

Mariana Cunha Longuinhos Pinto

***Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*:
caracterização eletrocardiográfica e
laboratorial do envenenamento em ratos**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Martins Melo

**Belo Horizonte
UFMG – EV
2009**

P659t Pinto, Mariana Cunha Longuinhos, 1983-
Tityus fasciolatus e *Tityus serrulatus*: caracterização eletrocardiográfica e laboratorial do envenenamento em ratos / Mariana Cunha Longuinhos Pinto. - 2009.
52 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

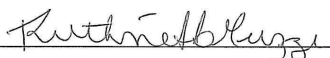
1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Escorpião – Veneno – Teses.
3. Envenenamento – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.088 5

Dissertação defendida e aprovada em 05 de Fevereiro de 2009, pela
Comissão Examinadora constituída por:



Professora Dr.^a Marília Martins Melo
(Orientadora)



Professora Dr.^a Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi



Professor Dr. Roberto Baracat de Araújo

*“... a verdadeira beleza do descobrimento
não consiste em buscar novas paisagens
mas em possuir novos olhos...”*
Marcel Proust

Agradecimentos

À meus pais Teresinha e Júlio, pelos treinamentos intermináveis, carinho e paciência! Amo vocês!!

À minha querida irmã Luciana pelo auxílio incansável, revisões e disponibilidade, afinal, não seria qualquer irmã que transportaria nossos escorpiões com tão bom humor...

Ao meu amado padrinho, Marcus Vinicius Pinto, o culpado por tudo!!! Agradeço por ter apostado em mim e por estar presente em todos os momentos, incentivando-me e alegrando meus dias!

À minha orientadora, mãezona e exemplo, Professora Marília Martins Melo, pessoa com a qual tenho imenso prazer em conviver e trabalhar. Agradeço pela orientação impecável e ensinamentos que levarei para a vida!

À Márcia Elisa Resende Costa, quem dividiu comigo dias de trabalho, mas também de muita diversão!

Aos colegas da Pós-Graduação: Durval Verçosa Júnior pela valiosa companhia, troca de idéias e auxílio nas coletas de sangue! Eduardo Lara Ribeiro, pelas experiências compartilhadas; Catarina Guimarães Rocha Dourado Silva, Liza Figueiredo Felicori Vilela, Paula Batista Fernandes, Simone Machado Mendes de Souza, Telma Maria Alves, Karina Murta, Gissandra Faria Braz, Fátima Maria Caetano Caldeira, Cíntia Almeida de Souza, Luana Rodrigues e Ana Flávia Carvalho Ribeiro.

Aos alunos da Iniciação Científica Carla Rosa Labarrére, Stella Cintie Silva, Felipe Augusto Silva e Victória Fonseca Bringhamti, agradeço pela grande colaboração.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Ituiutaba, na pessoa dos senhores Maria Izabel Plazzi, Rosália Prado de Faria e Luiz Humberto pela doação dos escorpiões utilizados neste trabalho.

Aos professores Francisco Carlos Faria Lobato, Zélia Inês Lobato Portela, Andrey Pereira Lage, Rômulo Cerqueira Leite, Valentim Arabicano Gheller, Eliane Gonçalves de Melo, Fabíola de Oliveira Paes Leme, Rogéria Serakides, e Ivan Barbosa Machado Sampaio, pelo auxílio na execução deste trabalho.

À Mariângela Lozano Cruz, a Neca, pelos valiosos ensinamentos no procedimento anestésico dos animais.

Ao Oscar Henriques Rocha, pelo empréstimo do aparelho de anestesia inalatória com imensa boa vontade e confiança.

Ao Marcos Barrouim Melo, por tamanha colaboração desde o experimento piloto até as discussões finais dos eletrocardiogramas, por me destinar valiosos momentos em nossas reuniões!

Ao Danilo Barros, da UPD, pela disponibilidade e cuidado na execução da análise estatística.

À Sra Amedorina Ferreira da Cunha, Sr. Ronaldo Nascimento, Renata Fonseca Peixoto, Jacqueline, aos enfermeiros e funcionários do Hospital, pela preciosa ajuda independente da hora!

