conjugado

O teste do poder tóxico do veneno detoxificado com glutaraldeído se encontra na tabela 2.

Tabela 2: Teste de toxicidade do veneno de *T.serrulatus* tratado com glutaraldeído em camundongos.

Grupo	DL ₅₀	µg	Sobrevivência
1	2	40,28	4/4
2	4	80,56	4/4
3	8	161,12	4/4
4	16	322,24	4/4

Além de terem sobrevivido ao desafio, os animais não apresentaram sintomas típicos do envenenamento por *T. serrulatus* após receberem injeções com veneno detoxificado desta espécie de escorpião. Portanto, o glutaraldeído não se mostrou tóxico aos animais, semelhante ao relatado por Machado de Ávila et al. (2004) que também utilizaram dose equivalente à 16DL₅₀ com ausência de sinais clínicos em camundongos.

6.3) Caracterização Bioquímica do Veneno

6.3.1) SDS-PAGE

O gel SDS poliacrilamida utilizado para quantificação e separação das proteínas do veneno bruto e detoxificado se encontra na figura 6.

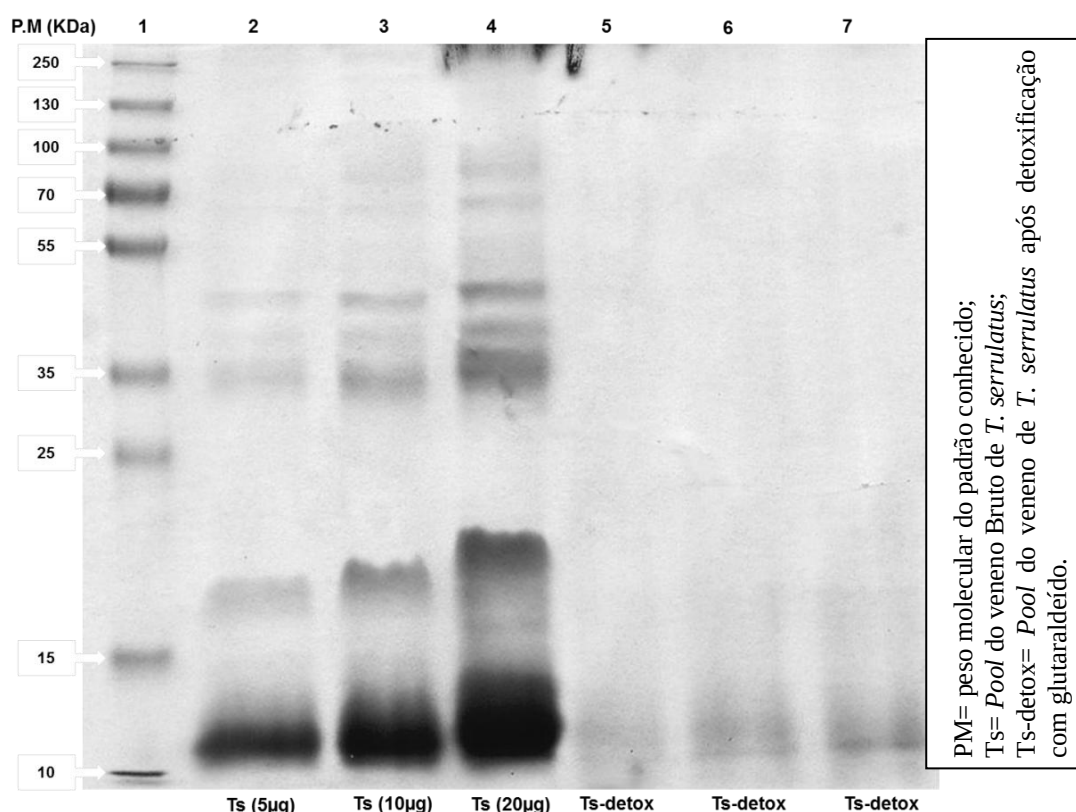


Figura 6: SDS-PAGE (15%) dos principais componentes do veneno bruto e detoxificado de *Tityus serrulatus*, após coloração com Coomassie-blue.

Testes de imuno-diagnósticos são utilizados para determinar e conhecer os componentes protéicos de um veneno (Kalapothakis et al., 2001), como realizado nesse experimento.

O resultado do SDS-PAGE revelou bandas de alto e baixo peso molecular no veneno bruto de *Tityus serrulatus*, situadas entre 10 e 100 KDa. É sabido que as neurotoxinas do veneno escorpiônico, principais responsáveis pela ação tóxica do mesmo, são de baixo peso molecular, em torno de 3,5 e 8 KDa, se difundindo rapidamente do sitio de inoculação

para os tecidos (Almeida et al., 2002; Borges et al., 2008).

A banda mais escura na parte inferior do gel provavelmente contém as neurotoxinas. Elas encontram-se aparentemente acima da banda do padrão de 10 KDa, quando na verdade apresentam peso inferior (6 a 7 KDa). Esse deslocamento provavelmente ocorreu pela alta concentração destes componentes, que podem se dimerizar e formar uma banda entre 10 e 15 KDa (Duarte, 2012*). Pinto et al. (2010), ao estudarem os venenos de *Tityus serrulatus* e *T. fasciolatus* por meio de SDS-PAGE, demonstraram uma maior concentração de proteínas de baixo peso

molecular, através da formação de uma banda mais larga inferior a 10KDa.

Não foi possível a observação das bandas protéicas no gel do veneno detoxificado em diferentes concentrações, como mostram os números 5, 6 e 7 do SDS-PAGE realizado. Provavelmente isso ocorreu devido ao processo de acoplamento via glutaraldeído para detoxificação do veneno escorpiónico, o que gera a interligação dos componentes do veneno, resultando em um complexo de alto peso

molecular. Possivelmente o complexo não conseguiu adentrar a malha do gel.

6.3.2) WESTERN BLOTTING

Os *Western Blotting* realizados no presente estudo se encontram nas figuras 7 (amostras individuais) e 8 (*pool* de amostras).

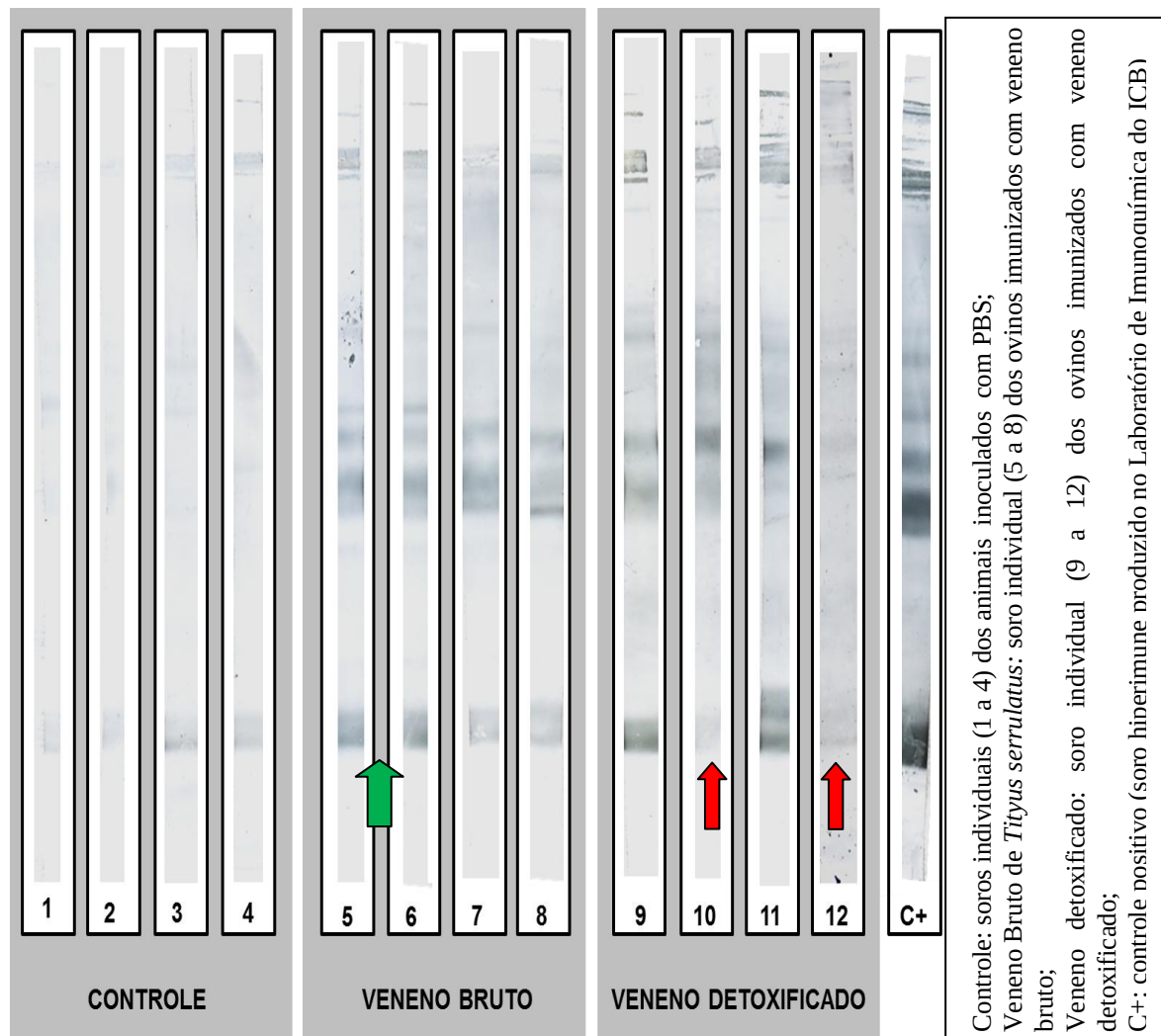


Figura 7: *Western Blotting* individual dos ovinos inoculados com PBS (1-4), veneno bruto de *T. serrulatus* (5-8) e detoxificado com glutaraldeído (9-12).

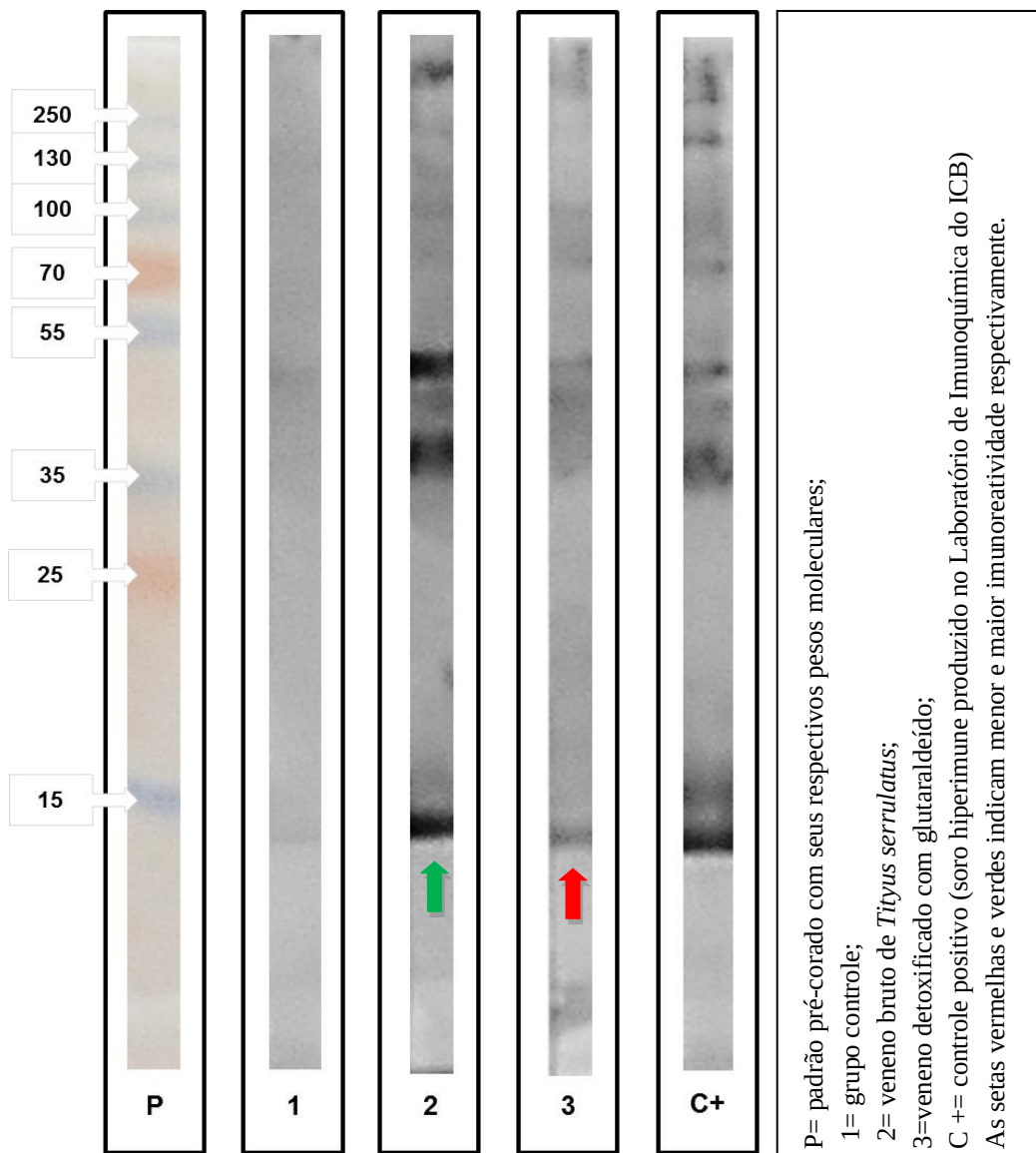


Figura 8: Western Blotting do pool de soros de cada grupo de ovinos inoculados.

Apesar de reconhecerem as mesmas bandas, aparentemente o grupo veneno detoxificado reagiu mais fracamente. Ao analisar os soros individualmente, pode-se perceber uma grande variação na intensidade da reatividade dentro de cada grupo, ou seja, no grupo veneno bruto os animais 5 e 6 foram aqueles com maior intensidade de resposta (seta verde) e no grupo detoxificado os animais 10 e 12 apresentaram resposta menos reativa (seta vermelha), principalmente quando analisadas as toxinas de baixo peso molecular. O mesmo padrão de resposta é verificado no *pool* de cada grupo, em que o grupo 2 (veneno bruto) apresenta resposta

mais intensa que o grupo 3 (veneno detoxificado).

Essas diferenças de imunoreatividade se traduziram em diferença na eficácia de neutralização do veneno, sendo discutido no tópico soroneutralização *in vivo*.

6.4) Reatividade de anticorpos por ELISA

Os soros obtidos dos animais imunizados, provenientes do veneno bruto e detoxificado com glutaraldeído, após serem diluídos em diferentes concentrações foram testados, como mostrado nos gráficos 1,2,3 e 4.

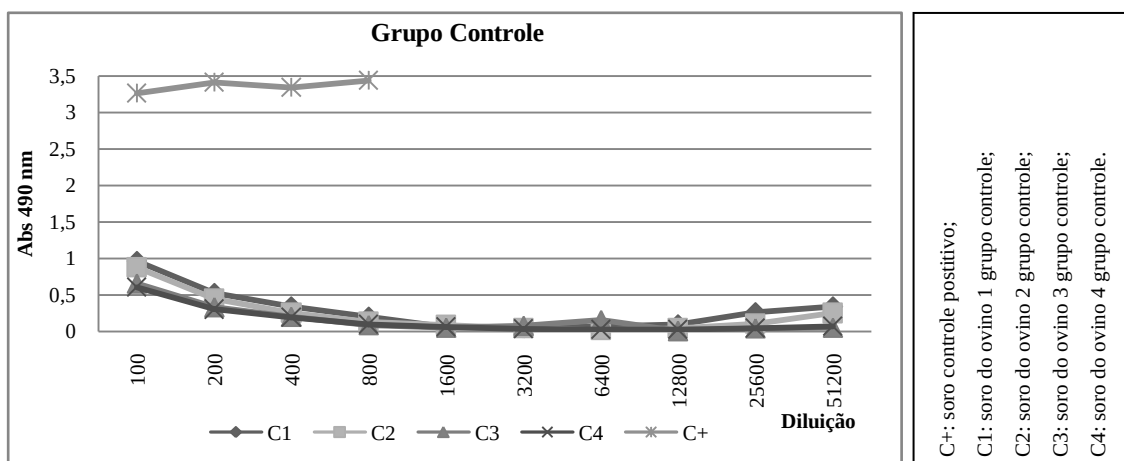


Gráfico 1: Reatividade individual de anticorpos por ELISA em ovinos que receberam PBS durante o protocolo de imunização para produção de antiveneno escorpiônico.

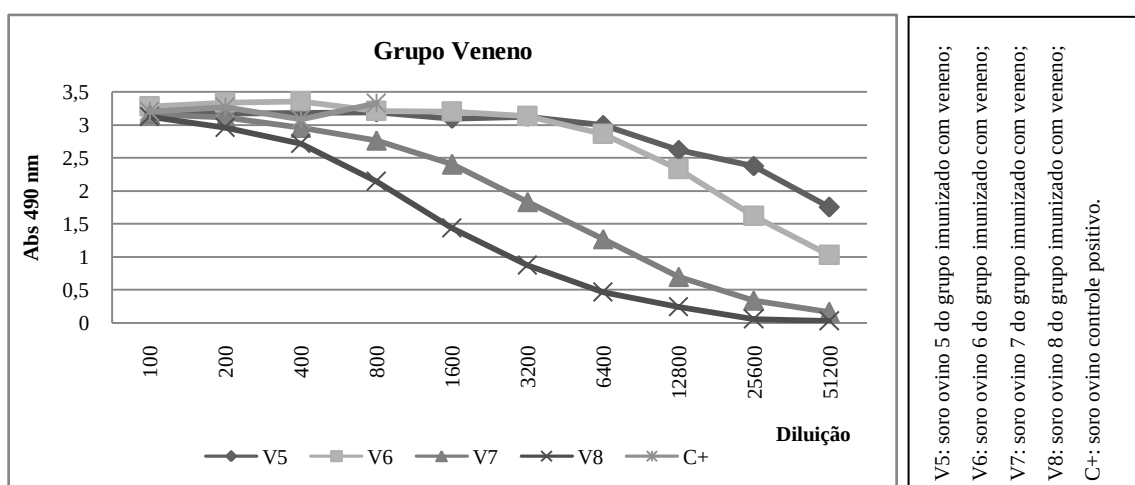


Gráfico 2: Reatividade individual de anticorpos por ELISA em ovinos que receberam veneno bruto de *T. serrulatus* durante o protocolo de imunização para produção de antiveneno escorpiônico

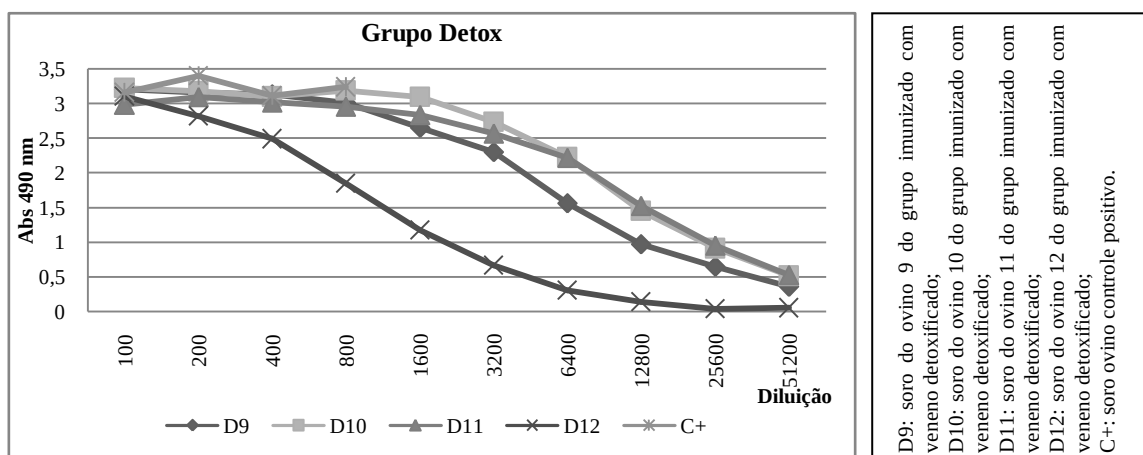


Gráfico 3: Reatividade individual de anticorpos por ELISA em ovinos que receberam veneno detoxificado de *T. serrulatus* durante o protocolo de imunização para produção de antiveneno escorpiônico.

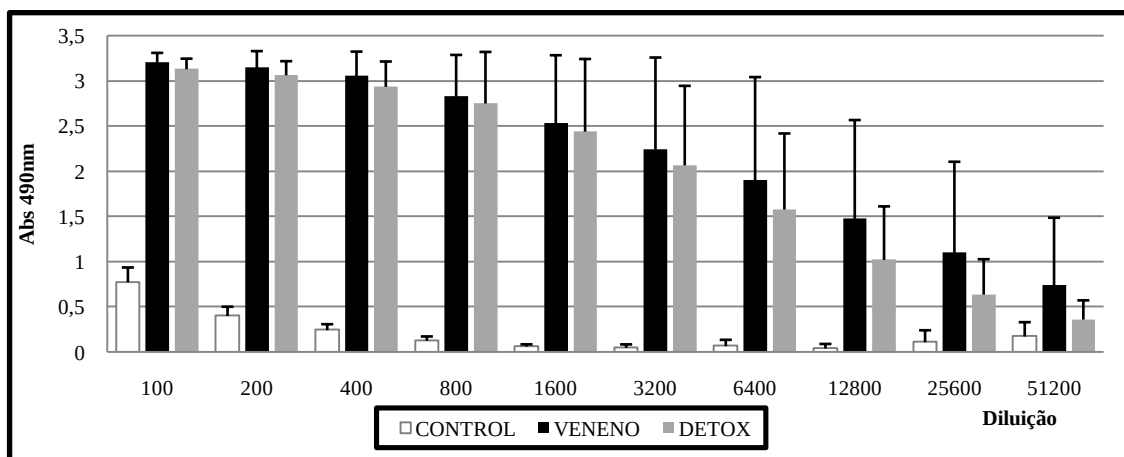


Gráfico 4: Reatividade de anticorpos por ELISA do pool de soros de ovinos que receberam PBS (controle), veneno bruto e veneno detoxificado de *T. serrulatus* durante o protocolo de imunização.

De maneira geral, a reatividade de anticorpos do grupo veneno bruto foi semelhante à do grupo imunizado com veneno detoxificado, ou seja, o veneno após ser tratado com glutaraldeído teve sua capacidade imunogênica preservada. Esses resultados indicam que os títulos obtidos dos ovinos imunizados se sobrepuseram. Outros estudos revelaram que o veneno escorpionic quando submetido a processos com intuito de diminuir sua toxicidade pode manter sua capacidade antigênica e imunogênica, seja através da irradiação (Lila e Fátima, 2011), processo de purificação e cromatografia (Chávez-Olortegui et al., 1997), uso de proteínas recombinantes (Guatimosim et al., 2000) ou adição de substâncias como glutaraldeído (Machado de Ávila et al., 2004).

Lila e Fátima (2011) verificaram em estudo com escorpião *Androctonus australis hector*, considerada uma das espécies mais perigosas na Argélia, que o soro produzido por coelhos imunizados com veneno detoxificado através de irradiação gama continha mais anticorpos do que o soro proveniente da imunização com veneno bruto e que os animais apresentaram menos sinais de toxicidade ao veneno, analisados através da bioquímica sanguínea e histopatologia dos órgãos.

Outros estudos também determinaram que mesmo após processos de detoxificação, alguns imunógenos preservaram sua antigenicidade (Chávez-Olortegui et al., 1997;

Guatimosim et al., 2000; Machado de Ávila et al. 2004).

Quando se analisa individualmente os animais dentro de cada grupo, existe diferença na produção de anticorpos. Dessa forma, parece que alguns indivíduos respondem de maneira mais satisfatória no que diz respeito à quantidade do que outros, como é o caso dos animais cinco e seis quando comparados com os de número sete e oito (grupo veneno bruto). A mesma informação pode-se obter do grupo imunizado com veneno detoxificado, onde o animal de menor produção foi o número 12. Este mesmo padrão de resposta foi verificado no *Western Blotting*, mas a soroneutralização *in vivo* foi determinante na avaliação da eficácia dos anticorpos em neutralizar o veneno de *Tityus serrulatus*.

A reatividade de anticorpos através de ELISA mostrou que nos grupos que receberam veneno bruto e detoxificado houve produção de anticorpos. Portanto, o veneno mesmo após tratamento com glutaraldeído preservou sua capacidade imunogênica.

6.5) Avaliações Físicas

Os valores médios dos parâmetros físicos avaliados em ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado com glutaraldeído (G3) de *Tityus serrulatus* se encontram na tabela 3.

Tabela 3: Valores médios da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura (T), pulso arterial e movimentos ruminais dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus*.

Parâmetros	Grupo	T0	1ª	24 h	48 h	2ª	24 h	48 h	3ª	24 h	48 h	4ª	24 h	48 h	5ª	24 h	48 h	6ª	24 h	48 h
FC (BPM)	G1	116,0	85,5	84,2	85,5	91,0	84,0	84,5	90,0	70,0	70,0	81,0	88,0	72,5	82,0	73,0	78,5	84,0	79,5	76,0
	G2	106,2	81,0	74,2	89,5	94,0	107,0	90,0	112,0	103,0	92,0	101,0	93,0	94,0	139,0	80,0	88,0	82,0	80,0	78,0
	G3	120,0	88,5	84,7	76,0	94,0	113,0	95,0	114,0	98,0	94,5	100,0	86,0	87,0	91,0	86,0	80,0	89,0	81,0	84,0
FR (MR)	G1	34,7	25,2	29,5	36,2	24,0	24,5	26,0	23,0	22,0	22,0	20,0	26,0	20,0	22,0	28,0	23,0	22,0	22,0	20,0
	G2	36,5	24,0	33,2	32,5	31,0	37,0	51,0	26,0	31,0	46,0	33,0	37,0	36,0	43,0	33,0	27,0	27,0	25,0	25,0
	G3	41,2	35,0	33,0	31,75	31,0	39,0	34,0	28,0	32,0	28,0	25,0	28,0	24,0	29,0	25,0	20,0	28,0	25,0	24,0
T (°C)	G1	39,0	39,5	39,2	39,3	38,6	39,0	38,8	38,8	38,4	38,4	38,4	38,4	38,6	38,5	38,6	38,6	38,8	38,7	38,7
	G2	38,7	38,6	39,5	38,8	38,9	40,0	39,7	39,2	39,6	39,4	39,3	39,1	39,3	39,4	39,1	39,2	39,2	38,9	38,8
	G3	39,0	39,1	39,0	38,8	39,3	40,3	39,4	39,2	40,5	39,8	38,9	38,6	38,7	38,8	38,8	38,8	39,8	39,0	38,9
PULSO	G1	81,0	85,5	78,2	77,0	64,2	56,5	67,0	79,0	60,5	60,5	71,0	67,0	60,0	76,0	59,5	67,5	65,0	63,5	63,0
	G2	71,2	72,2	62,0	76,5	68,0	83,0	80,0	88,0	80,0	83,0	88,0	80,0	84,0	98,0	79,0	73,0	77,0	68,0	66,0
	G3	69,5	77,2	72,2	65,7	73,0	95,0	78,0	93,0	80,0	81,2	79,0	73,0	78,0	85,0	74,0	72,0	72,0	68,0	71,0
Mov. Ruminais (Mov/min)	G1	3,0	1,5	2,0	2,2	1,5	2,2	3,0	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,7	2,7	1,7	2,2	2,2	2,2	2,2
	G2	2,5	1,5	1,5	2,2	1,0	2,0	1,2	2,0	2,7	1,7	2,2	2,0	2,0	1,7	2,5	2,0	0,5	1,7	2,2
	G3	2,7	1,0	1,7	2,2	0,5	1,5	0,5	2,5	2,0	2,0	2,0	2,25	2,5	1,5	2,2	2,5	2,5	2,2	1,7

6.5.1) Aferição da Frequência Cardíaca

Os valores da frequência cardíaca dos ovinos imunizados se encontram na tabela 4 e gráfico5.