Aos animais utilizados neste trabalho, minha eterna gratidão... por todo aprendizado, valiosas informações geradas que certamente auxiliarão na manutenção da vida de outros pacientes e fornecerão base para o desenvolvimento de pesquisas futuras! Palavras jamais seriam suficientes para demonstrar meu amor e apreço a vocês que, em silêncio, tanto me ensinaram...

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos. Ao CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 OS ESCORPIÕES.....	13
2.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES NO BRASIL.....	13
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	13
2.4 O VENENO DOS ESCORPIÕES.....	14
2.5 CONSEQÜÊNCIAS CLÍNICAS.....	16
2.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 VENENOS.....	20
4.1.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA.....	20
4.1.2 SDS-PAGE.....	20
4.2 ANIMAIS E LOCAL.....	20
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS.....	22
4.4 EXAMES ELETROCARDIOGRÁFICOS.....	22
4.5 COLETAS DE SANGUE E ANÁLISES LABORATORIAIS.....	22
4.5.1 HEMATOLOGIA.....	22
4.5.2 ELETROFORESE.....	23
4.5.3 BIOQUÍMICA SÉRICA.....	23
4.6 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	23
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO I.....	23
5.1 VENENOS.....	23
5.2 OBSERVAÇÕES GERAIS APÓS O ENVENENAMENTO.....	24
5.3 ELETROCARDIOGRAFIA.....	26
5.4 HEMATOLOGIA.....	28
5.5 BIOQUÍMICA SÉRICA.....	30
5.6 AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS.....	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO II.....	35
6.1 OBSERVAÇÕES GERAIS APÓS O ENVENENAMENTO.....	35
6.2 ELETROCARDIOGRAFIA.....	36
6.3 HEMATOLOGIA.....	39
6.4 BIOQUÍMICA SÉRICA.....	41
6.5 AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS.....	43
7. CONCLUSÕES.....	45
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios de hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	28
Tabela 2 - Contagens médias de leucócitos totais, neutrófilos, <i>ring cell</i> e linfócitos de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	28
Tabela 3 - Contagens individuais de leucócitos totais de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	29
Tabela 4 - Contagens médias de bastonetes, monócitos e eosinófilos de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	29
Tabela 5 - Contagens médias plaquetas de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	30
Tabela 6 - Valores médios de proteínas totais, albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas e gama-globulinas de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	30
Tabela 7 - Valores médios de creatina quinase (CK), isoenzima cardíaca (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato-aminotransferase (AST) de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	30
Tabela 8 - Valores séricos individuais de creatina quinase (CK), isoenzima cardíaca (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato-aminotransferase (AST) de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	31
Tabela 9 - Valores médios de uréia e creatinina de ratos do grupo I (placebo) e II(veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	32
Tabela 10 - Valores médios de amilase, insulina, cortisol e glicose de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>).....	33
Tabela 11 - Valores médios de hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de ratos dos grupos A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	39
Tabela 12 - Contagens médias de leucócitos totais, neutrófilos, <i>ring cell</i> e linfócitos de ratos do	

grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	39
Tabela 13 - Contagens médias de bastonetes, eosinófilos, basófilos e monócitos de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	40
Tabela 14 - Contagens médias de plaquetas de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	40
Tabela 15 - Valores médios de proteínas plasmáticas totais, albumina, alfa, beta e gama-globulinas de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	41
Tabela 16 - Valores médios de creatina quinase (CK), isoenzima cardíaca (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato-aminotransferase (AST) de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	41
Tabela 17 - Valores séricos individuais de creatina quinase (CK) e isoenzima cardíaca (CK-MB) de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	41
Tabela 18 - Valores médios de uréia e creatinina de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	42
Tabela 19 - Valores individuais séricos de uréia e creatinina de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	42
Tabela 20 - Valores médios de amilase, insulina, cortisol e glicose de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> /rato) e C (450µg do veneno de <i>T. serrulatus</i> /rato).....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A. Exemplos da espécie <i>Tityus fasciolatus</i> mostrando o dimorfismo sexual.....	15
Figura 1B. Exemplo da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	15
Figura 1C. Distribuição mundial dos escorpiões.....	15
Figura 2A. Terrários de vidro em que foram mantidos os escorpiões.....	21
Figura 2B. Extração do veneno.....	21
Figura 2C. Imagem dos ratos Wistar utilizados no trabalho.....	21
Seção 3. Manifestação clínica dos animais do GII após o envenenamento: Figura 3A. Postura corporal encurvada adotada por até 8h. Figura 3B. Secreção oro-nasal serosa.....	25
Seção 4: Traçados eletrocardiográficos dos ratos após envenenamento por <i>T. fasciolatus</i> : Figura 4A. Aumento da frequência cardíaca (700bpm). Figura 4B. Silêncio atrial. Figura 4C. Parada sinusal. Figura 4D. Complexo supraventricular prematuro. Figura 4E. Onda rS. Figura 4F. Aumento onda T.....	27
Seção 5. Alterações macroscópicas e histopatológicas dos pulmões de animais do GII. Figura 5A. Hemorragia petequial multifocal. Figura 5B. Congestão moderada e hemorragias multifocais. Figura 5C. Hemácias na luz dos alvéolos.....	34
Seção 6. Manifestação clínica dos animais dos grupos B e C após o envenenamento. Figura 6A. Intensa secreção oro- nasal. Figura 6B. Edema de pálpebra observado em animais do grupo C. Figura 6C. Secreção ocular bilateral escura.....	36
Seção 7: Traçados eletrocardiográficos dos ratos após envenenamento por <i>T. serrulatus</i> . Figura 7A. Aumento da onda T. Figura 7B. Onda rS. Figura 7C. Complexos ventriculares pré-maturos. Figura 7D. Bradicardia aos 25 minutos. Figura 7E. Bradicardia acentuada aos 30 minutos.....	38
Seção 8. Alterações macroscópicas e histopatológicas dos pulmões dos animais dos grupos B e C. Figura 8A. Hemorragia intensa e difusa nos lobos craniais e caudais. Figura 8B. Congestão moderada. Figura 8C. Presença de hemácias na luz dos alvéolos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato amino-transferase
AV	Atrioventricular
BAV	Bloqueio atrioventricular
BPM	Batimentos por minuto
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CK	Creatina quinase
CK-MB	Isoenzima cardíaca da enzima creatinaquinase
cTnI	Troponina I cardíaca
DL ₅₀	Dose letal 50
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC	Frequência cardíaca
HGM	Hemoglobina globular média
IL	Interleucina
INF- γ	Intorferon- γ
IRA	Insuficiência renal aguda
LDH	Lactato desidrogenase
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PT	Proteínas totais
SA	Nodo Sinoatrial
SEE	Síndrome do Envenenamento Escorpiônico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
VD	Ventrículo direito
VG	Volume globular
VGM	Volume globular médio
VPC	Complexo ventricular pré-maturo

RESUMO

O escorpionismo é problema de saúde pública e apresenta letalidade elevada relacionada a indivíduos jovens. Todavia poucos são os estudos sobre o tema em Medicina Veterinária. Diante desse contexto, objetivou-se caracterizar o envenenamento por *Tityus fasciolatus*, espécie endêmica no Triângulo Mineiro e Brasil Central (experimento I) e por *T. serrulatus*, principal espécie do país (experimento II). No experimento I, 12 ratos Wistar machos, 130g, foram distribuídos em dois grupos (n=6): 400µl de placebo (controle); e 300µg do veneno de *T. fasciolatus*/animal. No experimento II, outros 15 animais foram distribuídos em três grupos (n=5): 400µl de placebo (controle); 100µg do veneno de *T. serrulatus*/animal; e 450µg do veneno/animal. Nas duas etapas realizaram-se eletrocardiogramas antes e a cada 5 min durante os primeiros 30 min após o envenenamento, perfil sanguíneo (hematologia, eletroforese e bioquímica sérica), e avaliações histopatológicas do cérebro, pulmões e coração. Todos os animais envenenados apresentaram dor imediata à inoculação; alterações do ECG sugestivas de desequilíbrio eletrolítico, miocardite e interferências no tecido de condução; neutrofilia e lesão de miocárdio; e hemorragias pulmonares. Redução de insulina e insuficiência renal aguda ocorreu nos animais envenenados por *T. serrulatus*. Conclui-se que os venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus* causaram alterações cardiorrespiratórias em ratos recém-desmamados.