Tabela 4: Frequência Cardíaca (FC) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes momentos do protocolo de imunização.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	116*	85	84	85
G2- Veneno	106*	81	74	89
G3-Detoxif.	120*	88	84	76
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	116	91	84 ^a	84
G2- Veneno	106	94	107 ^b	90
G3-Detoxif.	120	94	113 ^b	95
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	116	90	70	70
G2- Veneno	106	112	103	92
G3-Detoxif.	120	114	98	94
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	116	81	88	72
G2- Veneno	106	101	93	94
G3-Detoxif.	120	100	86	87
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	116	82 ^a	73	78
G2- Veneno	106	139 ^{Bb}	80 ^A	88 ^A
G3-Detoxif.	120	91 ^a	86	80
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	116*	84	79	76
G2- Veneno	106*	82	80	78
G3-Detoxif.	120*	89	81	84

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas com * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

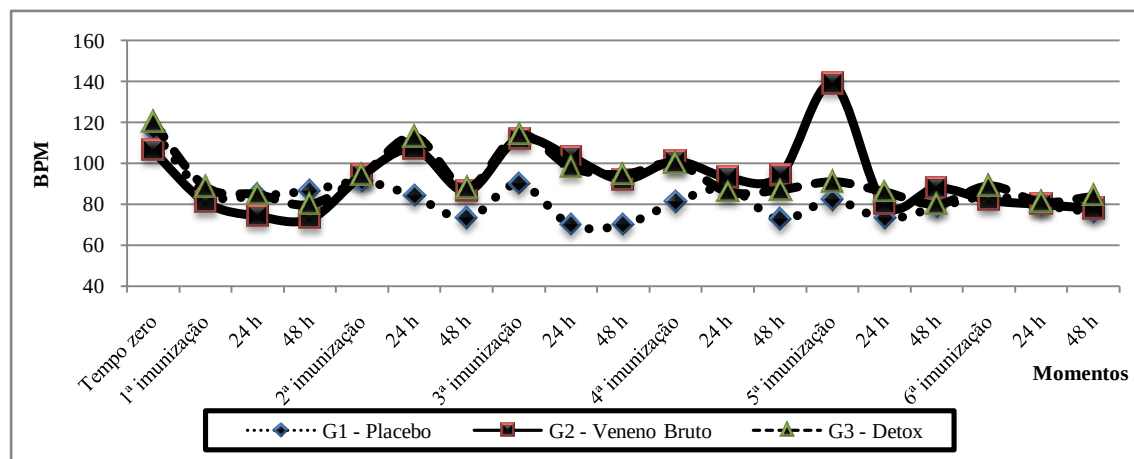


Gráfico5: Frequências cardíacas (bpm) de ovinos inoculados com PBS (grupo1), veneno bruto (grupo 2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (grupo 3) em diferentes momentos.

Nos exames físicos, realizados nos tempos previamente fixados, a frequência cardíaca (FC) se mostrou superior em alguns momentos, quando as médias foram comparadas com resultados publicados na literatura (70-90 bpm) (Pugh, 2002). Entretanto, quando observado o tempo zero dos animais, os valores encontrados já foram superiores, possivelmente em decorrência do estresse dos animais (Jackson e Cockcroft, 2002) que estavam sendo

examinados pela primeira vez. Portanto, esse aumento não representa significado clínico importante.

À medida que as imunizações foram sendo realizadas houve uma tendência de normalização dos valores, uma vez que os animais já estavam acostumados e habituados com o procedimento. Observa-se que, o grupo que recebeu PBS (G1) apresentou durante o protocolo de imunização valores inferiores de FC

comparado com os grupos que receberam veneno, seja na sua forma total ou detoxificada, portanto, 24 horas após a 2ª imunização houve elevação da frequência cardíaca nos grupos 2 (107 bpm) e 3 (113 bpm), significativamente superior ($P<0,05$) ao valor encontrado no G1 (controle) (Gráfico 5). Esse padrão de resposta se repetiu nas 3ª e 4ª imunizações, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

A 5ª imunização foi marcada por taquicardia no grupo que recebeu veneno bruto (139bpm), sendo estatisticamente diferente dos outros dois grupos ($p<0,05$).

As alterações cardiovasculares destacam-se entre as mais graves observadas no envenenamento escorpiónico. Em trabalhos pioneiros na descrição detalhada de afecções cardíacas em humanos, Gueron et al. (1967) e Gueron e Yaron (1970) relataram alterações na auscultação e nos traçados eletrocardiográficos, tais como taquicardia e bradicardia. Além destes achados também são descritos, aumento da contração do miocárdio, lesões de fibras cardíacas e hipertensão em função da liberação de catecolaminas (Marcussi et al., 2011).

Apesar do grupo que recebeu veneno bruto de *T. serrulatus* no segundo reforço ter apresentado taquicardia, que é um importante achado clínico deste envenenamento, durante a auscultação não foram detectadas arritmias nem encontradas alterações cardíacas no eletrocardiograma, bem como lesões na avaliação macro e microscópica.

6.5.2) Aferição da Frequência Respiratória (FR).

A avaliação da frequência respiratória demonstra valores acima do limite máximo referido na literatura (12-20/min) de acordo com Pugh (2002), antes mesmo de qualquer aplicação de imunógeno (tempo zero) em todos os grupos (Tabela 5 e Gráfico 6). Assim como visto na frequência cardíaca, esse fato possivelmente ocorreu em função de estresse dos animais ao serem manipulados e também a temperaturas elevadas, uma vez que o experimento foi conduzido em meses quentes e alguns animais apresentavam hiperventilação como forma de dissipação de calor (Dirksen et al., 1990).

O que chama atenção no gráfico 6 é o comportamento do grupo que recebeu veneno bruto de *T. serrulatus* (G2), com valores médios acima dos outros grupos, principalmente nas 4ª e 5ª imunizações e seus respectivos tempos de coleta, apesar de não haver diferença significativa em alguns momentos. Semelhante ao ocorrido na aferição da frequência cardíaca, o dia da 5ª imunização foi marcado por diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos, veneno bruto (G2) e controle (G1), possivelmente por ação do veneno escorpiónico.

Durante a auscultação foram detectados estertores no fluxo aéreo traqueal de um animal do G2, reforçando a ação do veneno escorpiónico no sistema respiratório dos animais imunizados com veneno bruto. Essa alteração não foi vista nos animais que receberam veneno detoxificado com glutaraldeído (G3).

Tabela 5: Frequência Respiratória (FR) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes momentos do protocolo de imunização.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	34	25 ^{Ba}	29 ^{AB}	36 ^A
G2- Veneno	36	24 ^{Ba}	33 ^A	32 ^A
G3-Detoxif.	41	35 ^b	33	31
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	34	24	24	26
G2- Veneno	36	31	37	51
G3-Detoxif.	41	31	39	34
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	34 [*]	23	22	22
G2- Veneno	36 [*]	26	31	46
G3-Detoxif.	41 [*]	28	32	28
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	34 [*]	20	26	20
G2- Veneno	36 [*]	33	37	36
G3-Detoxif.	41 [*]	25	28	24
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	34	22 ^a	28	23
G2- Veneno	36	43 ^b	33	27
G3-Detoxif.	41	29 ^{ab}	25	20
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	34	22	22	20
G2- Veneno	36	27	25	25
G3-Detoxif.	41	28	25	24

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas com * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

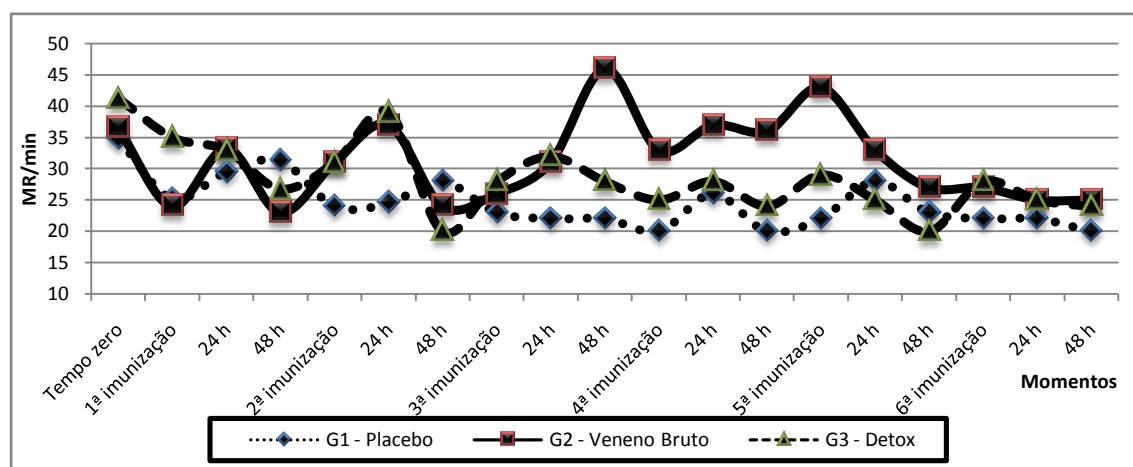


Gráfico6: Frequências respiratórias (movimento respiratório/min) de ovinos inoculados com PBS (grupo1), veneno bruto (grupo 2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (grupo 3) em diferentes momentos.

Em 1996, Revelo e colaboradores analisaram a cinética do veneno de *Tityus serrulatus* injetado por via subcutânea em camundongos e demonstraram que este atinge sua concentração máxima nos pulmões em 30 minutos. Portanto, devido à afinidade do veneno pelos pulmões, tanto na Medicina Humana quanto na Veterinária são descritas alterações no sistema respiratório após envenenamento escorpiônico.

Em humanos, as manifestações respiratórias incluem rinorreia, tosse, espirros, estertores pulmonares, sibilos, taquipneia, dispneia, bradipneia, mas sem dúvida, o edema pulmonar é o sinal mais grave. As causas são,

por excelência, de origem cardiogênica, embora a literatura nunca descarte a participação de mecanismos não-cardiogênicos, muito evidentes na rotina clínica (Freire-Maia et al., 1994; Cupo et al., 2003).

Pinto et al. (2010) trabalhando com ratos inoculados com veneno de *T. serrulatus*, observaram dispneia, padrão respiratório abdominal e intensificação da contração da musculatura respiratória durante a expiração, espirros e secreção oro-nasal. E, Ribeiro et al. (2011), também relataram em cães que receberam veneno de *T. serrulatus*, espirros frequentes, sialorreia e rinorreia.

6.5.3) Aferição da Temperatura Retal (T °C)

Os valores médios da temperatura retal dos animais imunizados se encontram na tabela 6 e gráfico7.

Tabela 6: Temperatura retal (°C) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes momentos do protocolo de imunização.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	39,0	39,5 ^b	39,2	39,3
G2- Veneno	38,7	38,6 ^{Aa}	39,5 ^B	38,8 ^{AB}
G3-Detoxif.	39,0	39,1 ^{ab}	39,0	38,8
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	39,0	38,6	39,0	38,8
G2- Veneno	38,7	38,9 ^A	40,0 ^B	39,7 ^B
G3-Detoxif.	39,0	39,3 ^A	40,3 ^B	39,4 ^A
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	39,0	38,8	38,4 ^a	38,4 ^a
G2- Veneno	38,7	39,2	39,6 ^b	39,4 ^b
G3-Detoxif.	39,0	39,2 ^A	40,5 ^{Bb}	39,8 ^{Ab}
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	39,0	38,4 ^a	38,4	38,6
G2- Veneno	38,7	39,3 ^b	39,1	39,3
G3-Detoxif.	39,0	38,9 ^{ab}	38,6	38,7
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	39,0	38,5 ^a	38,6	38,6
G2- Veneno	38,7	39,4 ^b	39,1	39,2
G3-Detoxif.	39,0	38,8 ^{ab}	38,8	38,8
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	39,0	38,8	38,7	38,7
G2- Veneno	38,7	39,2	38,9	38,8
G3-Detoxif.	39,0	39,8	39	38,9

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

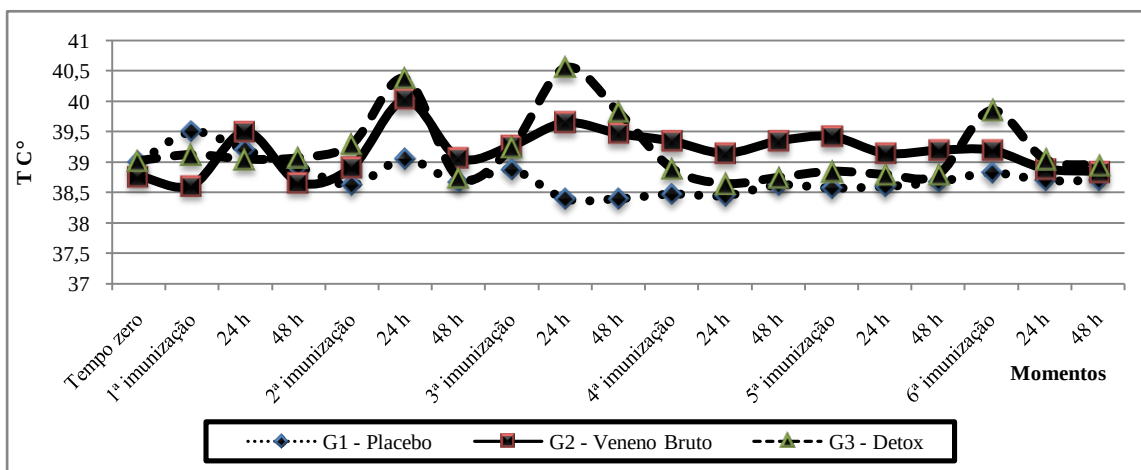


Gráfico7: Temperatura retal média dos ovinos inoculados com PBS (grupo 1), veneno bruto de *Tityus serrulatus* (grupo 2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (grupo 3) em diferentes tempos.

As temperaturas retais médias dos grupos em todos os tempos foram semelhantes e, levando-se em consideração a faixa de valores de normalidade para a espécie (38,5-40,0°C) (Pugh, 2002), pode-se afirmar que se mantiveram dentro de limites fisiológicos durante boa parte do protocolo de imunização. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores basais e dos encontrados nos dias das imunizações.

Com base no gráfico 7, nota-se comportamento distinto nas imunizações com e sem a utilização de adjuvante. As curvas foram mais homogêneas em todos os grupos durante os reforços, com exceção da 6ª imunização no grupo que recebeu veneno detoxificado, embora o valor médio encontrado esteja dentro da normalidade. Embora seja conhecido que o adjuvante de Freund promova uma reação inflamatória local (Resende et al., 2004) que

pode de alguma forma contribuir na elevação da temperatura dos animais, percebe-se que os valores médios nos grupos G2 e G3 foram superiores, principalmente após 24 horas das 2ª e 3ª imunizações, nesta última com valores acima da normalidade. Assim, nos grupos que receberam veneno de *T. serrulatus* houve uma tendência de elevação da temperatura retal, contribuindo para estes achados.

Pessini et al. (2006) demonstraram elevação de temperatura corporal em ratos após aplicação do veneno de *T. serrulatus* via intraperitoneal, em decorrência da resposta inflamatória sistêmica gerada pela liberação de citocinas como interleucina-1 e interleucina-6. Essa alteração clínica não foi observada em cães envenenados (Ribeiro et al., 2011), os quais mantiveram a temperatura corporal dentro dos limites fisiológicos.

6.5.4) Aferição do Tempo de Perfusão Capilar (TPC)

O TPC da mucosa oral é um indicativo útil da perfusão dos tecidos periféricos e o estado do sistema cardiovascular (Pugh, 2002; Jackson e Cockcroft, 2002).

O TPC foi inferior à dois segundos, estando dentro da faixa de normalidade para a espécie ovina (Pugh, 2002), sem alteração em todos os momentos avaliados. Esse resultado indica que, o veneno de *T. serrulatus* na sua forma bruta ou após detoxificação não altera a volemia dos animais imunizados, uma vez que o grupo controle se comportou da mesma maneira.

6.5.5) Aferição do Pulso Arterial

Os valores médios do pulso arterial se encontram demonstrados na tabela 7 e gráfico 8.

Tabela 7: Pulso arterial de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes momentos do protocolo de imunização.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	81,0	85,5	78,2 ^b	77,0
G2- Veneno	71,2	72,2 ^{AB}	62,0 ^{Aa}	76,5 ^B
G3-Detoxif.	69,5	77,2	72,2 ^{ab}	65,7
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	81,0	64,2	56,5 ^a	67,0
G2- Veneno	71,2	68,0	83,0 ^b	80,0
G3-Detoxif.	69,5	73,0	95,0 ^b	78,0
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	81,0	79,0 ^B	60,5 ^A	60,5 ^{Aa}
G2- Veneno	71,2	88,0	80,0	83,0 ^b
G3-Detoxif.	69,5	93,0	80,0	81,2 ^{ab}
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	81,0	71,0	67,0	60,0
G2- Veneno	71,2	88,0	80,0	84,0
G3-Detoxif.	69,5	79,0	73,0	78,0
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	81,0	76,0	59,5	67,5
G2- Veneno	71,2	98,0 ^B	79,0 ^{AB}	73,0 ^A
G3-Detoxif.	69,5	85,0	74,0	72,0
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	81,0	65,0	63,5	63,0
G2- Veneno	71,2	77,0	68,0	66,0
G3-Detoxif.	69,5	72,0	68,0	71,0

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

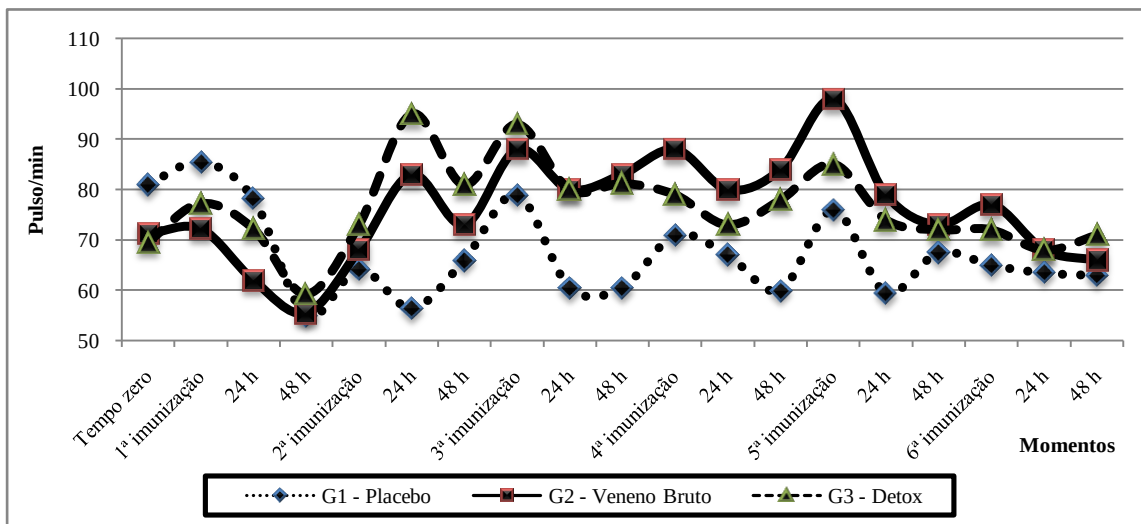


Gráfico 8: Pulso arterial dos ovinos inoculados com PBS (grupo 1), veneno bruto de *Tityus serrulatus* (grupo 2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (grupo 3) em diferentes tempos.

A aferição do pulso da artéria femoral dos ovinos permite, através da avaliação da força e sincronia das contrações cardíacas, avaliar o débito cardíaco. Pulsos fracos ou ausentes são percebidos em casos de hipotensão e baixo débito cardíaco, em contrapartida, pulsos fortes são compatíveis com choque hiperdinâmico, insuficiência da válvula aórtica ou persistência de ducto arterioso (Pugh, 2002).

Levando em consideração os valores de referência para a espécie (70-80 bpm) (Pugh, 2002), nota-se que em alguns momentos os valores médios encontrados estão acima do referenciado, como exemplo o G1 (controle) no tempo zero. Todavia, após as imunizações, os grupos que receberam veneno, especialmente o G2 (veneno bruto) apresentaram os maiores valores médios de pulsação arterial (Gráfico 8).

Observa-se no gráfico 8 comportamento semelhante à aferição da frequência cardíaca através da auscultação, com valores médios no G1 (controle), inferiores aos outros grupos. Assim, no momento 24 horas após a 2ª imunização houve taquicardia no G2 (83 pulsações/minuto) e G3 (95 pulsações/minuto), com diferença significativa ($P < 0,05$) com o G1 (56,5 pulsações/minuto). Portanto, o veneno

escorpiônico pode ter contribuído para este achado, uma vez que é relatado taquicardia nos animais envenenados (Marcussi et al., 2011) e efeitos cardiotoxícos diretos (Cardoso et al., 2003), embora a avaliação do pulso, concomitantemente à auscultação cardíaca, tenha indicado normalidade e coerência à frequência cardíaca, o que corrobora com os achados de Ribeiro et al. (2011) em cães após inoculação do veneno da mesma espécie de escorpião.

Apesar da 5ª imunização ter sido marcada por aumento das médias em todos os grupos, houve diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo que recebeu veneno bruto (G2) com os outros dois (G1 e G3). É importante ressaltar que neste mesmo momento além de taquicardia, os ovinos imunizados com veneno bruto de *T. serrulatus* apresentaram taquipneia e aumento da temperatura retal, embora essa última tenha permanecido dentro dos valores de normalidade para a espécie.

6.5.6) Aferição dos movimentos ruminiais

A frequência média de movimentos ruminiais se encontram na tabela 8 e gráfico 10.

Tabela 8: Movimentos Ruminais de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes momentos do protocolo de imunização.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	3,0 [*]	1,5	2,0	2,2
G2- Veneno	2,5 [*]	1,5	1,5	2,2
G3-Detoxif.	2,7 [*]	1,0	1,7	2,2
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	3,0 [*]	1,5 ^{Ab}	2,2 ^{AB}	3,0 ^{Bb}
G2- Veneno	2,5 [*]	1,0 ^{ab}	2,0	1,2 ^{ab}
G3-Detoxif.	2,7 [*]	0,5 ^a	1,5	0,5 ^a
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	3,0	2,0	2,5	2,5
G2- Veneno	2,5	2,0	2,7	1,7
G3-Detoxif.	2,7	2,5	2,0	2,0
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	3,0	2,5	2,5	2,7
G2- Veneno	2,5	2,2	2,0	2,0
G3-Detoxif.	2,7	2,0	2,2	2,5
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	3,0	2,7	1,7	2,2
G2- Veneno	2,5	1,7	2,5	2,0
G3-Detoxif.	2,7	1,5	2,2	2,5
	T0	6a Imunização	24 hs	48 hs
G1- Controle	3,0	2,2 ^b	2,2	2,2
G2- Veneno	2,5	0,5 ^{Aa}	1,7 ^B	2,2 ^B
G3-Detoxif.	2,7	2,5 ^b	2,2	1,7

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas ao teste de Friedman e Kruskal-wallis, com $P < 0,05$, respectivamente.

Médias marcadas com * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas ao teste Friedman, com $P < 0,05$.

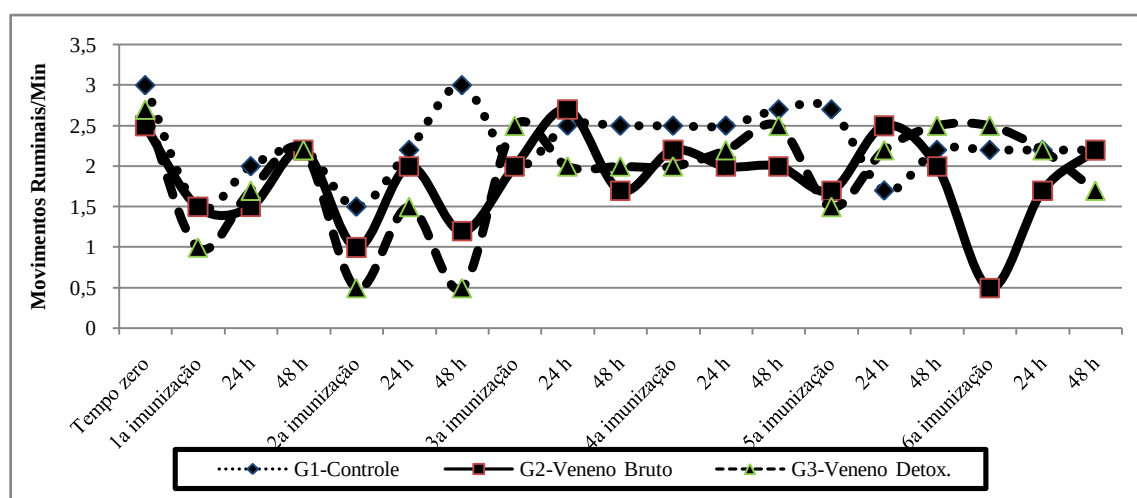


Gráfico9: Movimentos ruminais dos ovinos inoculados com PBS (grupo 1), veneno bruto de *Tityus serrulatus* (grupo 2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (grupo 3) em diferentes tempos.

Levando em consideração os valores de referência para a espécie (1-2 movimentos/minuto) (Pugh, 2002), ressalta-se que foram poucos os momentos em que os valores médios desta variável se mostraram reduzidos.

Pelo gráfico 9 é possível perceber comportamento semelhante entre os grupos nas primeiras imunizações e que o grupo controle (G1) foi o que apresentou valores mais elevados na aferição da frequência ruminal. Na 2ª imunização houve diferença significativa

($P < 0,05$) entre o grupo veneno detoxificado (G3) e controle (G1) no dia da imunização e também no momento 48 horas após a aplicação do imunógeno, sendo encontrados valores inferiores (0,5 movimento ruminal/min) aos fisiológicos. Dessa forma, os animais do G3 apresentaram algum desconforto possivelmente em decorrência do processo inflamatório no local da aplicação ou até mesmo em função do veneno escorpiónico.

A 6ª imunização foi marcada por redução significativa ($P < 0,05$) da motilidade

ruminal no grupo que recebeu veneno bruto de *T. serrulatus* (G2).

Percebe-se que os valores médios do grupo controle (G1) sempre estiveram dentro dos limites de normalidade para a espécie ao longo de todo protocolo de imunização, ou seja, houve possivelmente influência do veneno escorpiônico no funcionamento normal do rúmen. É sabido que a motilidade ruminal diminui em função de diversos fatores, tais como estresse, alimento pobre em fibras efetivas, indigestões (acidose ruminal), pirexia, distensão exagerada do órgão, endotoxemias, uso de anestésicos, sono e condições que causam dor (Dirksen et al., 1990; Jackson e Cockcroft, 2002).

Apesar de não ter havido alteração de comportamento dos animais imunizados, como apatia, prostração ou inapetência, possivelmente os animais que receberam veneno, na sua forma bruta ou detoxificada, apresentaram algum desconforto, o que pode ter acarretado diminuição da motilidade ruminal.

Ao exame físico os ovinos não demonstraram alteração clínica compatível com sinais típicos do envenenamento escorpiônico, tais como piloereção, diarreia, sinais de dor no local da aplicação, espirros, dor abdominal, dispneia, edema pulmonar, sialorreia, rinorreia ou lacrimejamento (Rezende et al., 1996; Cupo e Hering, 2002; Cupo et al., 2003; Campolina, 2006; Marcussi et al., 2011; Ribeiro et al., 2011). Entretanto, foram detectadas alterações clínicas discretas no grupo que recebeu veneno bruto de *T. serrulatus* em alguns momentos, tais como taquicardia, taquipneia, elevação da temperatura corporal, hipomotilidade ruminal e aumento de secreção traqueal, o que sugere que o veneno tenha sido capaz de provocar essas alterações. Além disso, os valores médios dos parâmetros físicos avaliados se mostraram mais alterados no grupo G2 quando comparados aos demais.

Por meio da inspeção e palpação dos linfonodos (retrofaringeo, mandibular, parotídeo, cervical superficial, subilíaco e poplíteo) percebeu-se aumento do linfonodo cervical superficial em todos os grupos após a primeira inoculação dos imunógenos, ocorrendo com 24 horas no G2 (veneno bruto) e após 48 horas no G1 (PBS) e G3 (veneno detoxificado). Não se observou sensibilidade dolorosa à palpação ou consistência endurecida dos mesmos, bem como aderência a outros órgãos.

Quando analisadas separadamente cada etapa de imunização, detectou-se aumento dos linfonodos cervical superficial e/ou linfonodos subilíacos no grupo controle somente enquanto o adjuvante foi utilizado. O aumento do linfonodo pode ser explicado pelo uso do adjuvante de Freund, importante para indução da resposta imune do tipo MHC de classe II, porém com efeitos adversos como reação inflamatória local (Resende et al., 2004). Nos reforços verificou-se uma menor frequência de linfonodos reativos nos grupos venenos bruto e detoxificado, indicando que a própria imunogenicidade dos antígenos foi responsável por esta alteração.

O adjuvante de Freund pode produzir reações inflamatórias agudas e crônicas, abscessos estéreis e/ou necrose ulcerativa no ponto de inoculação (Silva e Pesgrave, 2008). No presente trabalho foram detectados em alguns animais abscessos no local da aplicação e, como se fez presente também no grupo controle exclui a ação do veneno total ou detoxificado (Figura 9).

Após a primeira inoculação já foi possível observar aumento de volume na região, com consequente abscedação ou não. Os reforços não foram marcados por estas alterações.

À inspeção, as mucosas ocular e oral apresentaram-se sempre úmidas, brilhantes, lisas e de coloração normal (rosadas) nos tempos avaliados. No entanto, Ribeiro et al. (2011) observaram mucosa congesta em um cão após envenenamento com *T. serrulatus*.

6.6) Eletrocardiograma (ECG)

Os traçados eletrocardiográficos demonstraram que o ritmo cardíaco foi sinusal em todos os animais inoculados, que não apresentaram alterações que caracterizassem arritmia. Não houve alteração na condução do impulso elétrico, ou seja, todos os ovinos apresentaram concordância átrio-ventricular, visualizada no ECG como complexo P-QRS-T.

Em relação ao complexo QRS, houve variação individual em todos os animais, mesmo no tempo zero, o que vai ao encontro com outros trabalhos (Schultz et al., 1972; Tório et al., 1997; Lago et al., 2009). Ocorreram ondas QR, QS e qR, normais para a espécie (Figuras 10, 11 e 12).



Figura 9: Ovino do grupo G3 apresentando abscesso no local de aplicação do veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* associado ao uso de adjuvante de Freund.