Palavras-chave: *T. fasciolatus*, *T. serrulatus*, rato, envenenamento, eletrocardiografia, perfil sanguíneo.

ABSTRACT

Scorpion sting is a public health problem and causes high lethality in young individuals. This study was performed to characterize the envenomation by Tityus fasciolatus, endemic specie in Minas Gerais State and Brazil Central (study I) and by T. serrulatus, the most important specie in Brazil (study II). Twelve male Wistar rats, 130g, were distributed into two groups (n=6): 400µl placebo (control group), and 300µg of T. fasciolatus venom/animal to perform study I. Other 15 animals were distributed into three groups (n=5): 400µl placebo (control group); 100µg of T. serrulatus venom/animal; and 450µg/animal, for the study II. Electrocardiographic exams were performed before and every 5 min during 30 min after envenomation, blood profile (hematology, electrophoresis and serum biochemistry), macroscopic and microscopic alterations in brain, lungs and heart. All envenomated animals showed pain immediate, ECG changes suggesting electrolytic imbalance, myocarditis and action in conduct tissue; laboratorial results showed neutrophilia and myocardial damages; and pulmonary hemorrhages. Low insulin levels and acute renal failure occurred in rats inoculated with T. serrulatus venom. In conclusion, T. fasciolatus and T. serrulatus venoms caused cardiorespiratory changes in young rats.

key-words: *T. fasciolatus*, *T. serrulatus*, rat, envenomation, electrocardiography, blood profile.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes com animais peçonhentos, ou envenenamentos, possuem lugar de destaque na clínica médica humana e veterinária devido à frequência de ocorrência e porque, em grande parte, resultam em quadros graves. Dentre esses, destaca-se o escorpionismo, envenenamento causado por escorpiões. O escorpionismo representa problema de saúde pública em países de clima tropical e sub-tropical, especialmente em áreas urbanas por fornecerem condições ambientais ótimas para o desenvolvimento dos escorpiões.

Segundo o Ministério da Saúde, ocorreram no Brasil 10.000 acidentes humanos no ano de 1998, com taxa de mortalidade de 1,1%, porém quando computada a taxa de mortalidade infantil, ultrapassou 10%. No ano de 2001, este total passou para 18.000 e em 2006 dobrou-se o número de notificações, atingindo 36.000 pessoas.

É estimado que 30% dos casos registrados ocorrem no estado de Minas Gerais. O setor de Toxicologia do Hospital de Pronto-Socorro João XXIII, em Belo Horizonte, é uma referência no atendimento de urgência de envenenamentos e intoxicações de naturezas diversas. Segundo levantamento relativo ao ano de 2008, o escorpionismo apareceu como o primeiro lugar das ocorrências, indicando, portanto, a sua grande importância.

Embora se observe anualmente um crescente número de acidentes escorpionicos humanos, na Medicina Veterinária não existe um centro de controle e notificação dos casos, sendo, portanto, desconhecida a real situação epidemiológica. Acredita-se que, pelo fato de os animais domésticos coabitarem com o homem, a incidência deste envenenamento seja semelhante.

As espécies de interesse toxicológico no Brasil pertencem ao gênero *Tityus*, com distribuição por todo o território nacional. A mais importante em termos de

ocorrência e número de envenenamentos é a *Tityus serrulatus*. As demais apresentam caráter endêmico, representando problema nas regiões de sua ocorrência. Dentre elas, destaca-se a espécie *Tityus fasciolatus*, presente no estado de Minas Gerais (Triângulo Mineiro), especialmente na cidade de Ituiutaba, e em Goiás, sendo responsável por grande número de acidentes.

O veneno dos escorpiões é uma complexa mistura de proteínas associadas a pequenas quantidades de aminoácidos e sais. Contém mais de 10.000 toxinas, principalmente neurotoxinas, das quais se conhece apenas 1%. Além da importância do conhecimento dos constituintes do veneno e suas consequências no organismo humano e animal para estabelecimento da conduta clínica adequada e do prognóstico, nos últimos anos vem sendo dado grande destaque ao potencial terapêutico de frações isoladas de venenos animais, entre eles do escorpião.

Poucos são os trabalhos científicos que abordam o tema “escorpionismo” em Medicina Veterinária, o que motivou nossa equipe a iniciar as pesquisas sobre os efeitos do envenenamento por *T. serrulatus* (Labarrère et al., 2007a e b, Merlo et al., 2007a e b; Ribeiro, 2008; Labarrère et al., 2008a e b; Ribeiro et al., 2009). Porém, não se sabe sobre o mecanismo de ação do veneno de *T. fasciolatus* sobre o sistema cardiorrespiratório, especialmente sobre o eletrocardiograma, células sanguíneas e diferentes tecidos, causando alterações histológicas e no perfil sanguíneo.

Diante desse contexto, torna-se imperativo o estudo do envenenamento escorpionico, o qual poderá fornecer informações aplicáveis inclusive à medicina humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os envenenamentos escorpionicos são tema de grande preocupação em

diversos países do continente americano, em especial o Brasil, além de Ásia e África alterações clínicas graves e até mesmo fatais, principalmente em indivíduos jovens. A gravidade é relacionada a alterações hemodinâmicas e cardiorrespiratórias (Cupo e Hering, 2002).

Cerca de 1400 espécies pertencentes a 18 famílias já foram descritas (Lourenço, 2001). A maior e mais importante em termos toxicológicos é a família *Buthidae*, à qual pertencem os gêneros *Androctomus*, *Buthus*, *Centruroides*, *Leiurus* e *Tityus*. Apesar das diferenças zoológicas, que resultam em específica estrutura química dos respectivos venenos, a sintomatologia clínica é bastante similar (Murthy, 1999).

2.1 Os Escorpiões

Os escorpiões são seres primitivos, datados de mais de 450 milhões de anos. São apontados como as primeiras criaturas a habitarem o ambiente terrestre devido a suas características rudimentares. Pertencem ao filo *Arthropoda*, subfilo *Chelicerata*, classe *Arachnida*. Apresentam membros articulados e corpo segmentado, envolto pelo exoesqueleto de quitina que evita perda de líquido do organismo. Tal característica lhes assegura capacidade de se adaptarem a condições ambientais adversas, podendo suportar longos períodos de privação hídrica e alimentar (Melo et al., 2004b). Na extremidade da cauda, encontra-se o télson, onde se localizam as glândulas produtoras e armazenadoras do veneno, além do aguilhão, responsável pela sua inoculação (Dias et al., 2001). O hábitat dos escorpiões é preferencialmente entulhos, pedras, frestas, esgotos ou locais em que haja alimentação farta, composta principalmente de insetos (Melo et al., 2004b). A reprodução pode ser sexuada, como no caso do *T. fasciolatus*, com dimorfismo sexual (Figura 1A), ou assexuada, por partenogênese, típica da espécie *T. serrulatus*. Os escorpiões vivem até cinco anos e cada fêmea pode gerar de

devido à incidência e potencial de causar seis a 90 filhotes por parição (Lourenço et al., 1996; Melo et al., 2004b).

2.2 Principais espécies no Brasil

Apesar do grande número de espécies catalogadas, apenas 25 destas são capazes de provocar envenenamentos com conseqüências clínicas importantes (Pardal et al., 2003). No Brasil são encontrados cinco gêneros pertencentes à família *Buthidae*, quais sejam *Ananteris*, *Isometrus*, *Microtityus*, *Rhopalurus* e *Tityus*, sendo o último o mais importante (Lourenço et al., 1996). As principais espécies são: *Tityus serrulatus*, encontrado na região Sudeste, Bahia, Pará e Goiás (Soares et al., 2002); *Tityus bahiensis*, que ocorre da Bahia a Santa Catarina, e também no Mato Grosso do Sul; *Tityus stigmurus* e *T. cambridgeis*, relatados no Nordeste e Norte, respectivamente (Lourenço et al., 1996); e *Tityus fasciolatus*, presente na região central do país, principalmente no Triângulo Mineiro e Distrito Federal (Wagner et al., 2003).