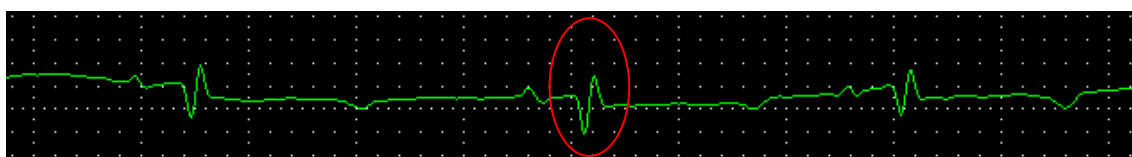


Figura 10: Complexo QR em ovino inoculado com veneno bruto ou detoxificado de *Tityus serrulatus*.

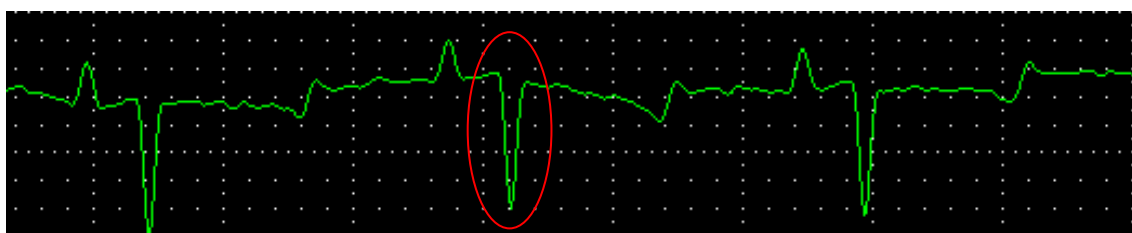


Figura 11 : Complexo QS em ovino inoculado com veneno bruto ou detoxificado de *Tityus serrulatus*.

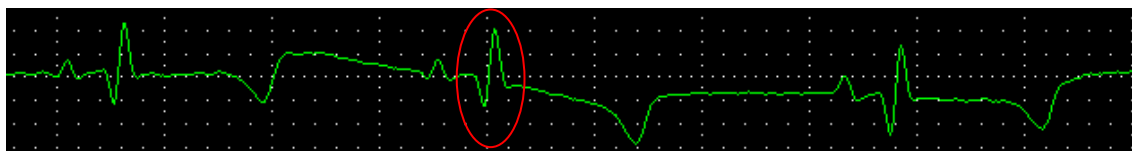


Figura12: Complexo qR em ovino inoculado com veneno bruto ou detoxificado de *Tityus serrulatus*.

Pinto et al. (2010) detectaram em ratos arritmia sinusal com discreta elevação da frequência cardíaca (FC), ritmo juncional, traçado sugestivo de silêncio sinusal, complexos atriás pré-maturos (extra-sístoles) e bloqueios átrio-ventriculares (BAV) de primeiro e segundo graus.

No envenenamento escorpiónico citam-se algumas alterações no traçado do eletrocardiograma, em função do desequilíbrio hidroeletrolítico, estímulo do sistema nervoso autônomo e miocardite (Ismail, 1995). Os principais achados eletrocardiográficos são taquicardia sinusal, com complexos ventriculares prematuros, depressão do segmento ST e bloqueio átrio-ventricular (Sakate, 2008; Pinto et al., 2010; Marcussi et al., 2011).

Crianças após picada de *T. serrulatus* foram monitoradas e avaliadas eletrocardiograficamente, sendo que em 100% dos casos ocorreu taquicardia sinusal. Algumas delas apresentaram infarto agudo do miocárdio, coincidindo com o aumento sérico de CK (Amaral et al., 1991). Além disso, o veneno desta espécie escorpiónica é capaz de aumentar a força

de contração do músculo cardíaco, por ação direta nos cardiomiócitos (Teixeira Júnior et al., 2001), o que não foi detectado no presente estudo.

6.7) Análises Laboratoriais

Objetivando-se melhor entendimento dos resultados laboratoriais, as análises serão apresentadas em forma de tabelas e gráficos, levando em consideração o tempo de imunização (seis imunizações totais) e o comportamento de cada variável ao longo de todo o processo.

6.7.1) Hematologia:

Os valores médios de Leucócitos totais (WBC), Hemácias (RBC), Hemoglobina (HGB), Hematócrito (VG) e Proteínas Totais (PT) dos ovinos inoculados com PBS (G1), Veneno Bruto (G2) e Veneno detoxificado com glutaraldeído (G3) de *Tityus serrulatus* se encontram na Tabela 9.

Tabela 9: Valores médios de leucócitos totais (WBC), hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (VG) e proteínas totais (PT) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus*.

Momentos		T0	1ª Imu.	24 h	48 h	2ª Imu.	24 h	48 h	3ª Imu.	24 h	48 h	4ª Imu.	24h	48 h	5ª Imu.	24 h	48 h	6ª Imu.	24 h	48 h
Parâmetros																				
WBCx 10 ³ /ml	G1	13,57	14,30	17,57	20,55	11,24	17,47	19,42	7,27	8,20	7,83	9,22	9,30	10,00	7,60	7,52	9,52	8,70	8,77	10,02
	G2	10,05	8,59	11,66	16,90	11,94	15,97	13,47	5,75	14,78	9,77	6,35	7,52	7,42	7,60	7,07	7,00	6,62	7,77	6,97
	G3	11,12	10,86	13,45	13,35	11,89	20,67	16,57	10,38	12,95	12,25	6,70	8,25	8,80	8,73	10,18	8,67	9,55	8,90	8,87
RBCx 10 ⁶ /ml	G1	14,85	14,32	14,25	15,20	15,97	16,80	16,65	12,56	12,51	14,54	11,95	13,02	15,88	12,40	12,67	12,50	11,43	11,28	11,70
	G2	16,92	18,20	17,57	16,77	17,10	15,92	15,40	13,80	13,72	13,15	12,83	12,14	12,08	14,29	11,37	13,29	12,23	11,86	12,06
	G3	17,42	17,50	16,15	17,92	16,52	15,17	16,42	15,99	13,35	13,56	14,02	14,55	13,07	12,79	13,24	12,71	12,65	12,34	11,78
HGB(g/dl)	G1	14,00	12,82	13,62	13,60	14,92	15,65	16,20	10,15	10,47	11,00	10,65	12,00	13,50	11,37	11,10	10,92	10,75	10,57	10,95
	G2	14,32	14,20	15,15	14,22	12,07	11,17	11,07	10,17	9,27	10,70	11,07	10,37	10,60	10,97	9,10	9,80	10,47	9,77	9,12
	G3	14,92	15,32	14,22	15,10	10,90	10,85	11,82	9,02	11,92	11,10	10,80	11,80	11,22	9,42	9,97	10,80	10,95	10,05	10,12
VG (%)	G1	30,25	31,00	33,5	32,75	35,00	37,75	36,25	35,50	33,25	34,00	32,25	33,50	31,75	32,50	31,50	32,50	30,50	30,25	30,25
	G2	33,75	33,75	34,00	33,50	36,25	34,50	33,25	34,00	32,50	31,75	31,50	29,25	29,50	32,00	27,75	32,00	29,75	28,00	26,50
	G3	33,75	34,25	33,00	35,25	36,00	32,50	35,50	33,25	33,25	33,00	31,00	32,50	31,25	32,00	28,50	30,75	31,00	29,75	28,50
PT(g/dl)	G1	6,75	6,75	6,90	6,90	6,80	6,75	6,80	6,60	7,00	6,75	6,70	7,25	6,95	6,75	7,10	6,85	6,90	7,00	6,95
	G2	7,00	7,05	6,95	7,10	7,30	7,40	7,15	7,35	7,25	7,55	7,50	7,25	7,15	7,10	7,50	7,60	7,20	7,20	7,20
	G3	6,95	7,35	6,95	6,95	6,85	6,6	7,05	6,45	6,65	7,10	7,10	7,60	7,15	7,05	7,20	7,50	6,85	6,90	6,90

6.7.1.1) Contagem total de Leucócitos

Os valores totais de leucócitos se encontram na tabela 10 e gráfico 10.

Tabela 10: Contagem total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	13,57	14,30 ^{Ab}	17,57 ^{AB}	20,55 ^B
G2-Veneno	10,05	8,59 ^{Aa}	11,66 ^B	16,90 ^C
G3-Detoxificado	11,12	10,86 ^{ab}	13,45	13,35
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	13,57	11,24 ^A	17,47 ^B	19,42 ^B
G2-Veneno	10,05	11,94 ^A	15,97 ^B	13,47 ^{AB}
G3-Detoxificado	11,12	11,89 ^A	20,67 ^B	16,57 ^B
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	13,57*	7,27 ^{ab}	8,20 ^a	7,83
G2-Veneno	10,05	5,75 ^{Aa}	14,78 ^{Bb}	9,77 ^C
G3-Detoxificado	11,12	10,38 ^b	12,95 ^{ab}	12,25
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	13,57	9,22	9,3	10,00
G2-Veneno	10,05	6,35	7,52	7,42
G3-Detoxificado	11,12	6,70	8,25	8,80
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	13,57*	7,60	7,52	9,52
G2-Veneno	10,05	7,60	7,07	7,00
G3-Detoxificado	11,12	8,73	10,18	8,67
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	13,57	8,70	8,77	10,02
G2-Veneno	10,05	6,62	7,77	6,97
G3-Detoxificado	11,12	9,55	8,90	8,87

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias marcadas com * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

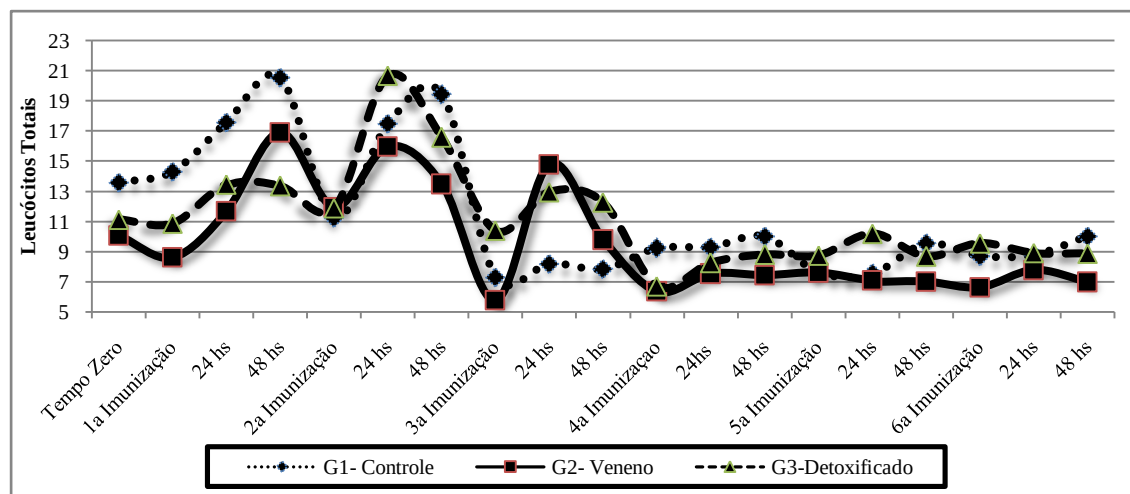


Gráfico 10: Valores de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

Apesar de estar descrita na literatura a ocorrência de leucocitose em acidentes escorpionicos (Cupo e Hering, 2002), observada também no presente estudo, esta possivelmente não seja decorrente do veneno, já que, o aumento de leucócitos também foi verificado no G1 (controle).

Os valores de normalidade estabelecidos no tempo zero para os ovinos se encontram

dentro de uma faixa de 7.000-16.000 células/ μL , portanto, houve aumento significativo ($P < 0,05$) nas 1ª e 2ª imunizações. É possível observar uma elevação dos valores de leucócitos no G1 (controle) na 1ª imunização (24-48 h) e também no G2 (veneno bruto) (48 h). Vinte e quatro horas após a 2ª imunização verificou-se leucocitose no G1 e G3, o que exclui relação com ação do veneno de *T. serrulatus*. Outro mecanismo de leucocitose é o estresse, que

maximiza a descarga de adrenalina e desprendimento de leucócitos do *pool* marginal dos vasos sanguíneos (Jain, 1993).

Verificou-se, portanto, uma leucocitose em algumas etapas do protocolo de imunização em que os animais foram submetidos. Essa leucocitose poderia ser fisiológica, pelo estresse de manejo dos animais. O que chama atenção é que essa alteração não foi percebida a partir da 3ª imunização, ou seja, nos *boosters* (4ª, 5ª e 6ª imunizações) quando não mais era aplicado o adjuvante de Freund (apenas PBS). Surge então, outra hipótese: a ação irritante local do adjuvante de Freund, corroborada pela presença dos abscessos.

Mas, deve ser ressaltado que leucocitose em decorrência do envenenamento escorpiónico

foi verificada em cães (Ribeiro et al., 2009). O veneno de *T. serrulatus* induz reações inflamatórias sistêmicas e localizadas com envolvimento de interleucinas, cininas e aminas bioativas (Pessini et al, 2006; Pessini et al, 2008), levando ao recrutamento de neutrófilos do compartimento marginal para a circulação. Inclusive, Coelho et al. (2007) demonstraram que o edema pulmonar, comum em acidentes escorpiónicos, ocorre em associação com grande influxo de neutrófilos.

6.7.1.2) Contagem diferencial de leucócitos

Os resultados da contagem diferencial de leucócitos encontram-se nas tabelas e gráficos 11 a 14.

Tabela 11: Valores médios de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,72	6,97	9,28	12,23
G2- Veneno	5,51	3,59 ^A	6,91 ^{AB}	8,45 ^B
G3-Detoxif.	4,14	5,63	7,68	7,64
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,72	5,20	8,09	7,88
G2- Veneno	5,51	6,01 ^A	10,28 ^B	7,71 ^{AB}
G3-Detoxif.	4,14	6,86 ^A	12,47 ^B	10,95 ^B
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,72	3,45	3,12 ^a	3,49
G2- Veneno	5,51	2,99 ^A	11,36 ^{Bb}	6,20 ^A
G3-Detoxif.	4,14	5,87	8,55 ^{ab}	7,68
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,72	3,88	3,89	4,30
G2- Veneno	5,51	2,82 ^A	4,02 ^{AB}	4,27 ^B
G3-Detoxif.	4,14	3,40	4,60	3,99
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,72	2,60	2,92 ^a	3,73
G2- Veneno	5,51	4,55	4,40 ^{ab}	4,20
G3-Detoxif.	4,14	4,50	5,86 ^b	5,22
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,72	3,36	3,63	3,80 ^a
G2- Veneno	5,51	3,61 ^A	4,54 ^B	3,86 ^{AB}
G3-Detoxif.	4,14	5,08 ^B	4,86 ^A	4,88 ^{AB}

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

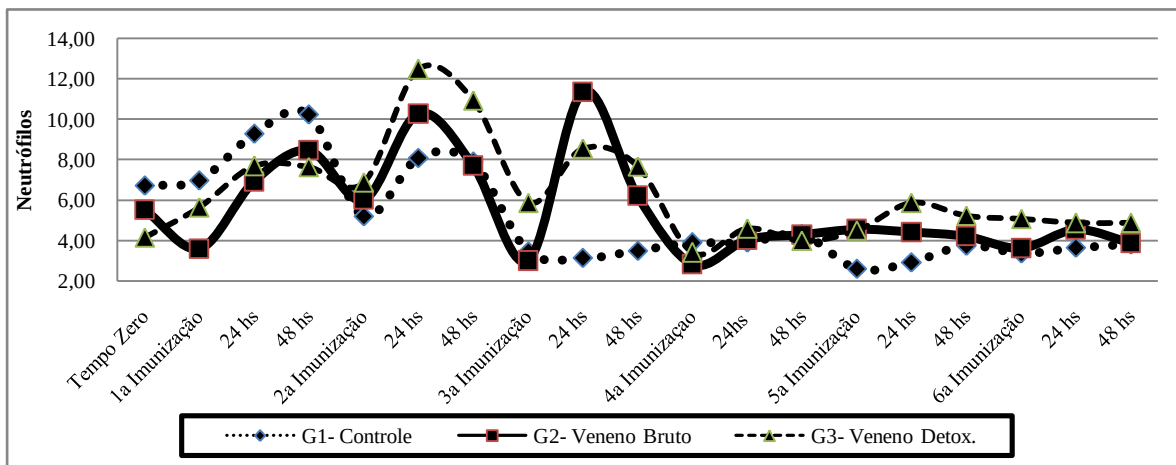


Gráfico 11: Comportamento de neutrófilos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

Levando em consideração os valores de normalidade determinados no tempo zero ($3,4 - 10,4 \times 10^3/\mu\text{l}$) verifica-se aumento de neutrófilos segmentados na coleta 48 h após a 1ª imunização ($12,23 \times 10^3/\mu\text{l}$) no G1 (controle), coincidindo com o aumento do número total de leucócitos. Como a neutrofilia ocorreu no grupo inoculado com PBS, não há relação com ação do veneno escorpionico, fortalecendo as idéias de leucocitose fisiológica e ação do adjuvante de Freund.

Na segunda imunização, momento 24 horas, houve aumento significativo ($P < 0,05$) de neutrófilos ($12,47 \times 10^3/\mu\text{l}$) no G3 (veneno detoxificado) sendo responsável pela leucocitose observada ($20,67 \times 10^3/\mu\text{l}$).

A principal causa de neutrofilia absoluta e relativa em pequenos ruminantes é o estresse, que inibe a marginação e a diapedese, ocasionando o aumento da quantidade de neutrófilos na corrente sanguínea (Pugh, 2002), como observado nos momentos anteriormente citados.

Na contagem de neutrófilos foram encontrados raros neutrófilos jovens (bastonetes) em alguns esfregaços em todos os grupos inoculados durante o protocolo de imunização e também do tempo zero dos animais. Entretanto, é normal haver uma pequena quantidade destas células sanguíneas no sangue (Thrall, 2007).

Após a visualização dos resultados no gráfico 11, é possível verificar comportamento de picos de neutrófilos dos três grupos na 1ª, 2ª e 3ª imunizações. Possivelmente, estes picos sejam decorrentes da ação inflamatória do adjuvante de Freund. Na 4ª, 5ª e 6ª imunizações, quando foram realizados os reforços e não mais utilizado o adjuvante de Freund, os valores tendem a diminuir e a ficarem mais homogêneos.

Quando se comparam os valores de linfócitos antes do início das imunizações, tempo zero, ($1,56 - 8,88 \times 10^3/\mu\text{l}$), percebe-se uma diminuição significativa nas 3ª, 4ª, 5ª e 6ª imunizações quando comparadas ao tempo zero. Entretanto, os valores permaneceram dentro dos limites fisiológicos (Tabela 12).

Tabela 12: Valores médios de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,10	6,15	6,86	7,45
G2- Veneno	4,00	4,57 ^{AB}	3,88 ^A	7,59 ^B
G3-Detoxif.	6,44	4,09	4,86	4,50
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,10	4,73 ^A	7,99 ^{AB}	10,18 ^{Bb}
G2- Veneno	4,00	4,53	5,12	4,29 ^a
G3-Detoxif.	6,44	4,06	6,17	4,65 ^a
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,10 [*]	3,62	4,67 ^b	3,79
G2- Veneno	4,00 [*]	2,20	2,65 ^a	2,95
G3-Detoxif.	6,44 [*]	3,44	3,88 ^{ab}	4,12
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,10 [*]	4,38	5,10	5,23 ^b
G2- Veneno	4,00 [*]	3,09	2,75	2,34 ^a
G3-Detoxif.	6,44 [*]	2,80 ^A	3,03 ^{AB}	4,44 ^{Bab}
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,10 [*]	4,83	3,83	4,79
G2- Veneno	4,00 [*]	2,62	1,86	1,99
G3-Detoxif.	6,44 [*]	3,70	3,76	3,20
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	6,10 [*]	4,55	4,43 ^b	4,74
G2- Veneno	4,00 [*]	2,79	2,93 ^a	2,90
G3-Detoxif.	6,44 [*]	4,19	3,85 ^{ab}	3,66

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

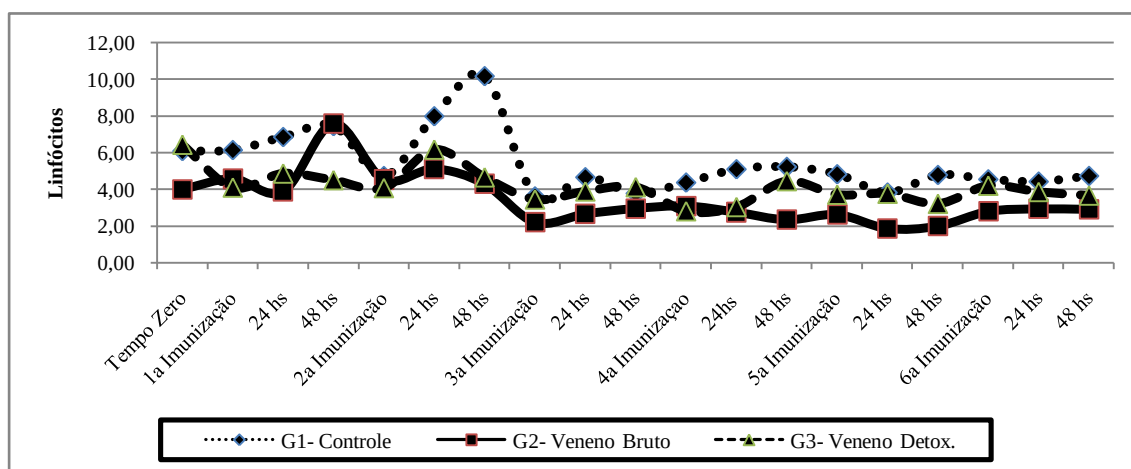


Gráfico 12: Comportamento de linfócitos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

Sabe-se que linfopenia é importante componente da resposta ao estresse dos ovinos (Pugh, 2002), o que poderia explicar a redução dos valores, apesar de continuarem dentro de parâmetros referenciais. Essa diminuição possivelmente foi responsável pela redução dos leucócitos totais nestes mesmos momentos, embora não tenha sido significativa.

Os valores absolutos de linfócitos estão em sua grande maioria dentro da normalidade, com exceção da coleta realizada às 48 horas na 2ª imunização do G1 (controle) ($10,18 \times 10^3/\mu\text{l}$), responsável pela leucocitose, o que possibilita excluir relação com o veneno escorpiónico. Estes resultados não apresentam significado clínico, sendo uma resposta inespecífica (Gráfico 12).

Tabela 13: Valores médios de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,65	0,85	1,00
G2- Veneno	0,41	0,34	0,63	0,66
G3-Detoxif.	0,42	0,84	0,70	0,68
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28*	0,76	1,05	0,86
G2- Veneno	0,41*	1,03	0,53	0,50
G3-Detoxif.	0,42*	0,78	1,01	0,70
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,16 ^A	0,35 ^{AB}	0,42 ^B
G2- Veneno	0,41	0,29	0,36	0,31
G3-Detoxif.	0,42	0,80 ^B	0,23 ^{AB}	0,16 ^A
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,85 ^{Bb}	0,14 ^A	0,31 ^A
G2- Veneno	0,41	0,21 ^a	0,45	0,63
G3-Detoxif.	0,42	0,35 ^a	0,52	0,31
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,06 ^A	0,37 ^B	0,57 ^B
G2- Veneno	0,41	0,22	0,39	0,33
G3-Detoxif.	0,42	0,42	0,34	0,25
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,69 ^A	0,61 ^A	1,28 ^{Bb}
G2- Veneno	0,41	0,18	0,16	0,19 ^a
G3-Detoxif.	0,42	0,28	0,15	0,25 ^a

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

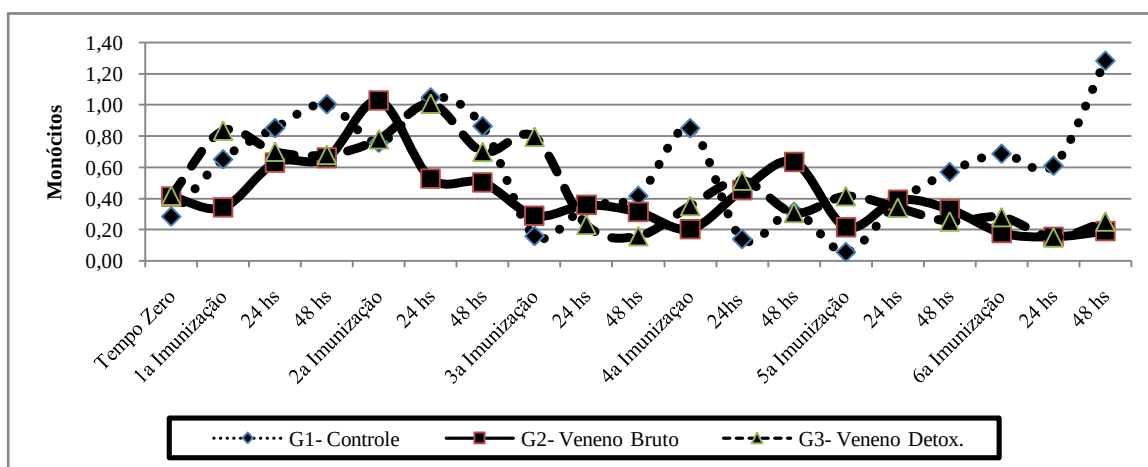


Gráfico 13: Comportamento de monócitos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

Os valores de normalidade de monócitos (tempo zero) estabelecidos para os ovinos imunizados foram de 0,5 a 0,73 $\times 10^3/\mu\text{l}$. Houve aumento significativo nos três grupos ($P < 0,05$) destas células na 2ª imunização, quando comparado aos valores basais, o que não teve relação alguma com o veneno.

A monocitose pode indicar inflamação crônica ou estresse em pequenos ruminantes

(Pugh, 2002). Como vários animais apresentaram abscessos nos locais de inoculação independentemente do grupo estudado (1, 2 ou 3), atribui-se, portanto, à ação do adjuvante de Freund, em função de uma resposta de hipersensibilidade do tipo retardada.

Tabela 14: Valores médios de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,43	0,29	0,35	0,41
G2- Veneno	0,17	0,17	0,23	0,34
G3-Detoxif.	0,22	0,22	0,27	0,27
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,43	0,22	0,35	0,39
G2- Veneno	0,17	0,24	0,32	0,27
G3-Detoxif.	0,22	0,24	0,41	0,33
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,43	0,15 ^a	0,16	0,16
G2- Veneno	0,17	0,12 ^a	0,30	0,20
G3-Detoxif.	0,22	0,21 ^b	0,26	0,25
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,43	0,18	0,19	0,20
G2- Veneno	0,17	0,13	0,15	0,15
G3-Detoxif.	0,22	0,13	0,17	0,18
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,43	0,15	0,15	0,19
G2- Veneno	0,17	0,15	0,14	0,14
G3-Detoxif.	0,22	0,17	0,20	0,17
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,43	0,17	0,18	0,20
G2- Veneno	0,17	0,13	0,16	0,14
G3-Detoxif.	0,22	0,19	0,18	0,18

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas ao teste de Kruskal-Wallis com $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas ao teste de Kruskal-Wallis.

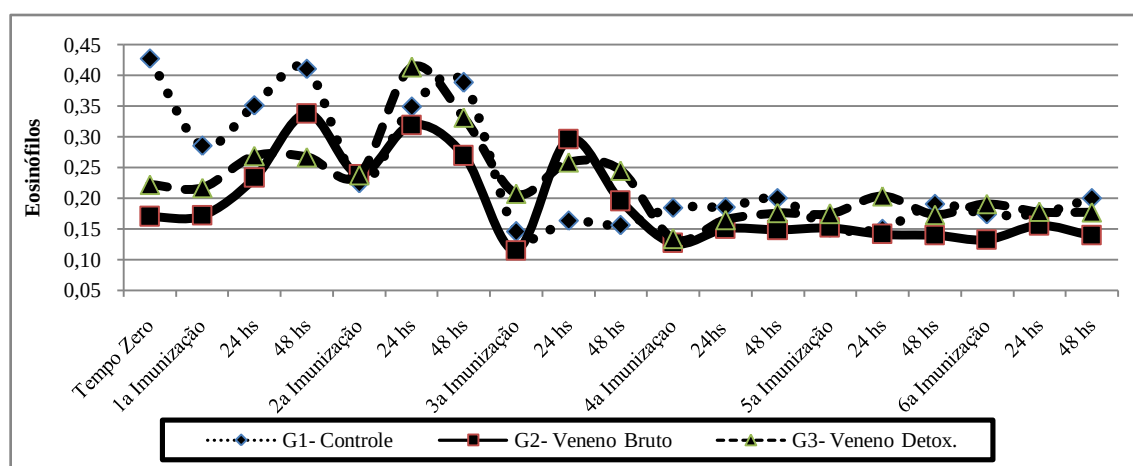


Gráfico 14: Comportamento de eosinófilos dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

Os valores de normalidade para eosinófilos estabelecidos no tempo zero foram de $0,17-0,69 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Tabela 14). Percebe-se um comportamento semelhante aos neutrófilos nas três primeiras imunizações. Estas células estão associadas com reações alérgicas inflamatórias e de imunocomplexos (Thrall, 2007).

Após a aplicação dos reforços, os valores diminuem com uma tendência de

estabilização, sugerindo mais uma vez a ação irritante local do adjuvante de Freund.

6.7.1.3) Contagem total de eritrócitos

A contagem total de eritrócitos nos ovinos imunizados com veneno escorpiónico encontra-se na tabela e gráfico 15.