Dentre essas, a mais encontrada no país é a *T. serrulatus* Lutz e Mello, 1922, de nome popular “escorpião amarelo” (Figura 1B). Ela causa a maioria dos acidentes, especialmente em Minas Gerais (Soares et al., 2002). Outra espécie de importância no país é a *Tityus fasciolatus*. Todavia, nenhum trabalho foi encontrado na literatura a respeito do envenenamento causado por este escorpião, envolvendo humanos e animais domésticos.

2.3 Epidemiologia

Os países localizados nas zonas tropicais (Figura 1C), como o Brasil, apresentam maiores problemas devido ao clima quente e úmido que favorece a sobrevivência dos escorpiões. Nas áreas urbanas, estes animais encontram disponibilidade de alimento, de locais para

habitar e ausência dos predadores naturais, como macacos, quatis, galinhas, corujas e sapos (Bücherl, 1969).

epidemiológico por meio do Programa Nacional de Controle dos Acidentes por Animais Peçonhentos, que regulamenta a notificação dos casos desde 1988. Com base nas informações desse programa, o Ministério da Saúde relata que ocorrem três casos para cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2001). Metade dos acidentes ocorre em Minas Gerais e São Paulo (Soares et al., 2002). Cupo et al. (2003) relataram 9228 atendimentos de vítimas de picadas de escorpiões no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (SP) no período de 1982 a 2000, sendo 75% causados pela espécie *T. serrulatus* e 9,5% por *T. bahiensis*. Na cidade de Ituiutaba (MG), 158 acidentes foram notificados entre 1995 e 1997, e alguns destes envolveram a espécie *T. fasciolatus* (Plazzi et al., 2000).

Segundo Soares et al. (2002), os acidentes escorpiônicos em Belo Horizonte entre 1990 e 1997 ocorreram predominantemente nos meses chuvosos, acometeram na maioria indivíduos do sexo masculino de faixa etária entre 25 e 65 anos, e os locais mais atingidos foram membros superiores. Em 2003, dos 6224 acidentes ocorridos em Minas Gerais, 1104 casos foram notificados em Belo Horizonte, com três mortes (Campolina, 2006). Este mesmo estudo indicou que em 2004 ocorreram 942 acidentes na capital mineira. Nestes dois anos, 99,1% dos envenenamentos foi causado pelo *T. serrulatus*.

Todas estas informações referem-se ao envenenamento humano. Em Medicina Veterinária, a epidemiologia dos casos é desconhecida em função da inexistência de um centro ou programa de controle específico.

2.4 O veneno escorpiônico

O veneno escorpiônico é de constituição complexa. Possui proteínas de variados pesos moleculares e cadeias curtas

Os envenenamentos envolvendo humanos no Brasil possuem controle

de aminoácidos, mucopolissacarídeos, lipídeos, hialuronidases e aminas bioativas (Couraud e Jover, 1984; Gazarian et al., 2005). Os principais constituintes são as neurotoxinas, que possuem baixo peso molecular, resistentes ao aquecimento e estabilizadas por pontes dissulfeto. São responsáveis por grande parte das alterações em função de sua ação de despolarização da membrana neuronal e liberação de neurotransmissores com resposta autonômica exacerbada, efeitos adrenérgicos e colinérgicos (Possani et al, 1999; Castro, et al., 2000; Vasconcelos et al., 2005).

Algumas toxinas são específicas para o canal iônico em que atua (Gazarian et al., 2005; Vega e Possani, 2005). As toxinas de canais de potássio e cloro são bloqueadoras, e as de sódio são estimuladoras (Batista et al., 2000). Além disso, estas últimas atuam em determinados sítios estruturais dos canais. As que atuam no sítio 1 levam à inibição da permeabilidade ao sódio. No sítio 2, à ativação anormal dos canais durante o potencial de repouso. Os sítios 3 e 4 reconhecem as alfa (α) e beta (β) neurotoxinas. As α -toxinas ligam-se ao sítio 3 e induzem prolongamento da fase de repolarização, enquanto as β -toxinas alteram o limiar de ativação do canal, interferindo, assim, no seu fechamento durante a repolarização