Tabela 15: Contagem de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14,85	14,32 ^a	14,25	15,2
G2-Veneno	16,92	18,2 ^b	17,57	16,77
G3-Detoxificado	17,42	17,5 ^{ab}	16,15	17,92
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14,85	15,97	16,8	16,65
G2-Veneno	16,92	17,1	15,92	15,4
G3-Detoxificado	17,42	16,52	15,17	16,42
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14,85	12,56 ^{Aa}	12,51 ^A	14,54 ^B
G2-Veneno	16,92	13,80 ^{ab}	13,72	13,15
G3-Detoxificado	17,42	15,99 ^{Ab}	13,35 ^B	13,56 ^B
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14,85*	11,95 ^A	13,02 ^A	15,88 ^{Bb}
G2-Veneno	16,92*	12,83	12,14	12,08 ^a
G3-Detoxificado	17,42*	14,02	14,55	13,07 ^{ab}
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14,85	12,40	12,67	12,50
G2-Veneno	16,92	14,29 ^B	11,37 ^A	13,29 ^B
G3-Detoxificado	17,42*	12,79	13,24	12,71
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14,85*	11,43	11,28	11,70
G2-Veneno	16,92*	12,23	11,86	12,06
G3-Detoxificado	17,42*	12,65	12,34	11,78

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

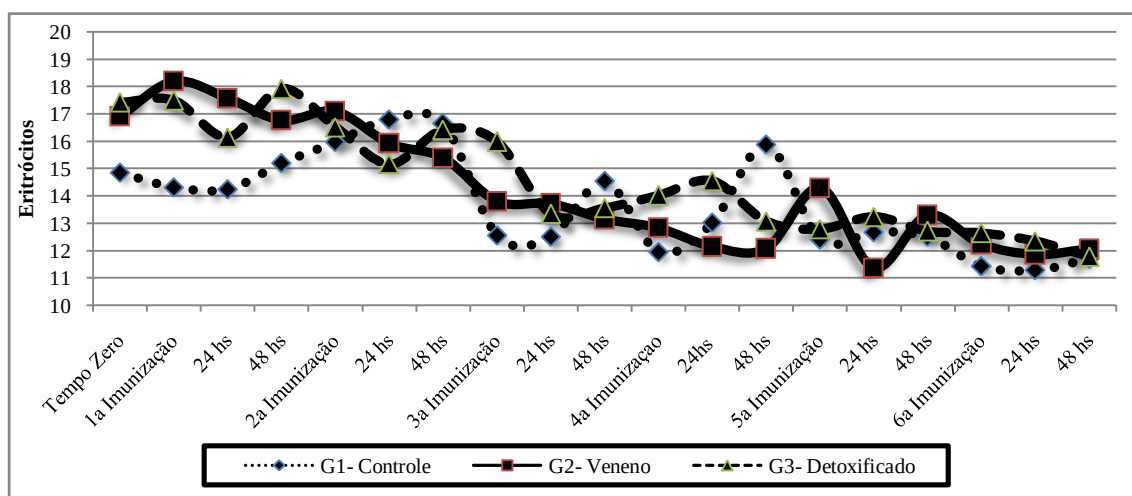


Gráfico 15: Contagem de eritrócitos ($\times 10^6$ células/ μL) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

Os valores de normalidade para concentração de hemácias variaram de 11 a 19 $\times 10^6$ células/ μL . Observa-se que durante toda imunização os valores se encontraram dentro dos limites de referência estabelecidos anteriormente. Apesar da diferença significativa ($P < 0,05$) entre o tempo zero e as 4^a, 5^a e 6^a imunizações, na maioria dos grupos, os valores continuaram dentro dos limites, sem significado clínico importante.

Todavia, percebe-se uma tendência de redução do número de hemácias em todos os animais dos três grupos estudados ao longo do protocolo de imunização, principalmente na

aplicação dos reforços. Uma possível explicação para este fato é que coletas de sangue eram feitas diariamente, num volume de aproximadamente 10 ml/dia.

Diferente do observado neste estudo, em cães e ratos, o veneno de *T. serrulatus* foi capaz de causar uma policitemia relativa, em função da contração esplênica provocada pela dor, ou pela desidratação (Ribeiro et al., 2009; Cusinato et al., 2010). Os valores encontrados no presente estudo já eram esperados, uma vez que o veneno escorpiónico não causa anemia, hemólise, lesões vasculares ou interferência na medula óssea.

6.7.1.4) Concentração de hemoglobina

Tabela 16: Concentração sanguínea de hemoglobina (g/dl) em ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14	12,82	13,62	13,60
G2-Veneno	14,32	14,20	15,15	14,22
G3-Detoxificado	14,92	15,32	14,22	15,10
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14	14,92 ^b	15,65 ^b	16,20 ^b
G2-Veneno	14,32	12,07 ^a	11,17 ^a	11,07 ^a
G3-Detoxificado	14,92	10,90 ^a	10,85 ^a	11,82 ^a
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14 [*]	10,15	10,47	11,00
G2-Veneno	14,32 [*]	10,17 ^{AB}	9,27 ^A	10,70 ^B
G3-Detoxificado	14,92 [*]	9,02 ^A	11,92 ^B	11,10 ^B
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14 [*]	10,65 ^A	12,00 ^A	13,50 ^{Bb}
G2-Veneno	14,32 [*]	11,07	10,37	10,60 ^a
G3-Detoxificado	14,92 [*]	10,80	11,80	11,22 ^a
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14 [*]	11,37	11,10 ^a	10,92
G2-Veneno	14,32 [*]	10,97	9,10 ^a	9,80
G3-Detoxificado	14,92 [*]	9,42 ^A	9,97 ^{ABb}	10,8 ^B
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	14 [*]	10,75	10,57	10,95
G2-Veneno	14,32 [*]	10,47 ^B	9,77 ^{AB}	9,12 ^A
G3-Detoxificado	14,92 [*]	10,95	10,05	10,12

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

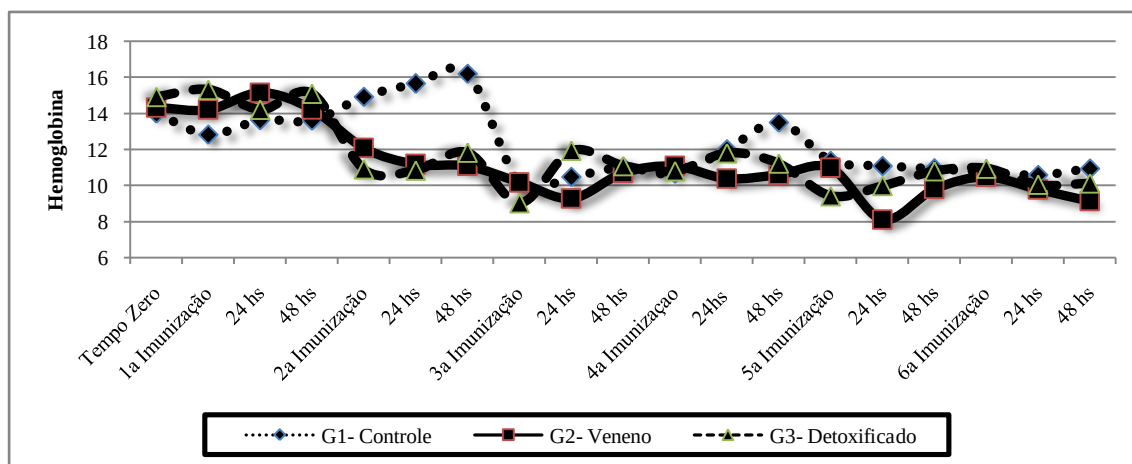


Gráfico 16: Valores sanguíneos de hemoglobina (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

Os valores estabelecidos para a concentração de hemoglobina no tempo zero dos animais foi de 9 a 15 g/dl. Dessa forma, durante as imunizações, os valores observados se mantiveram dentro da normalidade e assumiram o mesmo comportamento do número de hemácias (tabela e gráfico 16), ou seja, houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$), mas sem

efeito clínico uma vez que continuaram dentro da faixa de normalidade para a espécie.

6.7.1.5) Volume Globular

Os valores médios do volume globular dos ovinos ao longo do protocolo de imunização encontram-se na tabela e gráfico 17.

Tabela 17: Valores do volume globular (%) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	30,25	31,0	33,5	32,7
G2-Veneno	33,75	33,7	34,0	33,5
G3-Detoxificado	33,75	34,2	33,0	35,2
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	30,25	35,0	37,7	36,2
G2-Veneno	33,75	36,2	34,5	33,2
G3-Detoxificado	33,75	36,0	32,5	35,5
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	30,25	35,5	33,2	34,0
G2-Veneno	33,75	34,0	32,5	31,7
G3-Detoxificado	33,75	33,2	33,2	33,0
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	30,25	32,2	33,5	31,7
G2-Veneno	33,75	31,5	29,2	29,5
G3-Detoxificado	33,75	31,0	32,5	31,2
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	30,25	32,5	31,5	32,5
G2-Veneno	33,75	32,0 ^B	27,7 ^A	32,0 ^B
G3-Detoxificado	33,75	32,0	28,5	30,7
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	30,25	30,5	30,2	30,2
G2-Veneno	33,75	29,7	28,0	26,5
G3-Detoxificado	33,75	31,0	29,7	28,5

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

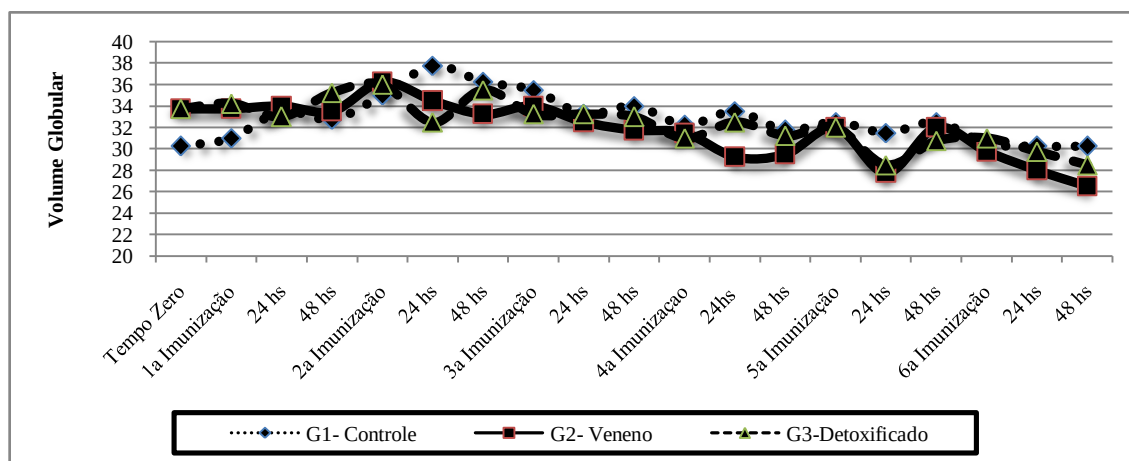


Gráfico 17: Comportamento dos valores médios do volume globular (%) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus*.

Os valores de volume globular dos animais antes das imunizações (tempo zero) situaram entre 26 a 37%. Assim, durante toda a execução do protocolo de imunização não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos nos diferentes tempos de coleta.

O volume globular representa a porcentagem do sangue total composta por eritrócitos. Existem situações, já descritas, em que os valores podem estar aumentados, tais como desidratação com perdas de líquido do organismo. Neste caso, a concentração plasmática de proteínas também deve estar aumentada. Além disso, amostras colhidas em condições de estresse ou excitação também podem favorecer o aumento do volume globular, uma vez que o estímulo adrenérgico ocasiona

contração esplênica e subsequente liberação de eritrócitos na corrente circulatória (Thrall, 2007), fatos não observados no presente estudo, uma vez que o VG e a concentração plasmática de proteínas não se alteraram.

Em outros envenenamentos, como o crotálico, houve redução dos valores do volume globular em equinos submetidos a protocolos de imunização para produção de antiveneno (Parra et al., 2009).

6.7.1.6) Contagem Total de plaquetas

A contagem de plaquetas não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos em nenhum momento avaliado. Todos os valores médios encontrados (Tabela 18) se

enquadram dentro da margem de referência para a espécie ovina, determinada no tempo zero e

semelhante ao descrito na literatura (Pugh, 2002; Thrall, 2007, Kaneco, 2008).

Tabela 18: Valores médios de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	421	455	434	418
G2- Veneno	521	556	492	433
G3-Detoxif.	581	445	479	533
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	421	440	404	438
G2- Veneno	521	525	431	439
G3-Detoxif.	581	507	497	505
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	421	502	553	463
G2- Veneno	521	520	504	482
G3-Detoxif.	581	472	521	471
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	421	388	488	555
G2- Veneno	521	448	564	490
G3-Detoxif.	581	474	572	520
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	421	401	611	599
G2- Veneno	521	490	520	502
G3-Detoxif.	581	532	531	545
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	421	414	518	500
G2- Veneno	521	491	551	551
G3-Detoxif.	581	546	504	535

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tempos de coleta (linhas) e entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

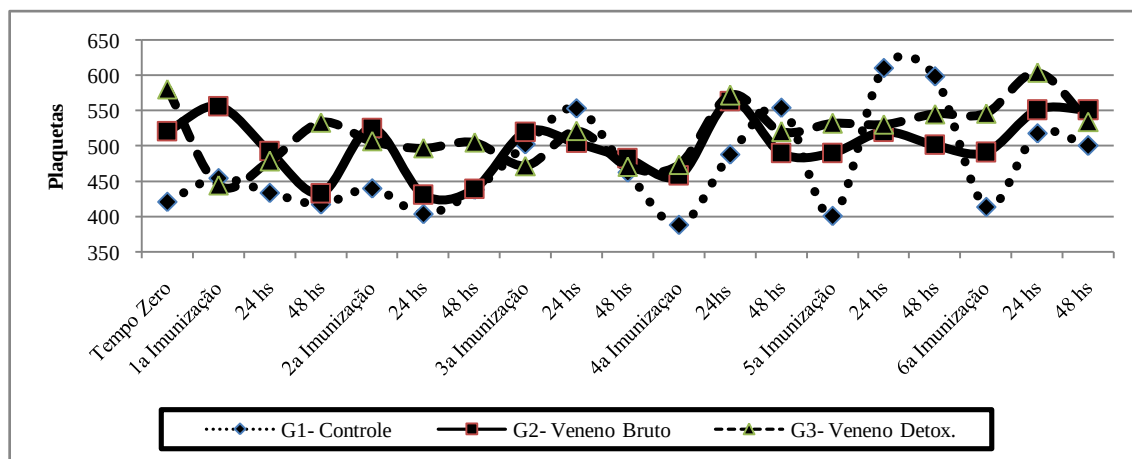


Gráfico 18: Comportamento de plaquetas dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

Apesar de não haver diferença significativa, houve diminuição gradativa dos valores médios plaquetários nas 4^a, 5^a e 6^a imunizações, seguindo o mesmo padrão de comportamento dos eritrócitos e concentração de hemoglobina. Provavelmente isso ocorreu em função das coletas de sangue em intervalos curtos. Portanto, o veneno de *T. serrulatus*, bruto ou detoxificado, não foi capaz de alterar a contagem total de plaquetas em ovinos imunizados, corroborando com os achados em cães (Ribeiro et al., 2010). Pinto et al. (2010),

observaram hemorragias pulmonares em ratos após envenenamento experimental por *T. fasciolatus* levando à redução na contagem de plaquetas, em função do seu consumo.

6.7.2) Bioquímica Sanguínea

6.7.2.1) Proteínas plasmáticas totais

As concentrações de proteínas plasmáticas totais (PT) estão representadas na tabela e gráfico19. Não houve diferença

estatística ($P>0,05$) entre o tempo zero dos animais e as seis imunizações, estando os valores

médios dentro dos limites de normalidade para a espécie ovina (6,4-7,9 g/dl).

Tabela 19: Valores plasmáticos de proteínas totais (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	6,7	6,7	6,9	6,9
G2-Veneno	7,0	7,0	6,9	7,1
G3-Detoxificado	6,9	7,3	6,9	6,9
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	6,7	6,8	6,7 ^{ab}	6,8
G2-Veneno	7,0	7,3	7,4 ^b	7,1
G3-Detoxificado	6,9	6,8	6,6 ^a	7,0
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	6,7	6,6 ^a	7,0	6,7
G2-Veneno	7,0	7,3 ^b	7,2	7,5
G3-Detoxificado	6,9	6,4 ^{Aa}	6,6 ^{AB}	7,1 ^B
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	6,7	6,7 ^a	7,2	6,9
G2-Veneno	7,0	7,5 ^b	7,2	7,1
G3-Detoxificado	6,9	7,1 ^{ab}	7,6	7,1
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	6,7	6,7	7,1	6,8
G2-Veneno	7,0	7,1	7,5	7,6
G3-Detoxificado	6,9	7,0	7,2	7,5
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	6,7	6,9	7,0	6,9
G2-Veneno	7,0	7,2	7,2	7,2
G3-Detoxificado	6,9	6,8	6,9	6,9

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

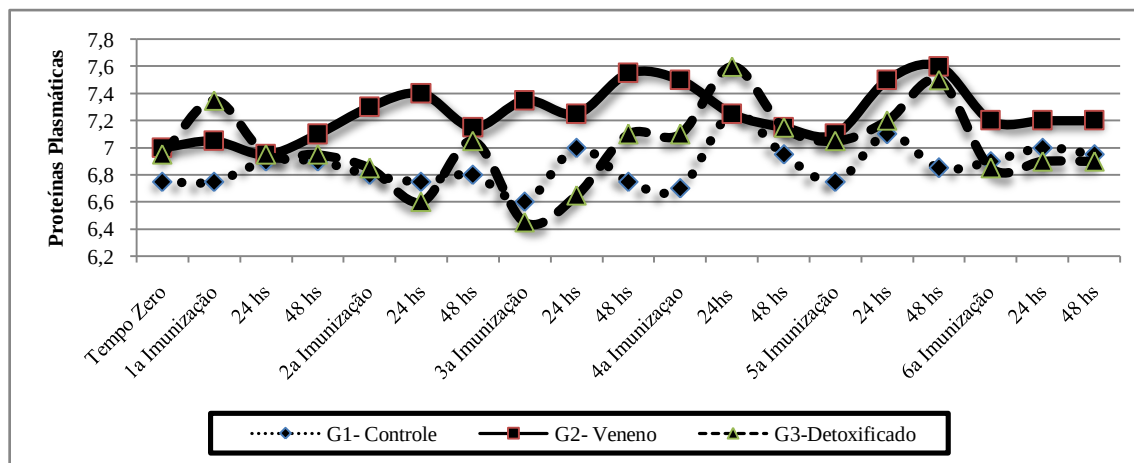


Gráfico19: Comportamento dos valores médios de proteínas plasmáticas totais (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus*.

De forma geral, durante todo o protocolo de imunização não houve diferença entre os valores obtidos de proteínas totais, ou seja, à medida que os animais eram imunizados os valores se mantiveram dentro da normalidade em todos os grupos.

Quando analisadas separadamente, houve diferença significativa ($P<0,05$) nas 2^a, 3^a e 4^a imunizações entre os grupos e/ou momentos de coleta, porém todos os valores estão dentro da faixa de referência para ovinos (6,4-7,9 g/dl).

Vinte e quatro horas depois da 2^a aplicação dos imunógenos houve diferença significativa na concentração de proteínas totais entre o G3 (veneno bruto) e G2 (detoxificado). Entretanto, não houve diferença estatística desses grupos com o G1 (controle).

Na 3^a imunização houve tendência de aumento de proteínas totais no G3 ao longo das coletas, porém os valores se mantiveram dentro da normalidade.

Após a inoculação de veneno de outras espécies de escorpiões (*Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus amorexi* e *Buthotus judaicus*) em cobaios, foi detectado aumento de proteínas totais, em função da hemoconcentração (Ismail e Abd-Elsalam, 1988). De forma semelhante, após a injeção do veneno de *T. serrulatus* em camundongos (Guimarães et al., 2009) e ratos (Pinto et al., 2010) também foi relatado aumentos das proteínas totais.

Cusinato et al. (2010), também observaram aumento das proteínas totais, especialmente de $\alpha 1$ e $\alpha 2$ globulinas num período de 2 a 24 horas após o envenenamento, enquanto a fração γ -globulina permaneceu inalterada. O aumento de albumina ocorreu em função da desidratação e hemoconcentração, compatíveis com os sinais clínicos apresentados (salivação, lacrimejamento, aumento da micção e diarreia) e elevação dos valores do volume globular.

As proteínas plasmáticas estão envolvidas em múltiplas funções, tais como manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue, transporte de substâncias (nutrientes, hormônios, metabólitos), regulação do pH e coagulação do sangue. Sua síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional

do animal e com a funcionalidade hepática (González e Scheffer, 2003).

A concentração das proteínas totais pode ser afetada por alterações de síntese hepática, desidratação ou superidratação. Reflete na verdade, o estado de hidratação do animal, ou seja, quando ocorre um aumento das proteínas plasmáticas por deficiência relativa de água, todas as frações, albumina e globulinas aumentam aproximadamente na mesma proporção. Quando o motivo do aumento não for por desidratação, apenas as frações globulinas aumentam enquanto a albumina se mantém inalterada ou diminui (Kaneko, 2008).

6.7.2.2) Proteínas plasmáticas fracionadas (Proteinograma)

O traçado eletroforético das proteínas plasmáticas dos ovinos revelou cinco bandas distintas: albumina, α - globulina, $\beta 1$ -globulina, $\beta 2$ -globulina e γ - globulinas (Figuras 9 e 10). O traçado observado se assemelha aos de Silva et al. (2010), que determinaram o perfil protéico fracionado de cordeiros mestiços saudáveis, do nascimento ao desmame e, Piccione et al. (2012), que avaliaram o perfil protéico fracionado de ovelhas em diferentes fases fisiológicas (gestação, pós-parto, lactação e período seco) e Alberghina et al. (2012), que trabalharam com cabras adultas híginas.

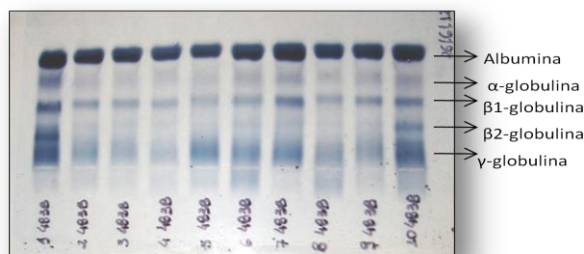


Figura 13: Gel de agarose demonstrando o fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas dos ovinos. Notar a formação de cinco bandas distintas

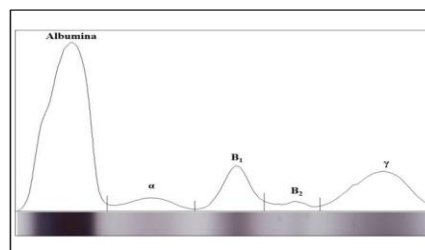


Figura 14: Perfil eletroforético demonstrando as cinco frações protéicas do plasma de ovinos

O perfil fracionado das proteínas plasmáticas totais foi determinado, para verificação das concentrações de albumina e globulinas (α , β e γ) e a relação albumina/globulina (A/G). Ele sugere a ocorrência de processos inflamatórios agudos e crônicos, disfunções hepáticas, perdas protéicas, síndromes nefróticas e outras alterações que ajudam no entendimento da resposta imunológica (Naoum, 1990). Assim, a eletroforese representa um importante auxílio ao diagnóstico e prognóstico clínico (Eckersall, 2008), além de monitorar a resposta do organismo à terapia (Eckersall e Bell, 2010).

As tabelas e gráficos a seguir apresentam os valores médios de cada fração encontrada no proteinograma dos animais dos grupos 1, 2 e 3. Como na literatura não são muitos os trabalhos com proteinograma em ovinos híginos, com idade semelhante aos animais do presente estudo, utilizou-se como referência os valores encontrados nos animais antes das imunizações, ou seja, determinou-se intervalo de valores para cada fração no chamado tempo zero.

Tabela 20: Concentração plasmática de albumina (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	5,08 ^B	5,02 ^{Bb}	3,32 ^A
G2- Veneno	4,14*	5,31 ^C	4,41 ^{Bab}	3,07 ^A
G3-Detoxif.	4,12*	5,51 ^B	3,97 ^{Ba}	3,34 ^A
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10	3,65	3,94	3,00
G2- Veneno	4,14	4,43 ^B	3,94 ^{AB}	2,92 ^A
G3-Detoxif.	4,12	3,94	3,38	2,82
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	2,73	2,65	2,93
G2- Veneno	4,14*	2,85	2,75	2,91
G3-Detoxif.	4,12*	3,11	3,40	2,81
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10	3,94 ^B	3,91 ^B	3,20 ^A
G2- Veneno	4,14	3,71	3,14	3,45
G3-Detoxif.	4,12	3,29	3,38	3,57
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	3,48	3,59	3,39
G2- Veneno	4,14*	3,18	3,18	3,48
G3-Detoxif.	4,12*	3,31	3,18	3,24
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	3,89 ^{AB}	3,50 ^A	4,49 ^B
G2- Veneno	4,14*	2,91 ^A	2,94 ^A	4,28 ^B
G3-Detoxif.	4,12*	3,46 ^{AB}	2,79 ^A	3,88 ^B

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

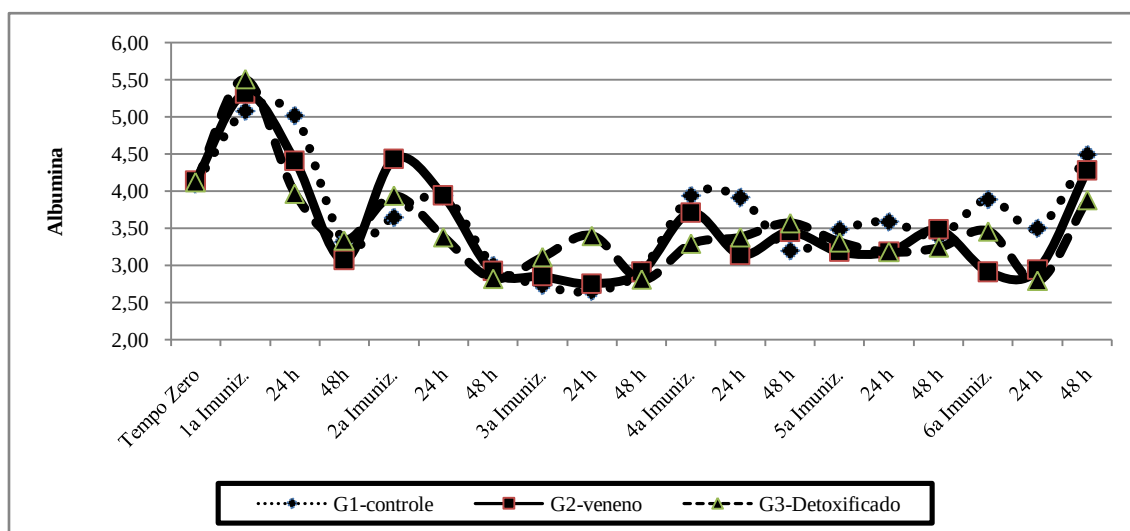


Gráfico 20: Comportamento dos valores médios de albumina (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

A concentração sérica de albumina variou de 3,41 a 4,86 g/dl, com um valor médio de 4,12 g/dl no tempo zero dos animais. Verifica-se que a maioria dos valores encontrados durante todo o protocolo de imunização (Tabela 20), permaneceu dentro dos limites, com exceção da 1ª e 3ª imunização. Dessa forma, na 1ª imunização houve aumento significativo ($P < 0,05$) de albumina nos três grupos, o que exclui relação com veneno escorpiónico, uma vez que o G1 (controle) seguiu o mesmo padrão de resposta. Entretanto, esse aumento não

apresenta significado importante, uma vez que em 24-48 horas os valores já se encontravam dentro de limites normais.

Cães que receberam uma única dose de veneno de *T. serrulatus* (250 µg/kg) também não apresentaram alterações na fração albumina em seu proteinograma (Ribeiro e Melo, 2012), comportamento semelhante ao observado em ratos após envenenamento experimental por *T. serrulatus* (Pinto et al., 2010).

A 3ª imunização foi marcada por redução significativa ($P < 0,05$) dos valores de albumina

em todos os tempos avaliados e em todos os grupos. A redução dessa proteína está relacionada com doenças hepáticas, gastrointestinais, má nutrição dos animais, perda de sangue ou plasma (Eckersall, 2008), o que não ocorreu nos animais do presente estudo, uma vez que se encontravam clinicamente saudáveis. Uma possível explicação para a hipoalbuminemia é a diminuição da produção como resultado de resposta inflamatória aguda, uma vez que a albumina é considerada proteína de fase aguda negativa e sua concentração

diminui nas respostas inflamatórias (Ingenbleek e Young, 1994; Murata et al., 2004).

As 5ª e 6ª imunizações também foram marcadas por diminuição significativa da albumina em relação ao tempo zero em todos os grupos, embora alguns valores tenham permanecido dentro dos limites de referência. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os grupos que receberam veneno bruto e detoxificado com o controle e, à medida que o protocolo de imunização avançava os valores de albumina se normalizaram em todos os grupos.

Tabela 21: Concentração plasmática de α -globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,15 ^A	0,27 ^{AB}	0,39 ^B
G2- Veneno	0,31	0,24 ^A	0,31 ^{AB}	0,37 ^B
G3-Detoxif.	0,34	0,26	0,37	0,36
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,37 ^{AB}	0,22 ^A	0,51 ^B
G2- Veneno	0,31	0,21 ^A	0,32 ^A	0,55 ^B
G3-Detoxif.	0,34	0,21 ^A	0,29 ^A	0,58 ^B
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28 [*]	0,57	0,66 ^b	0,56
G2- Veneno	0,31 [*]	0,62	0,52 ^{ab}	0,56
G3-Detoxif.	0,34 [*]	0,46	0,42 ^a	0,65
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,25 ^A	0,27 ^A	0,42 ^{Bb}
G2- Veneno	0,31	0,21 ^{AB}	0,29 ^B	0,21 ^{Aa}
G3-Detoxif.	0,34	0,18 ^A	0,24 ^{AB}	0,28 ^{Bab}
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,36	0,39	0,40
G2- Veneno	0,31	0,26	0,41	0,32
G3-Detoxif.	0,34	0,29	0,40	0,35
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,41	0,44	0,42
G2- Veneno	0,31	0,36	0,33	0,37
G3-Detoxif.	0,34	0,31	0,42	0,42

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

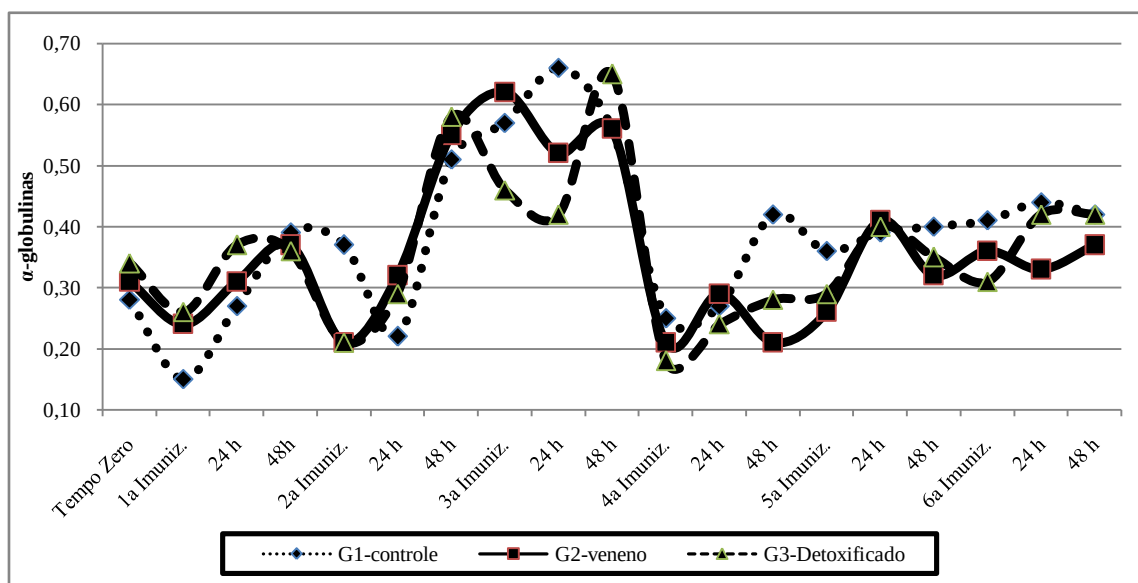


Gráfico 21: Comportamento dos valores médios de α -globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

A concentração sérica de α -globulinas variou de 0,14 a 0,54 g/dl, com média de 0,31 g/dl no tempo zero dos animais. A Tabela 21 mostra o aumento significativo ($P<0,05$) da concentração de α -globulinas na 3ª imunização e seus respectivos tempos de coleta (24-48h), com valores acima da normalidade nos três grupos, excluindo alguma relação com o veneno escorpiônico. Possivelmente o aumento desta fração protéica foi decorrente da resposta inflamatória gerada pela própria aplicação dos imunógenos com adjuvante de Freund.

O processo inflamatório induz a síntese e liberação de proteínas séricas a partir do aumento de citocinas como interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral pelos macrófagos. A fração α -globulina é composta por uma série de proteínas de fase aguda postivas, como glicoproteína ácida α_1 , ceruloplasmina, antitripsina α_1 , antitripsina α_1 , α_2 macroglobulina e haptoglobina α , esta

última considerada uma das principais proteínas de fase aguda em ovinos e bovinos, podendo aumentar em até 100 vezes sua concentração depois do estímulo (González et al., 2007; Eckersall, 2008).

Portanto, o aumento desta fração no perfil proteico dos ovinos imunizados possivelmente foi em função da elevação de uma dessas proteínas de fase aguda positiva citada anteriormente, uma vez que também coincidiu com a redução da concentração sérica da albumina, proteína de fase aguda negativa. Mas, não podemos descartar a ação do veneno escorpiônico, pois Meki e El-Dean (1998), demonstraram aumento de α_1 -antitripsina nos acidentes escorpiônicos em humanos e sua relação com gravidade da sintomatologia clínica.

A fração β -globulinas se subdividiu em β_1 e β_2 globulinas no proteinograma dos ovinos imunizados e serão apresentadas separadamente, como demonstrados nas tabelas abaixo.

Tabela 22: Concentração plasmática de β_1 -globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62*	0,43 ^A	0,51 ^{Aa}	0,83 ^B
G2- Veneno	0,73*	0,41	0,64 ^{ab}	0,75
G3-Detoxif.	0,63*	0,51 ^A	0,84 ^{Bb}	0,67 ^{AB}
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,85	0,69 ^{ab}	0,97
G2- Veneno	0,73	0,76	0,98 ^b	0,86
G3-Detoxif.	0,63	0,82	0,54 ^a	0,83
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,86	1,02 ^b	0,91
G2- Veneno	0,73	0,87	0,84 ^{ab}	0,90
G3-Detoxif.	0,63	0,70 ^A	0,67 ^{Aa}	0,92 ^B
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,59 ^A	0,78 ^B	0,81 ^{Bb}
G2- Veneno	0,73	0,51	0,69	0,55 ^a
G3-Detoxif.	0,63	0,56	0,65	0,59 ^a
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,71	0,77	0,71
G2- Veneno	0,73	0,56 ^A	0,79 ^B	0,68 ^{AB}
G3-Detoxif.	0,63	0,59	0,67	0,76
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,65	0,75	0,62
G2- Veneno	0,73	0,69	0,71	0,60
G3-Detoxif.	0,63	0,53	0,75	0,71

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

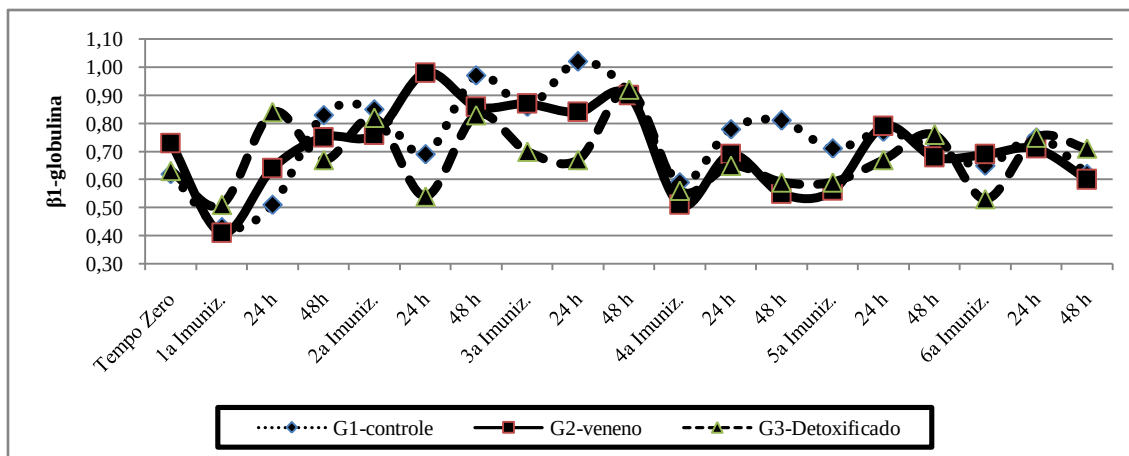


Gráfico 22: Comportamento dos valores médios de β_1 -globulina (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

No tempo zero os valores mínimo e máximo da fração β_1 foram 0,44 e 1,05 g/dl respectivamente, com média de 0,66 g/dl. Tomando como referência esses valores, pode-se observar que houve diminuição desta fração protéica no dia da 1ª imunização, nos grupos controle (G1) e veneno bruto (G2), porém sem diferença significativa para o grupo veneno detoxificado (G3). Além disso, após 24h horas os valores já se encontravam dentro da

normalidade, ou seja, não houve alterações significativas desta fração no proteinograma dos ovinos imunizados, corroborando com Ribeiro e Melo (2012).

Guimarães et al. (2009) não observaram divisão na fração beta-globulina (β_1 e β_2) em camundongos submetidos à aplicação de veneno escorpiônico, embora sua concentração tenha aumentado oito horas após injeção do veneno de *T. fasciolatus* nestes animais.

Tabela 23: Concentração plasmática de β_2 -globulina (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41	0,46 ^A	0,29 ^A	1,24 ^B
G2- Veneno	0,25	0,40 ^A	0,51 ^A	1,57 ^B
G3-Detoxif.	0,45	0,18 ^A	0,35 ^A	1,42 ^B
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41	0,51 ^A	1,02 ^{ABab}	1,33 ^B
G2- Veneno	0,25	0,24 ^A	0,38 ^{Aa}	1,67 ^B
G3-Detoxif.	0,45	0,29 ^A	1,65 ^{Bb}	1,78 ^B
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	1,48	1,44	1,25
G2- Veneno	0,25*	1,57	1,64	1,76
G3-Detoxif.	0,45*	1,05	1,13	1,35
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	0,82 ^{Aa}	1,09 ^{AB}	1,28 ^B
G2- Veneno	0,25*	1,43 ^{ab}	1,51	1,41
G3-Detoxif.	0,45*	1,85 ^{ABb}	1,94 ^B	1,54 ^A
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	1,10	1,23	1,14
G2- Veneno	0,25*	1,50	1,52	1,31
G3-Detoxif.	0,45*	1,61	1,59	1,75
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	1,03 ^B	1,16 ^B	0,42 ^A
G2- Veneno	0,25*	1,46 ^B	1,61 ^B	0,28 ^A
G3-Detoxif.	0,45*	1,38 ^B	1,64 ^B	0,37 ^A

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

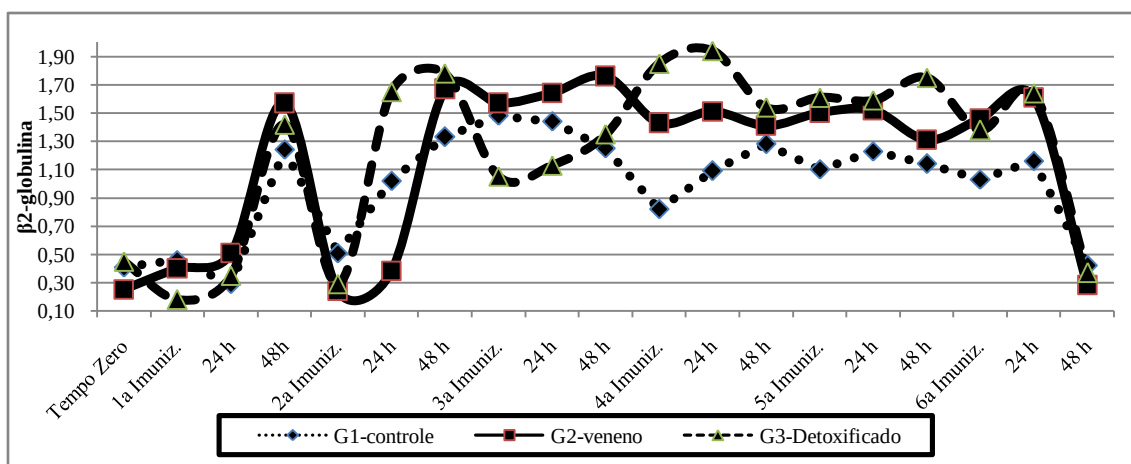


Gráfico 23: Comportamento dos valores médios de β_2 -globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

De acordo com a tabela 23, verifica-se aumento significativo desta fração em vários momentos de coleta no protocolo de imunização. Tomando como referência os valores de normalidade estabelecidos no tempo zero (0,19-0,85 g/dl), com média de 0,37 g/dl, percebe-se no momento 48 horas da 1ª imunização aumento abrupto nos três grupos (acima de 300 % do valor inicial), o que exclui ação do veneno escorpiónico, uma vez que o grupo controle se comportou da mesma forma que os outros dois.

Da 3ª a 6ª imunização houve elevada concentração da fração β_2 , com diferença significativa ($P < 0,05$) entre o valor basal e os dias das inoculações dos imunógenos. Possivelmente este aumento foi em decorrência do processo inflamatório gerado pelas imunizações, com elevação da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado. É sabido que existem inúmeras proteínas séricas na fração beta-globulina, tais como proteínas do complemento (C3 e C4), proteína C reativa, ferritina e fibrinogênio, todas estas proteínas, positivas de fase aguda (Jack, 2007; Thrall, 2007; Eckersall, 2008).

Em ruminantes o fibrinogênio é um importante indicativo da resposta inflamatória (González et al., 2007) e, como o proteinograma foi realizado com plasma, possivelmente o aumento encontrado nesta fração protéica foi em função da elevação dos valores deste elemento, não havendo relação com ação do veneno escorpiónico, o que difere de Bertazzi et al. (2003) que demonstraram em ratos o aumento da produção hepática de proteínas de fase aguda, sob ação nas vias do sistema complemento após inoculação do veneno de *T. serrulatus*.

Algumas imunoglobulinas, como IgM e IgA, podem se estender para a região das β -globulinas na eletroforese, especialmente quando há predomínio de IgM na resposta imune, acarretando aumento desta banda (Thrall, 2007). Esta possível explicação para o aumento desta fração protéica não se aplica a este estudo, uma vez que o grupo controle (G1) também foi marcado por aumentos significativos.

No último momento de coleta das amostras, a concentração plasmática de β_2 já havia retornado aos seus valores normais em todos os grupos (Gráfico 23).

Tabela 24: Concentração plasmática de γ -globulinas (g/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27 [*]	0,62	0,80	1,11
G2- Veneno	1,56 [*]	0,66 ^A	1,06 ^{AB}	1,32 ^B
G3-Detoxif.	1,49 [*]	0,88	1,39	1,13
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	1,30 ^B	0,86 ^{Aa}	0,99 ^{AB}
G2- Veneno	1,56	1,65 ^B	1,77 ^{Bb}	1,13 ^A
G3-Detoxif.	1,49	1,58 ^B	0,82 ^{Aa}	1,01 ^A
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	0,93	1,26	1,09
G2- Veneno	1,56	1,43	1,48	1,41
G3-Detoxif.	1,49	1,11	1,02	1,36
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	1,10	1,05	1,22
G2- Veneno	1,56	1,61	1,61	1,52
G3-Detoxif.	1,49	1,21	1,37	1,15
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	1,08	1,11	1,19
G2- Veneno	1,56	1,59	1,57	1,69
G3-Detoxif.	1,49	1,24	1,35	1,39
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	0,89 ^a	1,12	0,98
G2- Veneno	1,56	1,77 ^b	1,60	1,65
G3-Detoxif.	1,49	1,15 ^{Ab}	1,27 ^{AB}	1,51 ^B

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

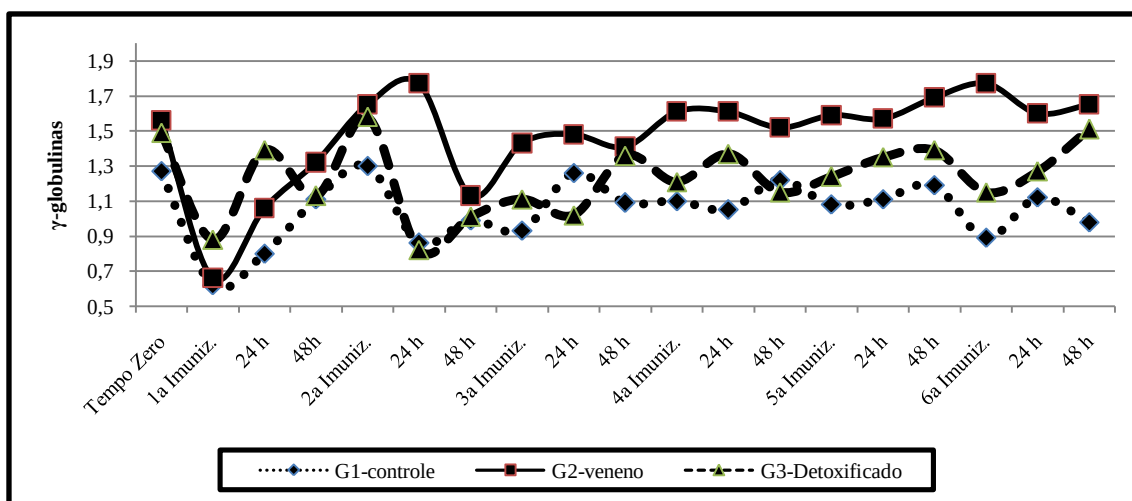


Gráfico 24: Comportamento dos valores médios de γ -globulinas (g/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

Levando-se em consideração o valor mínimo (0,80 g/dl) e máximo (2,76 g/dl) obtidos antes do início do protocolo de imunização, verifica-se redução significativa ($P < 0,05$) na fração γ -globulina entre o tempo zero e a primeira imunização. Entretanto, houve diminuição nos três grupos avaliados, o que exclui ação do veneno escorpionico e, como foi a 1ª inoculação, não teria tempo para uma resposta imune frente a este antígeno, o que pode ser

comprovado pelo retorno aos valores normais 24 horas após a imunização.

Na 6ª imunização, a fração γ -globulina apresentou diferença significativa entre os grupos que receberam veneno (G2 e G3) em relação ao grupo controle (G1), mas os valores permaneceram todos dentro do limite de referência para a espécie ovina. Sabe-se que a fração γ é formada por imunoglobulinas (IgA, IgM, IgE, IgD e IgG) e que na resposta primária frente a um antígeno há predomínio de IgM e na secundária IgG (Abbas et al., 1998; Janeway et al., 2002), embora no presente estudo não se

detectou aumento de imunoglobulinas no proteinograma até 48h após o último reforço.

Tabela 25: Relação albumina e globulinas do plasma de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	T0	1a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,68*	3,06 ^B	2,71 ^{Bb}	0,94 ^A
G2- Veneno	1,51*	3,09 ^B	2,17 ^{Bab}	0,77 ^A
G3-Detoxif.	1,52*	3,10 ^B	1,34 ^{Aa}	0,98 ^A
	T0	2a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,68	1,50	1,41	0,79
G2- Veneno	1,51	1,66	1,14	0,75
G3-Detoxif.	1,52	1,50	1,25	0,71
	T0	3a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,68*	0,79	0,61	0,77
G2- Veneno	1,51*	0,63	0,63	0,63
G3-Detoxif.	1,52*	1,02	1,09	0,67
	T0	4a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,68	1,44 ^{Bb}	1,23 ^B	0,86 ^A
G2- Veneno	1,51	1,02 ^{Aab}	0,82 ^A	0,94 ^A
G3-Detoxif.	1,52	0,91 ^{Aa}	0,82 ^A	1,03 ^A
	T0	5a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,68	1,11	1,03	1,06
G2- Veneno	1,51	0,81	0,88	0,86
G3-Detoxif.	1,52	1,04	0,86	0,82
	T0	6a Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,68	1,31 ^A	1,16 ^A	1,75 ^{Bb}
G2- Veneno	1,51	0,77 ^A	0,79 ^A	1,78 ^{Bab}
G3-Detoxif.	1,52	0,96	0,60	1,39 ^a

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

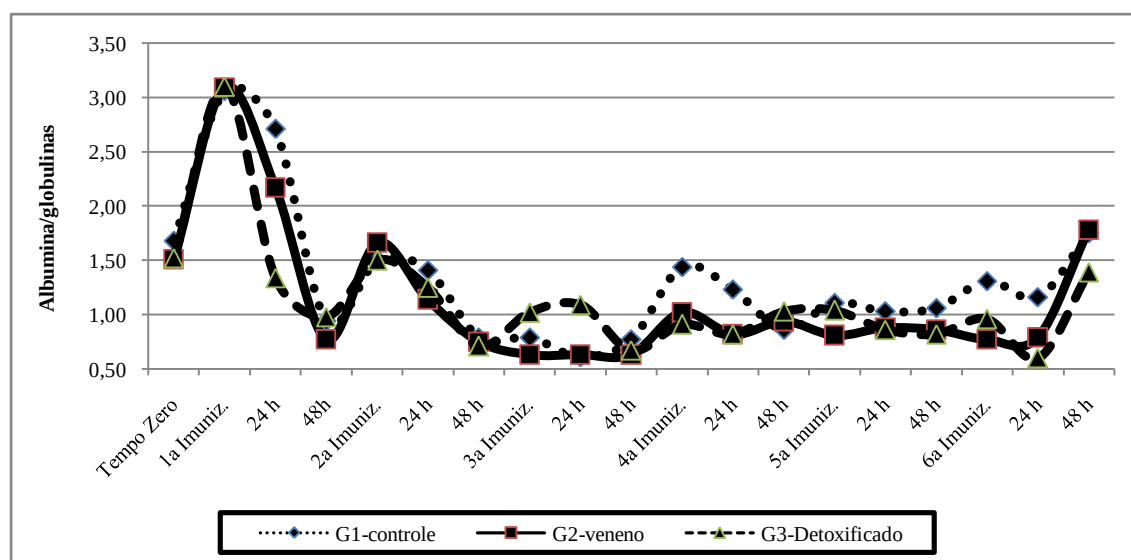


Gráfico 25: Comportamento da relação albumina/globulinas em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus* em diferentes tempos.

A proporção A/G em ovinos saudáveis é maior que 1,0 (Thrall, 2007). Neste estudo, considerando os valores no tempo zero (1,0 a 2,5), percebe-se através da tabela 25, o aumento significativo ($P < 0,05$) desta relação na 1ª imunização nos três grupos avaliados. De acordo com a literatura, isso pode ocorrer devido à diminuição das globulinas, em função do aumento da albumina.

A redução de A/G deu início 48 horas após a primeira inoculação, o que coincide com a elevação da concentração plasmática de β_2 -globulinas. Este padrão de comportamento foi visto em vários momentos do protocolo e, pode ser explicado pela resposta inflamatória advinda da imunização dos animais, em que há aumento de proteínas de fase aguda positiva que se encontram nesta fração e redução da albumina, uma vez que é considerada proteína de fase

aguda negativa (González et al., 2007; Eckersall, 2008). São relatadas outras causas de redução da relação A/G em função da hipoalbuminemia, por insuficiência hepática, parasitismo

gastrointestinal, má nutrição e doenças glomerulares (Jackson, 2007; Thrall, 2007), ausentes nestes animais.

Tabela 26: Valores médios de creatinina (mg/dl), CK total (U/L), LDH (U/L), amilase (U/L), GGT (U/L), AST (U/L), uréia (mg/dl) e glicose (mg/dl) dos ovinos inoculados com PBS (G1), veneno Bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Momentos Parâmetros		T0	1ª Imu.	24 h	48 h	2ª Imu.	24 h	48 h	3ª Imu.	24 h	48 h	4ª Imu.	24h	48 h	5ª Imu.	24 h	48 h	6ª Imu.	24 h	48 h
Creatinina (mg/dl)	G1	1,72	1,09	0,93	1,07	1,28	1,29	1,10	1,26	1,35	1,37	2,00	1,39	1,40	1,73	1,60	1,65	1,70	2,21	1,45
	G2	1,61	1,01	0,84	0,99	1,50	1,61	1,15	1,34	1,48	1,04	2,01	1,88	1,42	1,58	2,00	1,63	2,08	2,20	1,29
	G3	1,81	0,98	1,09	1,20	1,47	1,37	1,07	1,35	1,31	1,55	1,96	1,85	1,71	1,68	1,91	1,48	2,19	2,29	1,20
CK total (U/L)	G1	132,35	720,86	356,78	430,85	211,08	80,34	242,04	133,16	747,37	338,16	151,98	155,83	116,16	157,65	205,20	146,92	146,31	346,26	131,94
	G2	148,54	269,96	1076,63	357,59	234,14	149,75	59,09	115,55	164,33	156,23	178,09	157,65	242,64	368,72	207,03	159,87	305,99	173,84	115,96
	G3	193,67	138,22	468,49	103,21	101,79	99,36	65,16	144,69	135,18	102,20	218,56	310,44	146,31	139,84	103,21	154,81	216,74	120,81	65,77
LDH (U/L)	G1	226,35	585,36	244,88	264,11	376,74	657,51	444,67	768,13	1062,72	955,10	838,02	656,30	738,47	844,68	948,09	1387,86	1123,03	1192,37	1437,26
	G2	727,05	326,25	351,09	622,03	949,28	538,07	709,80	1298,39	1004,60	918,43	1123,24	993,57	883,36	972,94	1410,21	1054,50	1053,69	1341,67	1074,94
	G3	940,67	93,58	428,24	659,50	655,09	620,43	723,70	1585,16	1118,03	808,81	787,77	1070,52	1071,13	658,713	1125,24	1060,51	2044,67	1247,68	1173,34
Amilase (U/L)	G1	27,57	21,74	26,19	22,44	20,56	25,89	17,15	27,28	18,96	13,94	19,87	18,78	18,28	15,02	26,29	26,69	21,25	29,25	23,13
	G2	35,08	22,53	14,63	13,74	20,66	21,25	18,88	22,91	17,36	6,03	21,64	27,77	17,19	13,74	17,01	24,03	10,60	12,35	10,67
	G3	39,48	28,86	21,84	29,45	25,79	32,72	27,57	24,42	15,77	21,94	13,34	20,65	10,08	14,92	16,21	15,13	13,05	14,62	15,12
GGT (U/L)	G1	39,34	49,15	53,02	51,96	63,94	60,59	56,73	51,96	44,06	44,64	46,55	45,33	45,17	42,63	73,86	68,56	43,90	67,18	55,62
	G2	24,34	61,24	60,76	54,24	72,21	59,91	87,33	78,47	45,23	50,69	39,50	67,97	50,95	67,65	56,84	83,51	27,57	53,92	72,00
	G3	58,01	68,98	82,02	63,09	103,98	80,014	63,36	68,61	80,81	76,88	58,59	64,47	54,19	80,81	71,90	58,53	142,79	98,04	96,18
AST (U/L)	G1	100,13	127,58	124,92	127,58	79,96	101,65	90,52	68,61	107,29	120,99	92,62	69,96	84,72	328,90	136,57	96,81	86,03	135,95	125,14
	G2	85,50	103,75	104,27	135,00	132,34	113,35	94,15	65,64	61,28	117,94	140,42	86,86	84,59	132,65	120,90	153,86	109,34	202,22	189,83
	G3	87,86	115,93	139,02	90,22	140,07	163,59	91,22	99,65	84,41	151,07	113,53	97,94	99,30	110,08	151,68	108,29	137,32	188,29	255,39
Uréia (mg/dl)	G1	55,29	63,78	69,95	47,16	52,08	38,46	32,82	52,00	37,68	52,85	65,35	45,70	42,83	50,80	58,13	32,13	40,96	25,80	48,15
	G2	60,06	85,07	72,07	46,50	57,34	38,79	29,12	32,09	43,82	59,54	23,32	53,90	21,42	50,88	46,68	52,27	42,87	35,89	37,80
	G3	58,48	86,96	64,52	63,91	46,97	35,70	29,18	34,58	62,12	54,26	43,49	34,78	48,26	68,63	62,58	38,85	25,56	35,66	57,62
Glicose (mg/dl)	G1	77,07	73,00	84,22	93,95	80,07	95,07	96,82	94,22	94,90	94,87	112,87	114,10	115,72	133,20	144,12	146,52	140,35	145,70	147,37
	G2	89,45	80,55	85,55	91,52	85,87	93,10	87,77	84,32	95,97	94,77	113,30	113,57	115,35	140,20	144,57	144,77	144,375	143,85	147,40
	G3	72,60	65,45	66,02	85,87	93,22	90,72	94,40	92,52	96,70	97,52	114,10	113,65	114,32	139,00	143,82	143,50	143,87	145,75	147,35

6.7.2.3) Creatina quinase (CK)

A concentração da enzima creatina quinase se encontra na tabela 27 e gráfico 26.

Tabela 27: Concentração de creatina quinase (CK) Total em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	132,35 *	720,86 ^{Bb}	356,78 ^A	430,85 ^A
G2-Veneno	148,54	269,96 ^{ab}	1076,63	357,59
G3-Detoxificado	193,67	138,22 ^{Aa}	468,49 ^B	103,21 ^A
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	132,35	211,08	80,34	242,04
G2-Veneno	148,54	234,14 ^B	149,75 ^{AB}	59,09 ^A
G3-Detoxificado	193,67	101,79	99,36	65,16
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	132,35	133,16	147,58	338,16
G2-Veneno	148,54	115,55	164,33	156,23
G3-Detoxificado	193,67	144,69	135,18	102,2
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	132,35	151,98	155,83	116,16
G2-Veneno	148,54	178,09	157,65	242,64
G3-Detoxificado	193,67	218,56	310,44	146,31
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	132,35	157,65 ^{ab}	205,20	146,92
G2-Veneno	148,54	368,72 ^b	207,03	159,87
G3-Detoxificado	193,67	139,84 ^a	103,21	154,81
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	132,35	146,31	346,26	131,94
G2-Veneno	148,54	305,99	173,84	115,96
G3-Detoxificado	193,67	216,74 ^B	120,81 ^{AB}	65,77 ^A

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

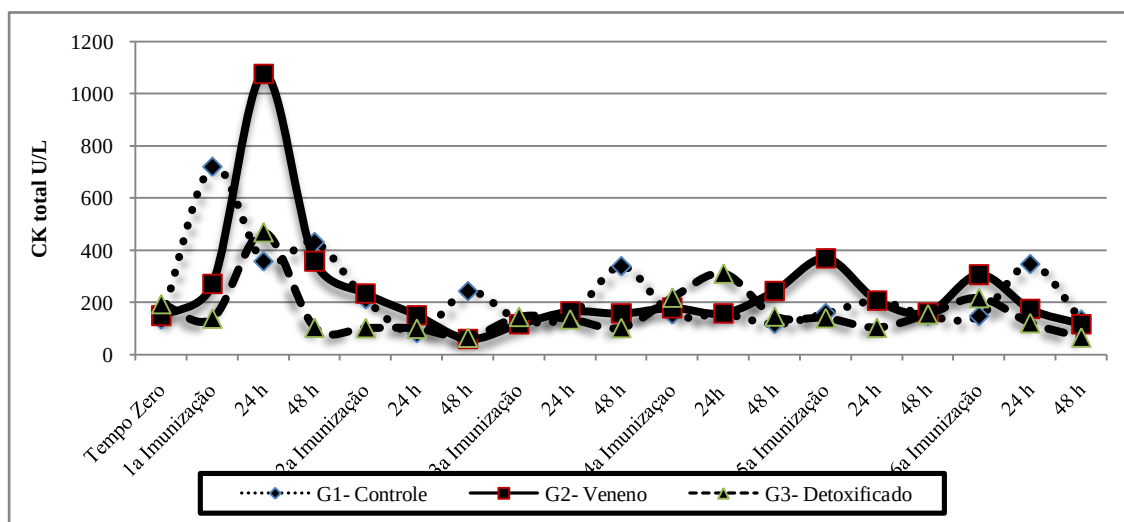


Gráfico 26: Comportamento dos valores médios de CK (U/L) Total em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos valores médios no tempo zero entre os grupos, sendo estabelecidos os parâmetros de normalidade para os ovinos (87-238U/L). Percebe-se o aumento expressivo dos valores de CK na 1ª imunização dos animais, demonstrado no gráfico 26 pelos picos de cada grupo em tempos distintos. Assim, o aumento no G1

ocorreu no dia da imunização, enquanto nos dois outros grupos após 24 horas.

O que chama atenção é que 24 h após a 1ª imunização todos os grupos apresentaram valores acima da normalidade, sendo que não houve diferença significativa com o grupo controle, possibilitando excluir a ação do veneno escorpiano.

A creatina quinase se mostrou mais instável nas três primeiras imunizações, com valores acima da normalidade inclusive no grupo controle. Na 4ª, 5ª e 6ª imunizações os valores obtidos foram mais homogêneos e o grupo que recebeu veneno detoxificado foi o que se manteve mais estável, o que pode ser percebido pela menor oscilação entre os valores no exame.

Esta enzima é produzida primariamente nas células musculares estriadas e, em alguma extensão, no cérebro. Suas isoenzimas são formadas por dois protômeros, M (músculo) ou B (cérebro). Assim, a CK-BB está presente no cérebro, a CK-MM, nos músculos esquelético e cardíaco e, a CK-MB principalmente no coração. Apenas os grandes aumentos nos níveis de CK têm significância clínica, pois injeções intramusculares, ferimentos e decúbito prolongado tendem a causar pequenos aumentos dessa enzima (Cardinet, 1997; Kramer e Hoffmann, 1997; Thompson, 1997).

O envenenamento escorpiónico pode causar danos ao miocárdio, resultando em aumento sérico da creatina quinase e sua isoenzima MB, fato comprovado em crianças

(Amaral et al., 1991), coelhos (Abdoon e Fatani, 2009) e ratos (Pinto et al., 2010). Entretanto, num estudo com camundongos (Guimarães et al., 2009) não foi evidenciada essa alteração, indo ao encontro com os resultados encontrados neste trabalho.

Lila e Fátima (2011) após inoculação de veneno escorpiónico detoxificado por radiação gama, observaram aumento sérico de CK e LDH em coelhos que receberam veneno bruto diferente dos animais que receberam veneno detoxificado (valores próximos ao controle), demonstrando a menor toxicidade desse veneno. No presente estudo não houve alterações significativas nos grupos que receberam veneno, tratado ou não.

6.7.2.4) Lactato Desidrogenase (LDH)

A Tabela 28 e gráfico 27 demonstram o comportamento da enzima lactato desidrogenase ao longo de todo protocolo de imunização dos ovinos.

Tabela 28: Valores séricos de LDH (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	226,35	585,36 ^{Bb}	244,88 ^A	264,11 ^A
G2-Veneno	727,05	326,25 ^{ab}	351,09	622,03
G3-Detoxificado	940,67*	93,58 ^{Aa}	428,24 ^B	659,50 ^B
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	226,35	376,74 ^a	657,51	444,67
G2-Veneno	727,05	949,28 ^b	538,07	709,80
G3-Detoxificado	940,67	655,09 ^{ab}	620,43	723,7
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	226,35*	768,1 ^a	1062,72	955,10
G2-Veneno	727,05	1298,39 ^{ab}	1004,60	918,43
G3-Detoxificado	940,67	1585,16 ^{Bb}	1118,03 ^{AB}	808,81 ^A
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	226,35*	838,02	656,30	738,47
G2-Veneno	727,05	1123,24	993,57	883,36
G3-Detoxificado	940,67	787,77	1070,52	1071,13
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	226,35*	844,68 ^A	948,09 ^{AB}	1387,86 ^B
G2-Veneno	727,05	972,94	1410,21	1054,50
G3-Detoxificado	940,67	658,71 ^A	1125,24 ^B	1060,51 ^{AB}
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G2-Veneno	226,35*	1123,03 ^a	1192,37	1437,26
G3-Detoxificado	727,05	1053,69 ^a	1341,67	1074,94
	940,67*	2044,67 ^{Ab}	1247,68 ^B	1173,34 ^B

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

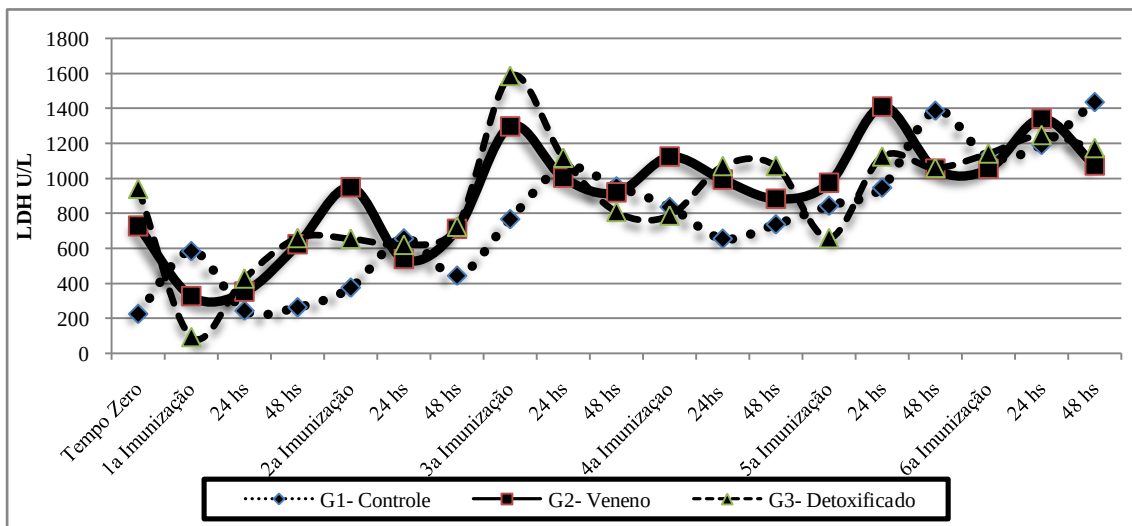


Gráfico 27: Comportamento dos valores médios de LDH (U/L) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

O comportamento da enzima lactato desidrogenase (LDH) neste estudo demonstrou muita oscilação entre os grupos nos diferentes tempos de coleta. Apesar da discrepância de valores no tempo zero entre os três grupos, não houve diferença significativa entre eles ($P < 0,05$). Pode-se destacar na tabela 28 e gráfico 27 o aumento significativo desta enzima principalmente no grupo controle a partir da 3ª imunização até a última, o que não foi detectado nos grupos tratados com veneno bruto e detoxificado. Dessa forma, esta elevação dos valores não se relaciona com ação do veneno, uma vez que se faz presente no grupo que recebeu PBS.

A enzima lactato desidrogenase catalisa a oxidação reversível de piruvato a L-lactato e possui uma série de isoenzimas presentes nos eritrócitos, hepatócitos, músculos e miocárdio. Devido ao fato destas isoenzimas terem ampla distribuição no organismo, o aumento sérico de LDH pode ser de difícil interpretação na medicina veterinária, o que necessita analisar os dados juntamente com outras enzimas, como a creatina-quinase (CK) para detecção de lesão muscular (González e Scheffer, 2003; Kaneco, 2008).

Qualquer intensidade de hemólise é prejudicial, pois o extravasamento de enzimas eritrocitárias incrementa a atividade total de LDH no plasma. Lesões musculares de etiologias variadas podem se relacionar com o aumento desta enzima. Normalmente ocorre aumento mais

tardio que a CK, mas os valores permanecem elevados por mais tempo (González e Scheffer, 2003). Além disso, exercício prolongado e hepatopatias também podem elevar os valores desta enzima (Kaneco, 2008).

Na literatura citam-se valores plasmáticos de LDH ao redor de 200-300 U/L para a maioria das espécies. Entretanto, no presente trabalho os valores encontrados foram bem superiores, inclusive antes do início do protocolo de imunizações e permaneceram discrepantes ao longo de todo experimento. Através da avaliação da instabilidade da variável, obteve-se um coeficiente de variação (CV) de 27%, o que pode justificar as diferenças dos valores encontrados.

Relata-se aumento sérico de LDH após envenenamento por *T. serrulatus* em ratos (Pinto et al., 2010), todavia em camundongos (Guimarães et al., 2009) e cães (Ribeiro et al., 2010) não foi descrita tal alteração, o que vai ao encontro do resultado do presente trabalho.

O veneno de outra espécie (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) proporcionou o aumento sérico de LDH e CK em coelhos, indicando lesão muscular 6 horas após sua inoculação (Abdoon e Fatani, 2009).

6.7.2.5) Amilase

A concentração sanguínea da enzima amilase se encontra representada na Tabela 29 e Gráfico 28.

Tabela 29: Valores séricos de amilase (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	27,57	21,74	26,19	22,44
G2-Veneno	35,08	22,53	14,63	13,74
G3-Detoxificado	39,48	28,86	21,84	29,45
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	27,57	20,56	25,89	17,15
G2-Veneno	35,08	20,66	21,25	18,88
G3-Detoxificado	39,48	25,79	32,72	27,57
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	27,57	27,28	18,96	13,94 ^{ab}
G2-Veneno	35,08	22,91 ^B	17,36 ^B	6,03 ^{Aa}
G3-Detoxificado	39,48	24,42	15,77	21,94 ^b
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	27,57	19,87	18,78	18,28
G2-Veneno	35,08	21,64 ^{AB}	27,77 ^B	17,19 ^A
G3-Detoxificado	39,48	13,34	20,65	10,08
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	27,57	15,02	26,29	26,69
G2-Veneno	35,08	13,74	17,01	24,03
G3-Detoxificado	39,48	14,92	16,21	15,13
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	27,57	21,25	29,25	23,13
G2-Veneno	35,08 [*]	10,60	12,35	10,67
G3-Detoxificado	39,48	13,05	14,62	15,12

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com P<0,05.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com P<0,05.

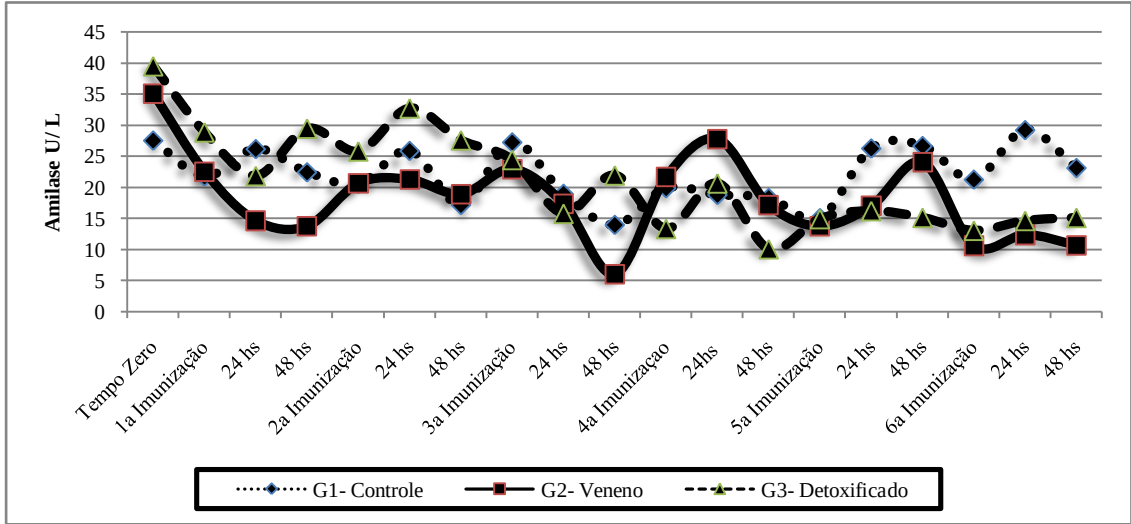


Gráfico 28: Comportamento dos valores médios de amilase (U/L) sérica em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Ao se analisar as concentrações de amilase e levando em consideração os limites de referência para pequenos ruminantes (12,1-37,1 U/l), verificou-se uma diminuição expressiva 48

horas após a 3ª imunização no G2 (veneno bruto), com retorno aos limites referenciados já na 4ª imunização dos animais.

Essa diferença foi significativa ($P < 0,05$) entre os grupos (G2 e G3) e também entre os diferentes tempos dentro do grupo veneno, porém não foi diferente do grupo controle, o que indica ausência de relação com o veneno escorpiónico.

Comparando-se os valores antes do início do experimento (tempo zero) com os dias das imunizações, só houve diferença significativa ($P < 0,05$) na 6ª imunização com o grupo que recebeu veneno bruto, com valor inferior ao referenciado para a espécie (10,6 U/l). Ao longo da imunização em questão não houve diferença no grupo, sendo que no momento 24 horas o valor se encontrava dentro da normalidade para a espécie.

Segundo Gonzáles e Scheffer (2002), a diminuição de amilase não é muito rara e se relaciona com frequência ao fornecimento de dietas pobres em amido aos animais. No caso do nosso trabalho a dieta dos animais além de ser balanceada e igual para todos os grupos, este padrão de resultado teria que se repetir nas outras imunizações também.

Na 4ª imunização pode-se observar diferença significativa na transição de 24-48 horas dentro do grupo veneno, demonstrando uma diminuição da amilase sérica que se manteve dentro dos valores de referência.

Estes resultados diferem da literatura, uma vez que se relata o aumento da amilase sérica em ratos (Novaes et al., 1982; Correa et al., 1997; Novaes et al., 2002; Pinto et al., 2010; Cusinato et al., 2010) e em camundongos (Guimarães et al., 2009), embora se assemelhe a Ribeiro et al. (2010) que também não observaram aumento sérico em cães após inoculação do veneno de *T. serrulatus*. Neste estudo não ficou definida a causa da diminuição da amilase pancreática.

A amilase é uma enzima produzida pelo pâncreas exócrino e outros tecidos, cuja função é catalisar a hidrólise do amido e glicogênio para

formação de maltose e glicose. É uma enzima dependente de cálcio e que apresenta meia vida alta, motivo pelo qual a margem de referência para suas concentrações plasmáticas é muito ampla. Seu aumento está relacionado com a inflamação do pâncreas, que pode ser causado por diferentes fatores tais como obstrução de canalículos, doenças infecciosas e isquemia (Kramer e Hoffmann, 1997). Cita-se ainda hiperamilasemia em decorrência de insuficiência renal, obstrução urinária, desidratação e diminuição do débito urinário, além de enfermidades hepáticas (Colville, 2005).

No escorpionismo, a ocorrência de pancreatite é relatada sem, contudo, ser elucidado o seu mecanismo. Há indícios da ação direta do veneno sobre o sistema nervoso autônomo, favorecendo a abertura de canais de sódio e liberação de mediadores químicos. Assim, ocorre estímulo direto no sistema gastrointestinal e aumento da secreção exócrina pancreática, além de edema e pancreatite aguda em função da liberação de citocinas e histaminas pela degranulação de mastócitos (Novaes et al., 2002).

Nos ovinos deste experimento, a regularidade das concentrações de amilase indica que não houve estímulo pancreático para o aumento de sua secreção exócrina, ou seja, como não houve diferença de valores entre os grupos tratados com o grupo controle, pode-se afirmar que as repetidas doses de veneno de *T. serrulatus*, na sua forma total ou detoxificada, não provocaram efeito significativo sobre o pâncreas, no que diz respeito à liberação de amilase.

6.7.2.6) Gama-glutamyltransferase (GGT)

Os valores séricos da gama-glutamyltransferase se encontram na Tabela 30 e Gráfico 29:

Tabela30: Valores séricos de GGT (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	39,34	49,15	53,02	51,96
G2-Veneno	24,34*	61,24	60,76	54,24
G3-Detoxificado	58,01	68,98	82,02	63,09
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	39,34	63,94	60,59	56,73
G2-Veneno	24,34*	72,21	59,91	87,33
G3-Detoxificado	58,01	103,98 ^B	80,01 ^{AB}	63,36 ^A
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	39,34	51,96	44,06	44,64
G2-Veneno	24,34*	78,47 ^B	45,23 ^A	50,69 ^B
G3-Detoxificado	58,01	68,61	80,81	76,88
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	39,34	46,55	45,33	45,17
G2-Veneno	24,34	39,50 ^A	67,97 ^B	50,95 ^{AB}
G3-Detoxificado	58,01	58,59	64,47	54,19
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	39,34	42,63 ^A	73,86 ^B	68,56 ^B
G2-Veneno	24,34*	67,65 ^{AB}	56,84 ^A	83,51 ^B
G3-Detoxificado	58,01	80,81	71,90	58,53
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	39,34	43,90 ^{Aa}	67,18 ^B	55,62 ^{AB}
G2-Veneno	24,34	27,57 ^{Aa}	53,92 ^B	72,00 ^B
G3-Detoxificado	58,01	142,79 ^b	98,04	96,18

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

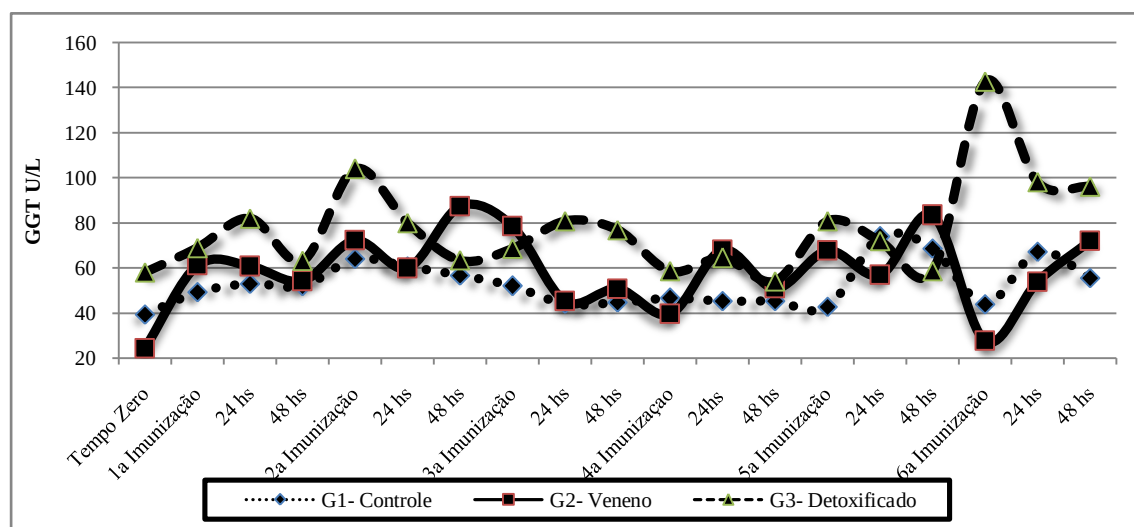


Gráfico 29: Comportamento dos valores médios de GGT (U/L) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Foi realizada dosagem sérica de GGT para avaliar a função hepática dos animais (especialmente obliteração de ductos biliares), uma vez que o fígado por ser órgão primário ao metabolismo e detoxificação, está sujeito a injúrias (Colville, 2005).

Os valores médios de GGT entre os grupos experimentais foram estatisticamente distintos ($P<0,05$) antes mesmo do início da aplicação das imunizações (tempo zero). Não houve diferença entre os grupos tratados e o

grupo controle, entretanto, no G3 os valores séricos para esta enzima foi superior. O valor de normalidade foi estabelecido entre 24-92 U/L.

No decorrer do protocolo de aplicação dos imunógenos o que chama atenção é que houve aumento significativo ($P<0,05$) de GGT no G2 (veneno bruto) nas 1ª, 2ª, 3ª e 5ª imunizações quando comparados aos valores obtidos no tempo zero. Todavia, os valores ainda permaneceram dentro da faixa de normalidade para os animais e não foram significativamente

diferentes ($P>0,05$) nesse tempo com o G1 (controle), sugerindo assim, ausência de efeito do veneno.

A γ -glutamyltransferase (GGT) é uma enzima presente em todas as células, com exceção do músculo. Apresenta grande atividade nos rins e fígado, mas somente a de origem hepática é encontrada no plasma, uma vez que a de origem renal é excretada na urina. O aumento dessa enzima se relaciona com colestase, havendo aumento de produção, liberação e elevação de sua atividade (González e Scheffer, 2003; Kaneco, 2008).

Houve uma tendência de elevação de valores séricos de GGT no G3 (veneno detoxificado) em todo o tempo de imunização, porém valores acima da normalidade, 103,98 U/L e 142,79 U/L, ocorreram nas 2ª e 6ª imunizações, respectivamente. A 6ª imunização contou com valores acima da normalidade em todos os

tempos e, mesmo não havendo diferença estatística, esse fato se torna importante uma vez que comportamento semelhante ocorreu com a enzima aspartato aminotransferase (AST), sugerindo uma possível ação hepatotóxica do glutaraldeído.

Na literatura não há muitos estudos a respeito da dosagem sérica de GGT em envenenamentos escorpionicos, embora já tenha sido relatado que a aplicação de veneno de *T. serrulatus* e sua principal neurotoxina não alteraram as concentrações de γ -glutamyltransferase em ratos (Corrêa et al., 1997).

6.7.2.7) Aspartato Aminotransferase (AST)

As concentrações no sangue da enzima aspartato aminotransferase se encontram na Tabela 31 e Gráfico 30.

Tabela 31: Valores séricos de AST (U/L) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	100,13	127,58	124,92	127,58
G2-Veneno	85,5	103,75	104,27	135,00
G3-Detoxificado	87,86	115,93	139,02	90,22
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	100,13	79,96	101,65	90,52
G2-Veneno	85,5	132,34	113,35	94,15
G3-Detoxificado	87,86	140,07	163,59	91,22
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	100,13	68,61	107,29	120,99
G2-Veneno	85,5	65,64	61,28	117,94
G3-Detoxificado	87,86	99,65	84,41	151,07
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	100,13	92,62	69,96	84,72
G2-Veneno	85,5	140,42	86,86	84,59
G3-Detoxificado	87,86	113,53	97,94	99,30
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	100,13	117,64	136,57	96,81
G2-Veneno	85,5	132,65	120,90	153,86
G3-Detoxificado	87,86	110,08	151,68	108,29
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	100,13	86,03	135,95	125,14
G2-Veneno	85,5	109,34	202,22	189,83
G3-Detoxificado	87,86	137,32	188,29	255,39

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tempos de coleta (linhas) e entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P<0,05$.

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

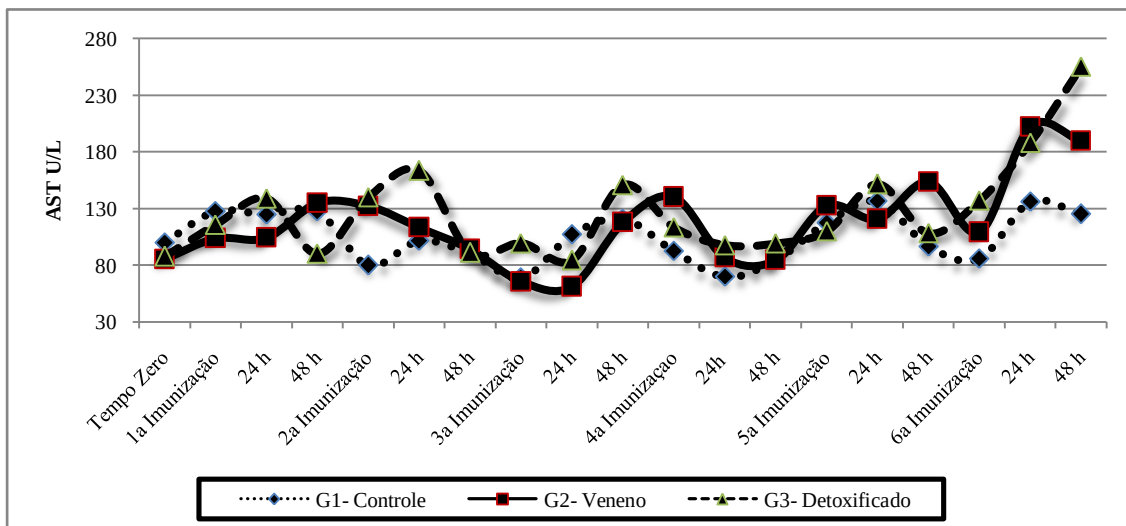


Gráfico 30: Comportamento dos valores médios de AST (U/L) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Durante a execução do projeto não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os valores de normalidade dos animais e os dias das imunizações, bem como em todos os momentos de coleta de todos os grupos.

Os valores observados neste estudo (Tabela 31) estão dentro do limite de normalidade para a espécie ovina (70 a 280 U/L) (Pugh, 2002). Da mesma forma, Pinto et al. (2010) não encontraram aumento desta enzima em ratos e Guimarães et al. (2009) em camundongos, depois da aplicação do veneno em questão. Por outro lado, nossos resultados diferem de outros trabalhos em ratos (Corrêa et al., 1997; Cusinato, 2010) e cães (Ribeiro et al., 2010).

A aspartato amino-transferase é encontrada principalmente no fígado, eritrócitos, musculatura esquelética e cardíaca, se localizando no citosol e em altas concentrações nas mitocôndrias das células. Geralmente é utilizada para avaliar lesão muscular em conjunto com outras enzimas, tais como creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (González e Scheffer, 2003; Colville, 2005), uma vez que o simples aumento desta enzima não especifica se foi injúria nos hepatócitos ou miócitos (Kaneco, 2008).

Apesar de permanecer dentro dos valores de normalidade, a 6ª imunização do

grupo G3 foi marcada por aumento dos valores ao longo dos tempos de coleta. Esse fato se torna interessante, uma vez que houve também alteração da enzima GGT. Possivelmente o aumento destas enzimas (GGT e AST) não ocorreu por lesões hepáticas, mas sim pelo próprio processo de biotransformação do glutaraldeído presente no veneno. Os sistemas enzimáticos de detoxificação hepática, como a citocromo P-450, atuam de forma rápida e apresenta ampla especificidade, o que permite ao animal suportar uma variedade de desafios causados por xenobióticos (Thrall, 2007). Ressalta-se, a ausência de lesões hepáticas na histopatologia, que será discutida mais adiante.

Estudo com administração de veneno da espécie *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* demonstrou em coelhos comprometimento hepático, através do aumento sérico das enzimas AST e alanina amino-transferase (ALT), após seis horas do envenenamento (Abdoon e Fatani, 2009).

6.7.2.8) Glicose

A Tabela 32 e Gráfico 31 representam os valores sanguíneos da glicose em ovinos imunizados com veneno bruto e detoxificado de *T. serrulatus*.

Tabela 32: Valores plasmáticos de glicose (mg/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	77,07	73 ^{Ab}	84,22 ^{ABb}	93,95 ^{Bb}
G2-Veneno	89,45	80,55 ^{Ab}	85,55 ^{ABb}	91,52 ^{Bab}
G3-Detoxificado	72,6	65,45 ^{Aa}	66,02 ^{Aa}	85,87 ^{Ba}
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	77,07	80,07 ^A	95,07 ^B	96,82 ^{Bb}
G2-Veneno	89,45	85,87	93,1	87,77 ^a
G3-Detoxificado	72,6	93,22	90,72	94,4 ^{ab}
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	77,07	94,22	94,9	94,87
G2-Veneno	89,45	84,32	95,97	94,77
G3-Detoxificado	72,6	92,52	96,7	97,52
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	77,07*	112,87	114,1	115,72
G2-Veneno	89,45	113,3	113,57	115,35
G3-Detoxificado	72,6	114,1	113,65	114,32
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	77,07*	133,2	144,12	146,52
G2-Veneno	89,45*	140,2	144,57	144,77
G3-Detoxificado	72,6*	139	143,82	143,5
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	77,07*	140,35	145,7	147,37
G2-Veneno	89,45*	144,37	143,85	147,4
G3-Detoxificado	72,6*	143,87	145,75	147,35

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

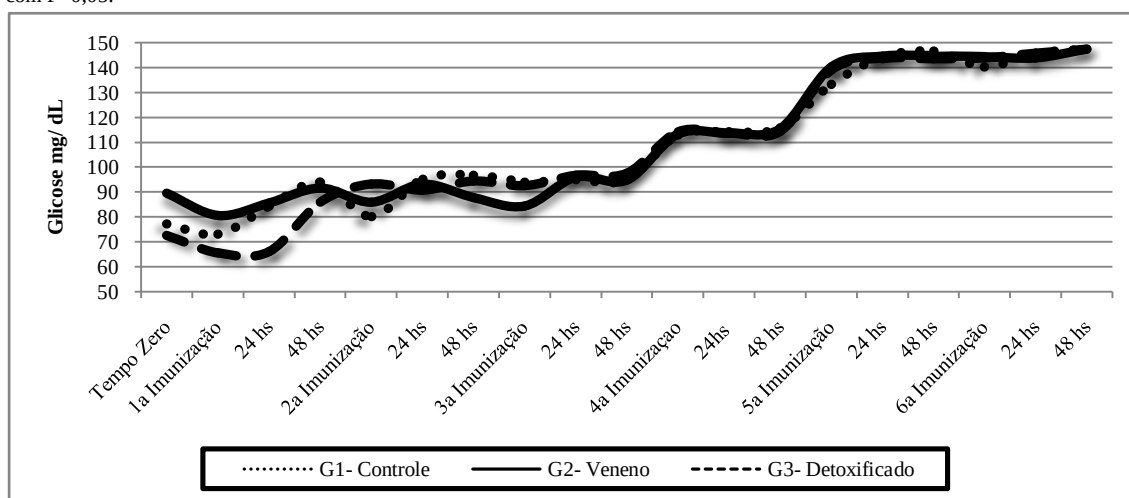


Gráfico31: Comportamento dos valores médios de glicose (mg/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Os valores de glicose no tempo zero variaram de 70 a 106 mg/dL. Interessante ressaltar que o padrão de comportamento da glicose foi distinto nas imunizações com uso de adjuvante e sem adjuvante de Freund (nos reforços). Nas três primeiras imunizações os valores séricos da glicose permaneceram dentro dos limites de normalidade em todos os grupos, o que não se percebe na outra metade de aplicações dos imunógenos (4ª, 5ª e 6ª). Assim, os valores se encontram acima da faixa de normalidade em todos os grupos, inclusive o controle, o que exclui relação com ação do veneno escorpionic.

Através da análise do gráfico 31 percebe-se um aumento progressivo dos valores da glicose a partir da 4ª imunização em todos os grupos, demonstrado pela sobreposição das curvas. A hiperglicemia possivelmente ocorreu em função do estresse dos animais, uma vez que, no protocolo utilizado, o intervalo entre as imunizações foi diferente, ou seja, naquelas com adjuvante o intervalo contava com mais de 20 dias e nos reforços o intervalo foi de três dias entre as aplicações. Assim, além dos ovinos serem examinados diariamente, a punção venosa para coleta das amostras contribuiu para a

possível liberação de cortisol sanguíneo e adrenalina.

O estresse provocado pela dor causa a liberação de cortisol, importante hormônio esteróide sintetizado pelo córtex da glândula adrenal. É considerado o mais potente glicocorticóide produzido naturalmente e sua ação se relaciona com o aumento da glicemia por meio da indução da produção de glicogênio hepático. Nos músculos inibe a síntese protéica, aumenta o catabolismo protéico, reduz a lipase e captação de glicose (Cunningham, 2004; Kaneco, 2008).

A adrenalina também aumenta a glicemia ao inibir a liberação de insulina por estimulação de receptores α -2 do pâncreas (Rang

et al., 2004). Nos envenenamentos escorpiônicos é relatada hiperglicemia em função do estresse da dor ou pela pancreatite causada pelo veneno, que acarretaria diminuição na secreção de insulina. No presente trabalho possivelmente não houve lesão pancreática, uma vez que os valores séricos de amilase não sofreram aumento significativo.

6.7.2.9) Uréia e Creatinina

A avaliação da função renal dos ovinos imunizados foi feita através da dosagem sérica de uréia e creatinina, como mostrado nas tabelas e gráficos a seguir:

Tabela 33: Valores séricos de uréia (mg/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	55,29	63,78	69,95 ^a	47,16
G2-Veneno	60,06	95,07 ^A	218,66 ^{Bb}	46,5 ^C
G3-Detoxificado	58,48	86,96 ^A	155,47 ^{Bb}	63,91 ^A
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	55,29	52,08 ^B	38,46 ^{AB}	32,82 ^A
G2-Veneno	60,06	57,34 ^B	38,79 ^{AB}	29,12 ^A
G3-Detoxificado	58,48	46,97 ^B	35,70 ^{AB}	29,18 ^A
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	55,29	52,00 ^b	37,68 ^a	52,85
G2-Veneno	60,06*	32,09 ^{Aa}	43,82 ^{ABab}	59,54 ^B
G3-Detoxificado	58,48*	34,58 ^{Aab}	62,12 ^{Bb}	54,26 ^B
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	55,29	65,35 ^a	45,70 ^{ab}	42,83 ^b
G2-Veneno	60,06*	23,32 ^{Ab}	53,90 ^{Bb}	21,42 ^{Aa}
G3-Detoxificado	58,48	43,49 ^a	34,78 ^a	48,26 ^b
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	55,29	50,8 ^B	58,13 ^B	32,13 ^{Aa}
G2-Veneno	60,06	50,88	46,68	52,27 ^b
G3-Detoxificado	58,48	68,63 ^B	62,58 ^B	38,85 ^{Aab}
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	55,29	40,96 ^{Bab}	25,80 ^A	48,15 ^{Bab}
G2-Veneno	60,06	42,87 ^b	35,89	37,8 ^a
G3-Detoxificado	58,48*	25,56 ^{Aa}	35,66 ^A	57,62 ^{Bb}

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

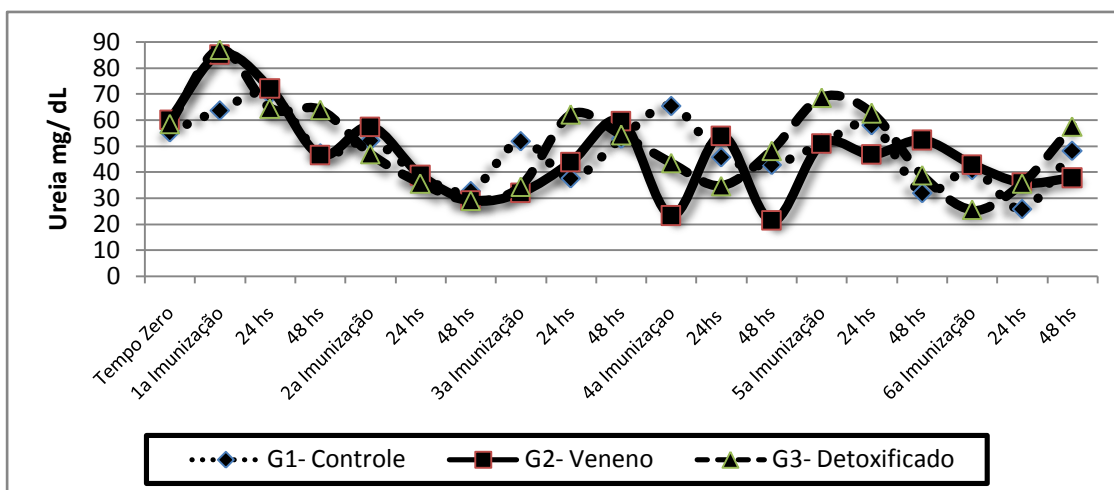


Gráfico32: Comportamento dos valores médios (mg/dl) de uréia em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Ao se analisar a Tabela 33 e Gráfico 32 pode-se perceber que a concentração sérica da uréia não teve um padrão de comportamento definido ao longo de todo o processo de imunização. Dessa forma, o traçado no gráfico mostra bastante variação de valores, algumas vezes superiores ou inferiores aos limites de normalidade estabelecidos (50-65 mg/dl).

Levando em consideração estes valores comparados com o dia das injeções com os imunógenos, pode-se afirmar que houve diferença significativa ($P<0,05$) em algumas etapas. Na 3ª imunização houve diminuição no G2 e G3, bem como na 4ª (grupo veneno) e na 6ª (grupo detoxificado). Estes valores tendem a se normalizar à medida que o tempo de coleta avança dentro de cada fase, com exceção da 4ª (G2) em que os valores tornam a cair com 48 h.

Após a primeira injeção dos imunógenos e seus respectivos tempos de coleta de sangue (24 e 48 h), percebe-se que não houve diferença significativa entre eles, ou seja, apesar dos valores estarem acima do limite de normalidade não houve significado clínico. O mesmo padrão ocorreu quando os três grupos foram comparados. Ressalta-se que, na 2ª imunização ocorreu um mesmo padrão de resposta nos três grupos, ou seja, existe uma tendência significativa de diminuição sérica da

uréia ($P<0,05$). Como houve decréscimo, inclusive no grupo controle, excluiu-se esta diminuição com a ação do veneno.

Estes achados são condizentes com resultados de experimentos com cães (Ribeiro et al., 2010), ratos (Cusinato et al., 2010) e camundongos (Guimarães et al., 2009), que não mostraram alterações significativas na concentração de uréia nos animais envenenados, entretanto, diferindo de Alves et al., (2005) que detectaram aumento de uréia em ratos após administração do veneno de *T. serrulatus*. Em acidentes em humanos também foi descrito aumento de uréia sérica (Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Bouaziz et al., 2008).

O aumento da concentração da uréia sanguínea reflete mecanismos renais e extra-renais, tais como catabolismo tecidual devido à febre, exercícios, ingestão efetivamente a base de proteínas aumentando o aporte de aminoácidos, desidratação, diminuição da função cardíaca e hipovolemia. A origem renal inclui doenças renais, como nefrites agudas e crônicas, além de processos obstrutivos que impeçam ou dificultam a eliminação da urina. A redução sérica da uréia se relaciona com ingestão de dieta com baixo teor de proteína, sobreidratação, má nutrição, síndrome de malabsorção e insuficiência hepática (González e Scheffer, 2003).

Tabela 34: Valores séricos de creatinina (mg/dl) de ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *T. serrulatus* (G3) em diferentes momentos.

	TO	1a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	1,72	1,09	0,93	1,07
G2-Veneno	1,61	1,01	0,84	0,99
G3-Detoxificado	1,81	0,98	1,09	1,20
	TO	2a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	1,72	1,28	1,29	1,10
G2-Veneno	1,61	1,50	1,61	1,15
G3-Detoxificado	1,81	1,47	1,37	1,07
	TO	3a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	1,72	1,26	1,35	1,37 ^{ab}
G2-Veneno	1,61	1,34	1,48	1,04 ^a
G3-Detoxificado	1,81	1,35	1,31	1,55 ^b
	TO	4a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	1,72	2,00	1,39	1,40
G2-Veneno	1,61	2,01	1,88	1,42
G3-Detoxificado	1,81	1,96	1,85	1,71
	TO	5a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	1,72	1,73	1,60	1,65
G2-Veneno	1,61	1,58	2,00	1,63
G3-Detoxificado	1,81	1,68	1,91	1,48
	TO	6a Imunização	24 h	48 h
G1-Controle	1,72	1,70 ^{AB}	2,21 ^B	1,45 ^A
G2-Veneno	1,61	2,08 ^B	2,20 ^B	1,29 ^A
G3-Detoxificado	1,81	2,19 ^B	2,29 ^B	1,20 ^A

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias do momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey.

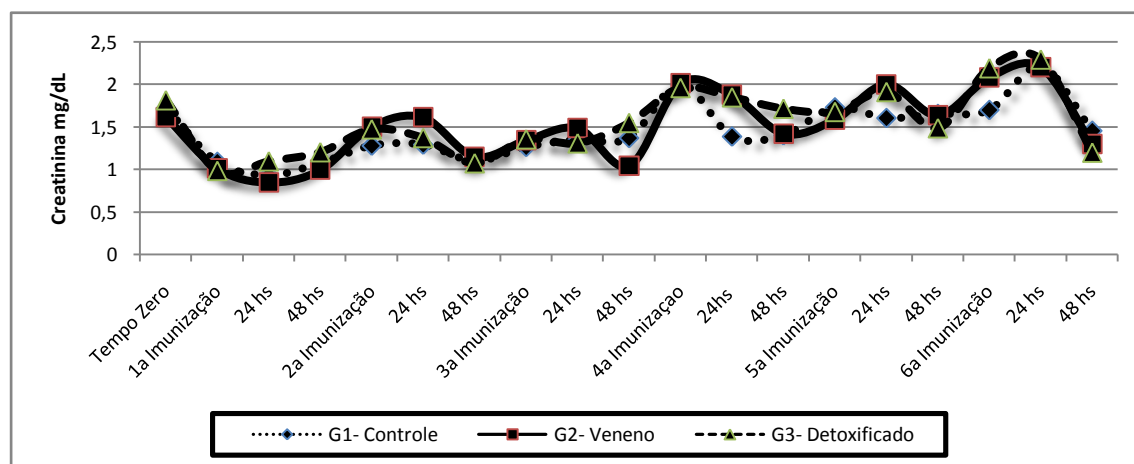


Gráfico33: Comportamento dos valores médios de creatinina (mg/dl) em ovinos ao longo das imunizações com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado (G3) de *T. serrulatus*.

Comparando-se o valor basal da concentração de creatinina no sangue dos animais com as seis imunizações, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) em nenhuma delas, apesar de alguns valores se encontrarem acima ou abaixo do limite de normalidade para a espécie ovina (1,2-1,9 mg/dl).

Quando analisadas as coletas dentro de cada imunização de forma separada, observa-se que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) da creatinina entre os tempos e os grupos nas 1ª, 2ª, 4ª e 5ª imunizações. Por outro lado, na 3ª imunização (48 h) verifica-se diferença significativa entre os grupos que receberam

veneno bruto e detoxificado, porém, sem diferença quando comparados ao grupo controle. O G3 (veneno detoxicado) foi o que apresentou valor mais elevado de creatinina sérica (1,55 mg/dl), ainda situado dentro dos limites de referência para a espécie (1,2-1,9 mg/dl), e o G2 (veneno bruto), o valor mais baixo (1,04 mg/dl).

A 6ª imunização contou com valores mais elevados para este parâmetro, principalmente 24 horas após a aplicação dos imunógenos. Neste tempo de coleta todos os grupos apresentaram valores acima do limite de normalidade, apesar de considerados estatisticamente iguais, o que não apresenta

significado clínico, uma vez que, com 48 horas, os valores já estavam dentro dos limites de normalidade para a espécie ovina (Pugh, 2002), em todos os grupos, inclusive o controle.

Revelo et al. (1996) e Alves et al. (2005) demonstraram em ratos que a distribuição no organismo do veneno do escorpião *T. serrulatus* é rápida, atingindo concentração máxima nos rins em 15 minutos após sua aplicação, sendo sua excreção através deste órgão. Os efeitos tóxicos decorrentes são causados pela menor taxa de filtração glomerular e pelo menor fluxo urinário, deposição de proteínas nos túbulos renais e aumento da pressão hidrostática, com decorrente aumento sérico de creatinina e uréia.

A desidratação do animal e obstruções urinárias também ocasiona aumento destas substâncias (Kaneko, 2008). Além do fluxo renal reduzido, o aumento de creatinina no sangue pode ser devido aos danos musculares e exercícios intensos, o que não foi observado uma vez que os animais não foram submetidos a grandes esforços, o que também possibilitaria alterações em outras enzimas específicas de lesões musculares. Estes resultados corroboram com trabalhos desenvolvidos com cães (Ribeiro et al., 2010) e camundongos (Guimarães et al., 2009), porém se diferem de outros (Alves et al., 2005; Pinto et al., 2010) em ratos, todos eles estudando o veneno de *T. serrulatus*.

Em coelhos, o veneno de outra espécie escorpiônica (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) provocou elevação dos valores séricos de creatinina, indicando comprometimento renal desencadeado pela hipotensão causada pelo veneno (Abdoon e Fatani, 2009).

Dessa forma, o padrão de excreção de creatinina e uréia pelos ovinos imunizados com veneno de *T. serrulatus*, bruto e detoxificado evidenciado por suas concentrações séricas e ausência de alterações clínicas, sugere que o veneno não foi capaz de alterar a função renal dos animais após aplicação do 1º ciclo do protocolo de imunização.

6.8) Avaliação Anátomo-histopatológica

Nas avaliações macro e microscópicas não houve alterações morfológicas em nenhum órgão avaliado dos ovinos imunizados de todos os grupos estudados. Relata-se a ocorrência de congestão e hemorragia nos capilares alveolares (Pinto et al., 2010), edema alveolar difuso com infiltrado inflamatório (Cupo, 2002), degeneração vacuolar de fibras cardíacas e necrose (Ismail, 1995), além de congestão de capilares do córtex cerebral após envenenamento escorpiônico (Guimarães et al., 2010).

6.9) Soroneutralização *in vivo*

A capacidade dos anticorpos presentes no soro de ovinos imunizados com o veneno total e detoxificado de *T. serrulatus* em neutralizar os efeitos do envenenamento escorpiônico (2DL₅₀) nos camundongos foi demonstrada nas tabelas e gráficos abaixo, separados de acordo com o grupo e indivíduos dentro de cada grupo.

Ressalta-se que no grupo de camundongos em que foi injetado apenas veneno de *T. serrulatus* (G13), não houve sobrevivência de nenhum animal, ou seja, o veneno na dose aplicada (52µg) foi letal.

Os animais apresentaram sinais típicos do envenenamento, tais como piloereção, dor (vocalizavam), agitação, desconforto, sialorreia, lacrimejamento, sudorese, sangramento e morte, o que vai ao encontro de outros estudos (Rezende et al., 1996; Cupo e Hering, 2002; Cupo et al., 2003; Ribeiro et al., 2011). As mortes foram rápidas, em torno de 10-30 minutos de observação. Em contrapartida, os grupos G14 (antiveneno FUNED) e G15 (*pool* antiveneno produzido nos carneiros do experimento) não apresentaram nenhuma sintomatologia clínica.

Tabela 35: Soroneutralização *in vivo* de camundongos desafiados com veneno de *T. serrulatus*.

	Sobreviventes	Mortes
G1 - PBS	4/16 (25%)	12/16 (75%)
G2 - Veneno Bruto	9/16 (56,2%)	7/16 (43,8%)
G3 - Detox	7/16 (43,7%)	9/16 (56,3%)

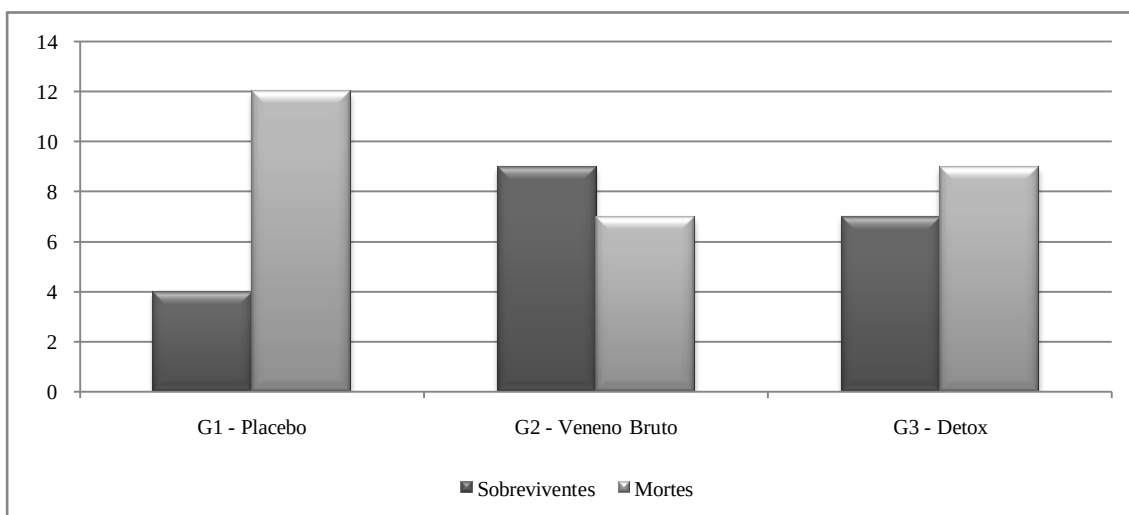


Gráfico34: Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de *T. serrulatus* e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido nos ovinos.

Através da tabela e gráfico acima percebe-se que os imunógenos utilizados para produção de soro anti-*T. serrulatus* (PBS, veneno bruto e veneno detoxificado) apresentaram eficiência distinta na proteção dos camundongos desafiados. Assim, nos animais que receberam soro proveniente do grupo controle, a mortalidade foi de 75% (12/16), enquanto no grupo veneno bruto e detoxificado as taxas foram de 43,8% (7/16) e 56,3% (9/16), respectivamente. A mortalidade elevada no grupo 1 já era esperada, uma vez que se utilizou solução salina tamponada em fosfato como “imunógeno”.

De maneira geral, a resposta imunológica foi semelhante nos dois grupos que receberam veneno, quer seja na sua forma bruta ou detoxificada (43,8% x 56,3%). No *Western Blotting*, a intensidade da resposta do G2 foi maior que do G3, o que pode ter se traduzido nesta diferença de proteção (12,5% de mortes).

Estudo de uma fração tóxica (TstFG50) obtida do veneno de *T. serrulatus* por purificação

e cromatografia foi conjugada com glutaraldeído e utilizada como imunógeno. Os resultados mostraram eficiência na produção de anticorpos (ELISA) e soroneutralização *in vivo* em camundongos, sendo que o efeito protetor dos anticorpos circulantes permaneceu por até nove semanas depois da última imunização nestes animais (Machado de Ávila et al., 2004).

A detoxificação por radiação gama do veneno do escorpião *Androctonus australis hector* foi capaz de reduzir sua toxicidade e preservar sua capacidade imunogênica. Após imunização o soro foi testado por ELISA, sendo encontrada uma titulação elevada numa determinada dose da radiação, superior ao veneno total. O desafio *in vivo* mostrou proteção até seis meses após fim do protocolo (Lila e Fátima, 2011).

Os Gráficos 35, 36 e 37 demonstram a proteção do soro anti-escorpiônico levando em consideração cada animal produtor, com objetivo de analisar possíveis variações individuais na eficiência da resposta.

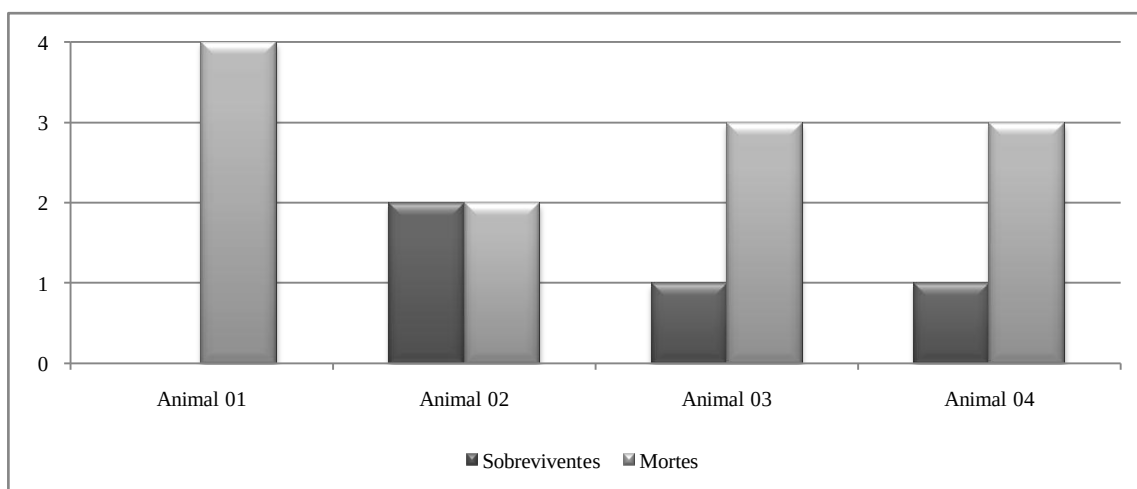


Gráfico 35: Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de *T. serrulatus* e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido em ovinos do grupo controle.

Esperava-se 100% de mortalidade dos camundongos que receberam soro proveniente de ovinos imunizados com PBS, entretanto, esse fato só foi observado com o soro do animal um. Os anti-venenos dos ovinos 2 e 3 ocasionaram 50% e 75% de mortalidade respectivamente. Os animais deste grupo tiveram sintomatologia muito semelhante ao grupo que recebeu

exclusivamente veneno de *T. serrulatus* (G14) e, a sobrevivência de alguns indivíduos provavelmente foi em função de variação individual, uma vez que em todos os grupos houve morte em decorrência do veneno escorpiônico, excluindo possível erro de metodologia.

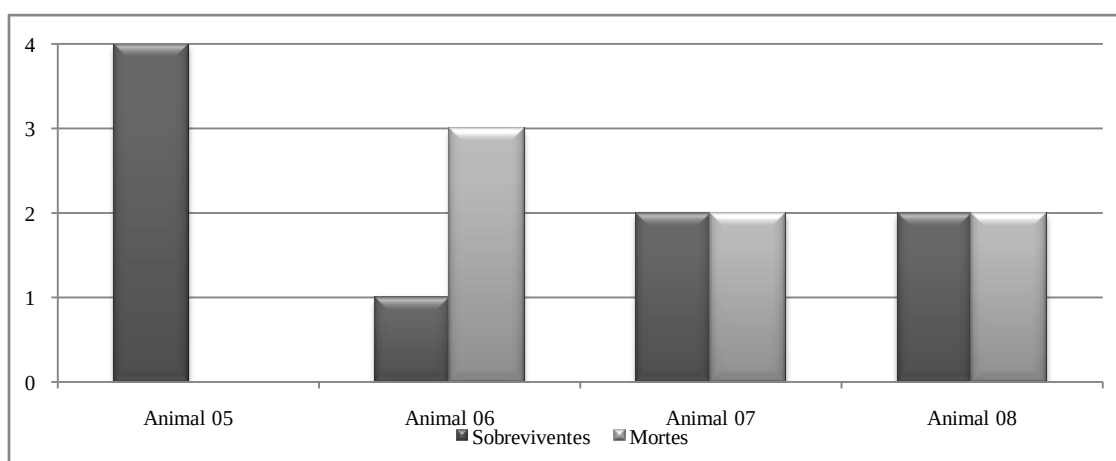


Gráfico 36: Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de *T. serrulatus* e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido nos ovinos do grupo imunizado com veneno bruto.

Baseado nas análises do gráfico acima se verifica variação de resposta imunológica dentro de cada grupo, ou seja, os ovinos responderam de forma distinta ao processo de imunização para produção de antivenenos. Dessa forma, o animal que melhor respondeu ao teste de soroneutralização foi o cinco, com 100% de sobrevivência dos camundongos, enquanto nos camundongos que receberam o soro proveniente

do ovino 6 a taxa de mortalidade foi de 75%. Estes resultados coincidiram em parte com os achados do *Western Blotting* e ELISA, uma vez que o animal cinco apresentou intensa imunoreatividade de resposta e maior reatividade de anticorpos nos dois testes respectivamente. O antiveneno do animal oito, por exemplo, foi o de menor reatividade, porém garantiu 50% de sobrevivência dos camundongos desafiados.

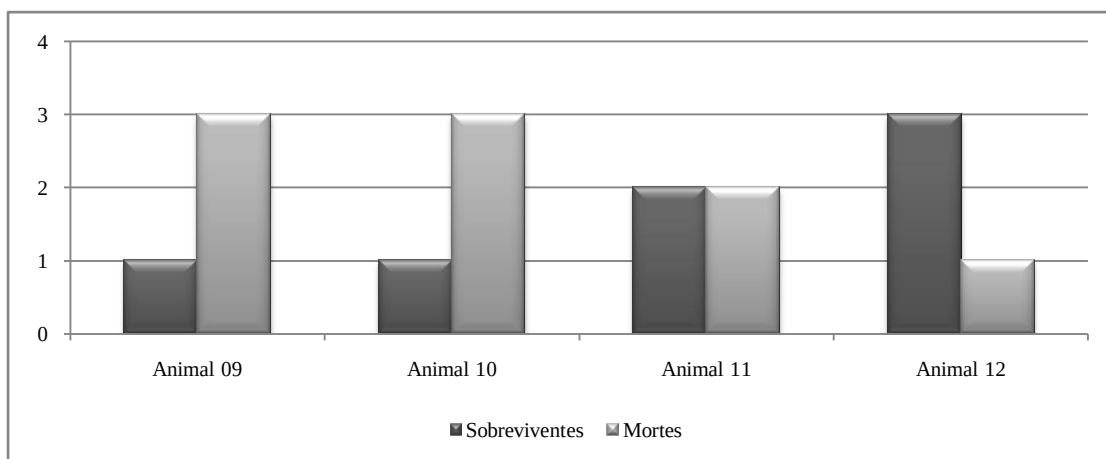


Gráfico 37: Número de camundongos sobreviventes após injeção de veneno de *T. serrulatus* e tratamento com soro anti-escorpiônico produzido nos ovinos do grupo imunizado com veneno detoxificado.

Analisando as respectivas taxas de sobrevivência e mortalidade dos camundongos que receberam soro do grupo de ovinos imunizados com veneno detoxificado com glutaraldeído, o animal 12 foi o que respondeu de forma mais satisfatória dentro do grupo, uma vez que apenas um camundongo morreu (75% de sobrevivência). Entretanto, os resultados do soro deste mesmo animal no *Western Blotting* demonstram que dentro do grupo foi o indivíduo com menor intensidade de resposta e menor reatividade de imunoglobulinas no ELISA. Em contrapartida, o soro do animal 10 se mostrou superior nos dois testes citados, embora sua proteção efetiva foi inferior ao 12 na soroneutralização.

Assim, pode-se perceber que não houve relação direta entre titulação de anticorpos no ELISA com neutralização do veneno, ou seja, a realização de testes *in vivo* foi fundamental para avaliação da resposta imunológica.

7) CONCLUSÕES

O veneno de *T. serrulatus* detoxificado com glutaraldeído não apresentou efeitos tóxicos nos ovinos durante o 1º ciclo de imunização, com aplicação de três imunizações e três reforços. Não foram encontradas, portanto, alterações clínicas significativas, eletrocardiográficas, hematológicas, bioquímicas, lesões anátomo-histopatológicas sugestivas do envenenamento escorpiônico. Além disso, após processo de detoxificação, o veneno tratado com glutaraldeído preservou sua imunogenicidade, o que sugere sua possível utilização nos processos de produção de antiveneno adotados no país.

Para este protocolo adotado, o veneno bruto e detoxificado mostraram capacidade de imunogenicidade, com produção de anticorpos responsáveis por proteção de 56,3% e 43,8% dos animais desafiados, respectivamente.

Os ovinos, neste estudo, se mostraram mais uma espécie a ser utilizada nos processos de imunização para produção de antiveneno, tendo em vista que os animais submetidos ao 1º ciclo do protocolo de imunização toleraram de forma adequada as intervenções, apresentando em sua maioria apenas reações locais associadas ao uso do adjuvante de Freund. Além disso, são animais de fácil contenção, manuseio e manutenção, além de proporcionar coleta de quantidades satisfatórias de sangue.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, justifica-se a utilização do tratamento químico com glutaraldeído na detoxificação do veneno de *T. serrulatus*, com intuito de melhorar as condições de saúde e bem estar dos animais produtores de antiveneno. Entretanto, os resultados reforçam a importância de novos estudos, com adoção de vários ciclos de imunização para se verificar a toxicidade do glutaraldeído a longo prazo.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1998. 469p.
- ABDOON, N.A.; FATANI, A.J. Correlation between blood pressure, cytokines and nitric oxide in conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.54, p.471-480, 2009.
- ALBERGHINA, D.; CASELLA, S.; VAZZANA, I. et al. Analysis of serum proteins in clinically health goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis. *Veterinary Clinical Pathology*, v.39, n.3, p.317-321, 2012.

- ALMEIDA, F.M.; PIMENTA, A.M.C.; FIGUEIREDO, S.G.; et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venom. *Toxicon*, v.40, p.1041-1045, 2002.
- ALVES, R.S.; NASCIMENTO, N.R.F.; BARBOSA, P.S.F.; et al. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v.46, n.3, p.271-276, 2005.
- AMARAL, C. F. S. A.; REZENDE, N. A. Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in pathogenesis of pulmonary oedema after scorpion envenoming. *Toxicon*, v. 35, n.7, p. 997-998, 1997.
- AMARAL, C.F.S.; LOPES, J.A.; MAGALHÃES, R.A. et al. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. *The American Journal of Cardiology*, v.67, p.655-657, 1991.
- ANDRADE, M. V.; CARAMAZ, M. P.; ABREU, E.M.N.N. et al. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, n. 138, p. 97-104, 2004.
- ARYA, S.C.; ASHRAF, S.J.; PATHAK, V.P. Glutaraldehyde in whole-cell *Bordetella pertussis* vaccine. *Vaccine*, v.7, p.486, 1989.
- AVRAMEAS, S.; TERNYNCK, T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry*, v.6, p.53-66, 1969.
- BALL, E. Serological Tests for the Identification of Plant Viruses. *The American Phytopathological Society, Plant Virology Committee*, 1974.
- BALL, E., HAMPTON, R., DE BOER, S. e SHAAD, N. Polyclonal antibodies. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1990.p.33-54.
- BARBOSA, J.A.R.G.; WAGNER, S.; CASTRO, M.S. et al. The 3D homology model of the first neurotoxic peptide (Tf4) from the scorpion *Tityus fasciolatus*. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 7, 2002. Pirenópolis. *Anais...Pirenópolis: Cruzeiros*, 2002, p.317.
- BARBOSA, A.D. *Caracterização e distribuição espacial dos acidentes escorpionicos em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005 a 2009*. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- BARRIO, A.; VITAL-BRAZIL, G. Ein neues Verfahren der Giften Nahme ber Spinnen. *Experiencia*, v.6, p.112-113, 1949.
- BATISTA, C. V. F.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; LUCAS, S. et al. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺-channels. *FEBS Letters*, n. 486, p. 117-120, 2000.
- BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*, v.5, n. 6, p. 821-835, 1997.
- BERCKS, R.; KOENIG, R.; QUERFURTH, G. Plant Virus Serology. In *Principles and Techniques in Plant Virology*. Edited by Kado/Agrawal. Van Nostrand Reinhold. p. 467-490, 1972.
- BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; SEIXAS, A.E.C. et al. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*, v.41, p.501-508, 2003.
- BORGES, A.; SOUZA, L.; ESPINOZA, J. et al. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms. *Toxicon*, v. 51, p.66-79, 2008.
- BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, v.49, n.2, p.142-158, 2007.
- BOUAZIZ, M.; BAHLOUL, M.; KALLEL, H. et al. Epidemiological, clinical characteristics and outcome of severe scorpion envenomation in South Tunisia: multivariate analysis of 951 cases. *Toxicon*, v.52, p.918-926, 2008.
- BUCARETCHI, F.; BARACAT, C.E.; NOGUEIRA, R.J.N. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.37, p.331-336, 1995.

- BÜCHERL W. Escorpionismo no Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*, v.34, p.9-24, 1969.
- CAMPOLINA, D. *Georreferenciamento e estudo clínico-epidemiológico dos acidentes escorpiônicos atendidos em Belo Horizonte, no Serviço de Toxicologia de Minas Gerais*. 2006. 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
- CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. Acidentes provocados por contatos com animais peçonhentos. In: BORGES, D.R.; ROTHSCCHILD, H. *Atualização Terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- CANDIDO, D.M. Escorpiões. In: Joly CA, Bicudo CEM. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 25-34, 1999.
- CARDINET, G.H. Skeletal Muscle Function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.407-440.
- CARDOSO, J.L.; FAN, W.H.R; ARAÚJO, A.A. et al. Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990-1993). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.28, p.10, 2003.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H. et al. *Animais peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Sarvier, 1.ed., 468p., 2003.
- CATERRAL, W.A. The molecular basis of neuronal excitability. *Science*: v.223, p.653-661, 1984.
- CESTÉLLE, S.; CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxins action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, v.82, p.883-892, 2000.
- CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FONSECA, S. C. G.; CAMPOLINA, D.; et al. ELISA for detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v. 32, n. 12, p. 1649-1656, 1994.
- CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; FERREIRA, A.M.B.M. et al. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.35, n.2, p.213-221, 1997.
- CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, v.36, n.6, p.823-846, 1998.
- CHULASUGANDHA, P. Snake antivenoms: Heterologous and polyclonal antisera. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, v.22, n.1, p.1-14, 2003.
- COELHO, F.M.; PESSINI, A.C.; COELHO, A.M. et al. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v.50, p.420-427, 2007.
- CORRÊA, M. M.; SAMPAIO, S. V.; LOPES, R. A; et al. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*, v.35, p. 1053-1067, 1997.
- COLVILLE, J. Bioquímica sanguínea. In: HENDRIX, C.M. *Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários*. 4ed. São Paulo: Roca, 2005. p.79-107.
- CRUZ, E.F.S. Biologia dos escorpiões. In: BARRAVIERA, B. *Venenos Animais-Uma Visão Integrada*. Rio de Janeiro: Publicações Científicas Ltda. p. 135-150, 1994.
- CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, 579p.
- CUPO, P.; HERING, S.E. Cardiac troponin-I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.40, n. 6, p. 823-830, 2002.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. et al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Salvier, 2003, p. 198-208.
- CUSINATO, D.A.C.; SOUZA, A.M.; VASCONCELOS, F. et al. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.56, p.1477-1486, 2010.
- DART, R.C.; SIEFERT, S.A.; CAROLL, L et al. Humam trial of affinity purified antibody

- fragment for snake venom poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*, v.36, n.4, p.363, 1994.
- DÁVILA, C.A.M., DÁVILA, D.F., DONIS, J.H. et al. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, v. 40, p.1339-1346, 2002.
- DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology*, v.264, n.2, p.C361-369, 1993.
- DEHESA-DÁVILA, M.; POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1015-1018, 1994.
- DEVAUX, C.; CLOT-FAYBESSE, O.; JUIN, M.; MABROUK, K.; SABATIER, J.M. e ROCHAT, H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, nontoxic analog. *FEBS Lett*, v.412, n.3, Aug 4, p.456-60. 1997.
- DIAS, M.B.; CAMPOLINA, D.; GUERRA, S.D.; et al. Escorpionismo. In: ANDRADEFILHO, A. *Toxicologia na Prática Clínica*. 1.ed. Belo Horizonte: Folium, 2001. p.155-165.
- DIEGO-GARCIA, E.; BATISTA, C. V.; GARCIA-GOMEZ, B. I. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*, v.45, n.3, p.273-83. 2005.
- DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.D.; STOBBER, M. *Rosenberger-Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 419p.
- D'SUZE, G.; MONCADA, S.; GONZÁLEZ, C. et al. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumor necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion Sting. *Toxicon*, v.41, n.3, p.367-375, 2003.
- ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comparative Haematology International*, v.5, p.93-97, 2008.
- ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The veterinary journal*, v.185, p.23-27, 2010.
- ESPINO-SOLIS, G.P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B. et al. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospective. *Journal Proteomics*, v.72, p.3357-3368, 2005.
- FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S. Soroterapia. In: SCHVARTSMAN S. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*: São Paulo, Brasil, Ed. Sarvier, 1992, 288p.
- FERREIRA JR., R.S. *Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticorotáticos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente Crotalus durissus terrificus nativo ou inativado com cobalto-60*. 2005. 123p. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu.
- FERREIRA, F.. *Fluidoterapia endovenosa e oral em bezerros com diarreia osmótica induzida*. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias). Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A.; AMARAL, C.F.S. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*, v.32, n.9, p.1009-1014, 1994.
- FUNASA. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: 2.ed, outubro de 2001. 120p.
- FUNDACENTRO. *Prevenção de acidentes com animais peçonhentos*. São Paulo: Folder Série Técnica, n.4, 2006.
- GAZARIAN, K.G.; GAZARIAN, T.; HERNÁNDEZ, R. et al. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*, v.23, n.26, p.3357-3368, 2005.
- GIBBS, A.; HARRISON, B. *Plant Virology*. London: Edward Arnold, 1976. 292 p.
- GONÇALVES, A. A.; TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M. Participation of Na⁺ channels in the potentiation by *Tityus serrulatus*-toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet β -cells. *Toxicon*, v. 41, n. 8, p. 1039-1045, 2003.

- GONZÁLEZ, F.H.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.J. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anales de Veterinaria (Murcia)*, v.23, p.5-17, 2007.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F.H.D. *Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil*. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do rio Grande do Sul. p.73-89.
- GUARNIERI, M. C. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia. *Ação deletéria e benéfica das peçonhas de serpentes, aranhas, escorpiões e insetos*. Recife, p.16-21, 1998.
- GUATIMOSIM, S.C.F.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C.R. et al. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon*, v.38, p.113-121, 2000.
- GUERON, M.; ILIA, R.; SOFER, S. The cardiovascular system after scorpion envenomation: A review. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v.30, n.2, p.245-259, 1992.
- GUERON M.; STERN J.; COHEN W. Severe myocardial damage and heart failure in scorpion sting. *American Journal Cardiology*, v.19, p.719-726, 1967.
- GUERON M.; YARON R. Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting: clinicopathologic correlations. *Chest*, v.57, n.2, p.156-162, 1970.
- GUIDOLIN, R.; DIAS, S.W.; HIGASHI, H.G. et al. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. *Memórias do Instituto Butantan*, v.51, p.85-90, 1989.
- GUIMARÃES, P.T.; PINTO, M.C.L.; LABARRERE, C.R. et al. Aterações bioquímicas e anátomo-histopatológicas causadas pelo veneno do escorpião *Tityus fasciolatus* em camundongos. *Revista Brasileira Ciências Veterinárias*, v.16, p.51-57, 2009.
- GUIMARÃES, P.T.C.; PINTO, M.C.L.; MELO, M.M. Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por *Tityus fasciolatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.6, p.1382-1390, 2011.
- GUPTA, R.K.; SHARMA, S.B.; AHUJA, S. et al. Glutaraldehyde inactivated pertussis vaccine: a safe vaccine in the innocuity test. *Vaccine*, v.5, p.102-104, 1987.
- GUPTA, R.K.; SAXENA, S.N.; SHARMA, S.B. et al. Studies on the optimal conditions for inactivation of *Bordetella pertussis* organisms with glutaraldehyde for preparation of a safe potent pertussis vaccine. *Vaccine*, v.6, p.491-496, 1988.
- GWEE, M. C. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHEAH, L. S.; WONG, P. T. H.; GONG, J. P.; KINI, R. M. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. *Journal of Toxicology*, v.15, p.37– 57. 1996.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: a Laboratory Manual*. USA: Cold-Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HARRY, J.G. Complete Freund's adjuvant-induced hyperalgesia: a human perception. *Pain*, v.85, p.301-303, 2000.
- HERING, S. E.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P. *Escorpionismo*. In: S. Schvartsman (Ed.). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, p.216-227. 1992.
- HORTA, F.M.B.; CALDEIRA, A.P.; SARES, J.A.S. Escorpionismo em crianças e adolescentes: aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes hospitalizados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.3, p.351-353, 2007.
- INGENBLEEK, M.; YOUNG, V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annual Review of Nutrition*, v.14, p.495-533, 1994.
- ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, v.33, n.7, p.825-858, 1995.
- ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M.A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon*, v.26, n.3, p.233-256, 1988.
- JACKSON, M.L. *Veterinary clinical pathology*. Iowa: Blackwell Publishing. 2007. 363p.

- JACKSON, P.G.G.; COCKCROFT, P.D. *Clinical Examination of Farm Animals*. Iowa: Blackwell Publishing Company. 2002. 313p.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. 417p.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. *Imunobiologia - o sistema imune na saúde e na doença*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.
- KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon*, v. 35, n. 10, p. 1523-1529, 1997.
- KALAPOTHAKIS, E.; JARDIM, S.; MAGALHÃES, A.C. et al. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v.39, p.679-685, 2001.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2008. 896p.
- KELES, I.; WOLDEHIWET, Z.; MURRAY, R.D. Vaccination with glutaraldehyde-fixed bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infected cells stimulates a better immune response in lambs than vaccination with heat-inactivated cell-free BRSV. *Vaccine*, v.16, n.11-12, p. 1172-1178, 1998.
- KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical Enzimology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 303-325.
- LAGO, E.P.; MELO, M.M.; ARAÚJO, R.B. et al. Perfis eletrocardiográfico e ecodopplercardiográfico de ovinos após ingestão da suspensão aquosa de *Mascagnia rigida* Griseb. (Malpighiaceae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.4, p.853-862, 2009.
- LANDON, J.; SMITH, D.S. Merits of sheep antisera for antivenom manufacture. *Journal of Toxicology ToxinReviews*, v.22, n.1, p. 15-22, 2003.
- LIKES, K.; BANNER JR., W.; CHAVEZ, M. Centruroides exilicauda envenomation in Arizona. *Western Journal of Medicine*, v.141, p.634-647, 1984.
- LILA, B.A.; FATIMA, L.D. Enhanced immune sera and vaccine: safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine*, v.29, p.8951-8959, 2011.
- LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; BRAZIL, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p. 239-245, 2000.
- LOURENÇO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H.W. et al. *Animais peçonhentos no Brasil biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Salvier, 2003, p. 182-197.
- LOURENÇO W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON J. L.; CUELLAR O.; EICKSTEDT V. R. D.; et al. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 2, n.2, 1996.
- LOURENÇO, W. R. The scorpion families and their geographical distribution. *Journal of Venomous and Animal Toxins*, v.7, n.1, p. 3-23, 2001.
- LUCAS, S. O. *Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan e os aracnídeos peçonhentos*. IN: ____ História, Ciências, Saúde. Manguinhos: Rio de Janeiro. v. 10, n.3, 2003, p. 1025-35.
- MACHADO DE ÁVILA, R. A.; ALVARENGA, L. M.; TAVARES, C. A. P. et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, v. 44, p. 233-241, 2004.
- MARIA, W. S.; VELARDE, D. T.; ALVARENGA, L. M. et al. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon*, v.46, n.2, p.210-217, 2005.
- MARCUSSI, S.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. *Escorpiões-Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas*. 1.ed. São Paulo: FUNPEC Editora, 2011. 140p.
- MARTINS, M.R.; RAFAINE, D.; NEVES, M.F. et al. Escorpiões: biologia e acidentes. *Revista científica de medicina veterinária*, n.10, 2008.
- MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; ALAMI, M.; GIAMARCHI, A.; MISSIMILLI, V.; ROSSO,

- J. P.; BOUGIS, P. E. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine*, v.24, n.12, Mar 15, p.1990-1996, 2006.
- MATTHIENSEN, F.A. The breeding of *T. serrulatus* Lutz & Mello, 1927 in captivity (Scorpiones, Buthidae). *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, v.4, p. 299-300, 1971.
- MATTHIENSEN, F.A. Revisão sobre parasitas e predadores de escorpiões. *Naturalia*, v.9, p.1-5, 1984.
- MEKI, A.R.M.A.; EL-DEAN, Z.M.M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*, v.36, n.12, p.1851-1859, 1998.
- MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; VERÇOSA JUNIOR, D. et al. Escorpionismo. *Caderno Técnico Veterinária e Zootecnia*, n.44, p.90-97, 2004.
- MENDES, T.M. *Antígenos para produção de soro contra veneno do escorpião Tityus serrulatus*. 2007. 241p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MENDES, T.M.; DIAS, F.; HORTA, C.C.R. et al. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon*, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de controle de escorpiões*. Brasília, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Acidentes por animais peçonhentos: Escorpiões*. Disponível em < <http://www.saude.gov.br>>, acesso em 15 de maio de 2012.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v.168, p.28-40, 2004.
- MURTHY, K. R. K.; HAGHNAZARI, L. The blood levels of glucagon, cortisol and insulin following the injection of venom by the scorpion (*Mesobuthus tamulus concanensis*, POCKOCK) in dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 5, n.1, p. 47-55, 1999.
- NAOUM, P.C. *Eletroforese: técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Livraria Santos. 1990. 174p.
- NOVAES, G.; CATANZARO, O. L.; BERALDO, W. T.; FREIRE-MAIA, L. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon*, v. 20, n. 5, p. 847-853, 1982.
- NOVAES, G.; QUEIROZ, A.C.; QUEIROZ, A.P. et al. Estudo histopatológico do pâncreas de ratos intoxicados pelo veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.1, n.1, p.1-6, 2002.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GARCIA, B. I.; LOPEZ-GONZALEZ, I.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; ULENS, C.; TYTGAT, J.; FELIX, R.; DARSZON, A.; POSSANI, L. D. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.299, n.4, Dec 13, p.562-568, 2002.
- OLIVEIRA, L.L.; SOUZA, D.B.; ABÍLIO, E.J. et al. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, v.2, n.3, p.175-188, 2009.
- PARDAL, P.P.O.; CASTRO, L.C.; JENNINGS, E. et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v.36, n.3, p.349-353, 2003.
- PARRA, A.C.; TAVORA, J.P.F.; FERREIRA, R.A. et al. Alterações hematológicas durante a imunização e após sangria e plasmaferese em equinos de produção de soro hiperimune anticrotálico. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.4, p.1225-1230, 2009.
- PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.V. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, v.39, n.10, p.1495-1504, 2001.
- PESSINI, A.C.; SANTOS, D.R.; ARANTES, E.C. et al. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*, v.48, p.556-566, 2006.
- PESSINI, A.C.; SANTOS, D.R.; ARANTES, E.C. et al. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom

injected into rat paws. *Toxicon*, v.52, p.729-736, 2008.

PICCIONE, G.; ALBERGHINA, D.; MARAFIOTI, S. et al. Electrophoretic serum protein fraction profile during the different physiological phases in Comisana ewes. *Reproduction in domestic animals*, v.47, p.591-595, 2012.

PINTO, M.C.L.; MELO, M.M.; COSTA, M.E.R. et al. Hematological and biochemical profiles of rats submitted to experimental poisoning with *Tityus serrulatus* venom. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.2, p.350-356, 2010.

PINTO, M.C.L.; BORBOLETA, L.R.; MELO, M.B. et al. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon*, v.55, p.1132-1137, 2010.

POLIS, G. A. *The biology of scorpions*. Stanford: Stanford University, 1990.

POSSANI, L. D.; ALAGON, A. C.; FLETCHER, P. L. et al. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Archives of Biochemical and Biophysics*, v.180, n.2, p.394-403, 1977.

POSSANI, L. D. Structure of scorpion toxins. In: TU, A. T (Ed.). *Handbook of Natural Toxins, Insects, Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms*, v.2. New York:Marcel Dekker, 1984. p. 513-550.

POSSANI, L.D.; FLETCHER JUNIOR, P.L.; FLETCHER, M.; et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Memórias do Instituto Butantan*, v.54, n.2, p.35-52, 1992.

POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M. et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European Journal of Biochemistry*, v.264, n.2, p.287-300. 1999.

PUGH, D.G. *Sheep & Goat Medicine*. Philadelphia: Elsevier, 2002. 468p.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 5 ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2004.

RESENDE, F.C.B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S.I.A.C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. *Revista*

Brasileira de Alergia e Imunopatologia, v.27, n.3, p.116-124, 2004.

REVELO, M.P.; BAMBIRRA, E.A.; FERREIRA, A.P. et al. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, v.34, n.10, p.1119-1125, 1996.

REZENDE, N. A.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARAL, C. F. S. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? *Toxicon*, v.34, n. 7, p. 820-823, 1996.

RIBEIRO, E.L.; MELO, M.M., SILVA, E.F., MELO, M.B.; LABARRÈRE, C.R.; MERLO, F.A; VEADO, J.C.C. Avaliação clínica e cardiovascular de cães após inoculação experimental do veneno de *Tityus serrulatus*. *MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v. 16, p. 76-83, 2011.

RIBEIRO, E.L.; MELO, M.M.; PINTO, M.C.L. et al. Hemograma de cães submetidos ao envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.1, p.135-143, 2009.

RIBEIRO, E.L.; PINTO, M.C.L.; LABARRÈRE, C.R. et al. Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.55, p.1125-1131, 2010.

RIBEIRO, E.L.; MELO, M.M. Proteínas do soro sanguíneo de cães inoculados com veneno de *Tityus serrulatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.1, p.217-220, 2012.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. *Advances Cytopharmacology*, v.3, p.325-34, 1979.

RUSSEL, F.E.; TIMMERMAN, W.F.; MEADOWS, P.E. Clinical use of antivenin prepared from goat serum. *Toxicon*, v.8, p.63-65, 1970.

SAKATE, Michiko. Zootoxinas. In: SPINOSA, M.S.; GORNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. 2008.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3.ed. Belo Horizonte:

Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, 2007. 264p.

SANTANA, G. C.; FREIRE, A. C. T.; FERREIRA, A. P. L. et al. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the rat. *Toxicon*, v. 34, n. 9, p. 1063-1066, 1996.

SCHULTZ, R.A.; PRETORIUS, P.J.; TERBLANCHE, M. An electrocardiographic study of normal sheep using a modified technique. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.39, p.97-106, 1972.

SILVA, F.C.; PESGRAVE, O.A.F. *Manual de utilização de animais* –FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 54p. 2008.

SILVA, D.F.M; COSTA, J.N.; ARAÚJO, A.L. et al. Proteinograma sérico de cordeiros mestiços (Santa Inês x Dorper) do nascimento até o desmame: efeito do desenvolvimento etário e do monitoramento da ingestão do colostro. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.4, p.794-805, 2010.

SILVA, R.O.P; LOPES, A.F.; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*, v.18, n.2, p.116-122, 2008.

SJOSTROM, L.; AL-ABDULLA, I.H.; RAWAT, S. et al. A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon*, v. 32, p.427-433, 1994.

SMITH, D.C.; REDDI, K.R.; LAIG, G. et al. An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Vipera berus* envenoming. *Toxicon*, v.30, p.865-871, 1992.

SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.4, p.359-363, 2002.

SOFER, S.; SHALEV, H.; WEIZMAN, Z. et al. Acute pancreatitis in children following envenomation by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, v. 29, n.1, p. 125-128, 1991.

STILLS JR., H.F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal*, v.46, n.3, p.280-293, 2005.

TEIXEIRA JÚNIOR, A.L.; FONTOURA, B.F.; FREIRE-MAIA, L. et al. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, v.39, p.703-709, 2001.

THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, v.41, n.5, p.541-57. 2003.

THRALL, M. A. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 518p.

THOMPSON, J.P. Molestias imunológicas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4ed. Sao Paulo: Manole, 1997. p.2616-2666.

TÓRIO, R.; CANO, M.; MONTES, A. et al. Comparison of two methods for electrocardiographic analysis in Gallega sheep. *Small Rumin. Res.*, v.24, p.239-246, 1997.

TORRANCE, L. Serological methods to detect plant viruses: production and use of monoclonal antibodies. In: *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. p.7-33, 1992.

VEGA, R. C. R.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, v. 46, n. 8, p. 831-844, 2005.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.M. et al. *Tityus serrulatus* Hipotensis: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.371, p.515-520, 2008.

WAGNER, S.; CASTRO, M.S.; BARBOSA, J.A.R.G. et al. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon*, v. 41, p.737-745, 2003.

9)ANEXOS

Exame Físico dos Ovinos

Grupo:

Data do Exame:

Parâmetros avaliados				
Comportamento				
Frequência Cardíaca (FC)				
Frequência Respiratória (FR)				
Pulso Arterial				
Temperatura				
TPC				
Linfonodos				
Mov. Ruminais				
Mucosas				
Abscesso local da inoculação				
Aumento volume local inoculação				
Escore fecal				
Grau de desidratação dos animais				

Quadro 2: Parâmetros físicos avaliados em ovinos imunizados com PBS (G1), veneno bruto (G2) e detoxificado (G3) de *Tityus serrulatus*.

Legenda Exame Físico dos Ovinos					
Parâmetros avaliados	1	2	3	4	5
Comportamento	Normal	Deprimido	Apático		
Mucosas	Normal	Hipocoradas	Pálidas	Hipercoradas	Cianóticas
Escore Fecal	Normal	Pastosas	Aquosas		
Aumento volume local	Ausente	Presente			
Abscesso Local	Ausente	Presente			
Grau de desidratação	Normal	Leve	Moderada	Grave	

Quadro 3: Classificação dos parâmetros físicos avaliados em ovinos imunizados com PBS, veneno bruto e detoxificado de *Tityus serrulatus*.

Comportamento

Normal (1): cordeiro viril, que se alimenta e desempenha suas funções sem qualquer dificuldade.

Deprimido (2): cordeiro fraco, apetite comprometido, mas ainda permanece de pé.

Apático (3): cordeiro incapaz de se alimentar e levantar.

Mucosas(Dirksen et al., 1990; Jackson e Cockcroft, 2004):

Normocoradas (1): as mucosas oculares e oral devem ser de coloração rosa.

Hipocoradas (2): as mucosas adquirem tonalidade rosa mais claro.

Pálidas (3): as mucosas adquirem coloração branca.

Hipercoradas (4): as mucosas adquirem coloração vermelho vivo.

Cianóticas (5): as mucosas se tornam azul-violáceo.

Local de inoculação do antígeno:

Sem aumento de volume no local (1)

Aumento de volume local (2)

Abscesso no local de inoculação:

Sem formação de abscesso (1)

Abscedação (2)

Grau de desidratação dos animais:

Normal (1): olhos brilhantes e turgor de pele normal.

Leve (2): turgor de pele levemente reduzido, mucosa oral colando, com vasos episclerais injetados (entre 6 e 8% de perda de peso corporal).

Moderada (3): globo ocular levemente retraído, diminuição nítida do turgor de pele, mucosa oral seca (entre 8 e 10% de perda de peso corporal).

Grave (4): globo ocular bem retraído, diminuição acentuada do turgor de pele, focinho e cavidade oral frios (>10% de perda de peso corporal).