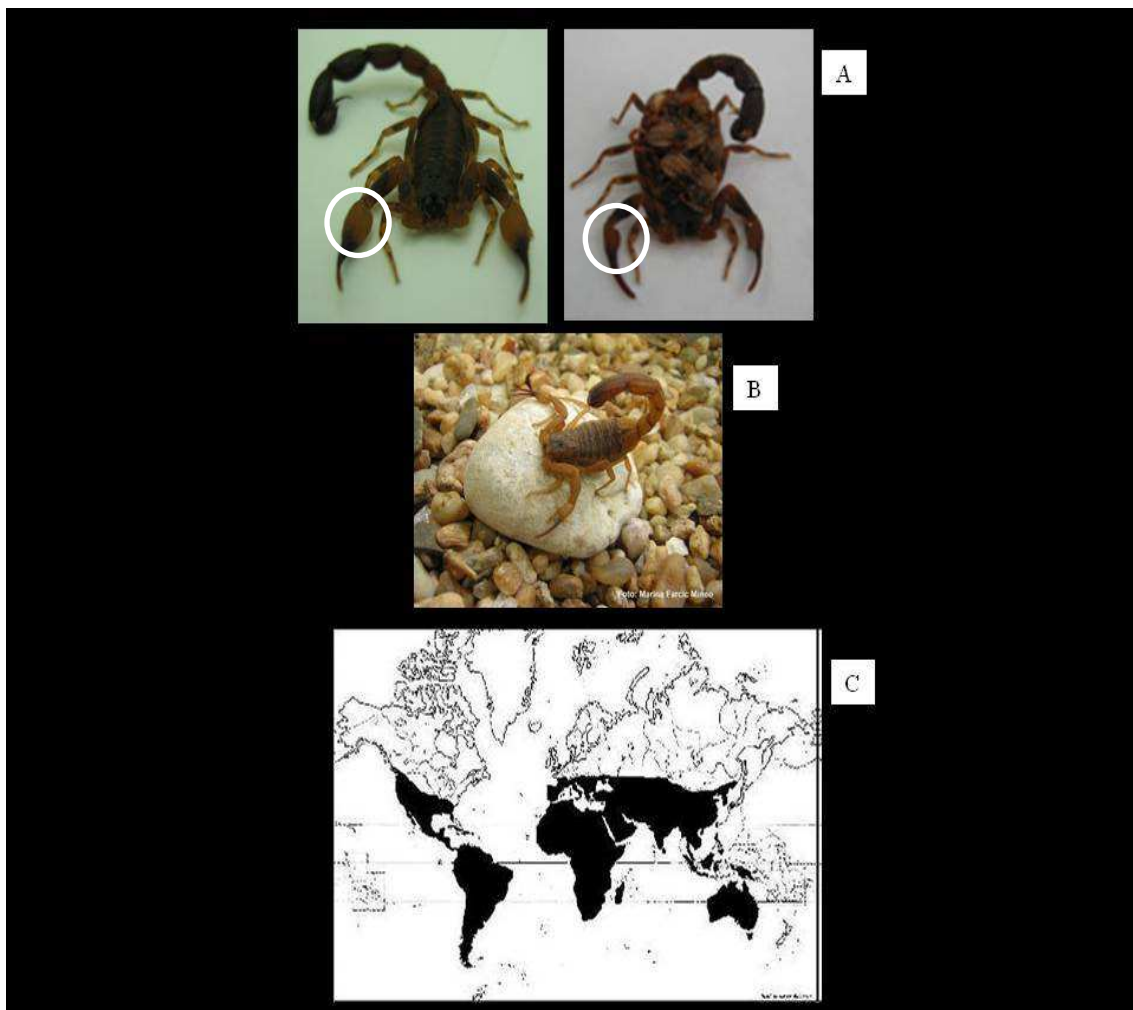


Figura 1A. Exemplares da espécie *Tityus fasciolatus* mostrando o dimorfismo sexual. À esquerda, um macho: último segmento do pedipalpo mais robusto que da fêmea, na figura à direita. Figura 1B. Exemplar da espécie *Tityus serrulatus*. Foto: Marina Farcic Mineo. Figura 1C. Distribuição mundial dos escorpiões (área escura do mapa). Fonte: Lourenço, 2001.

(Catteral, 1980; Couraud et al., 1982). As alfa-toxinas são ainda classificadas como α -clássicas, altamente tóxicas para mamíferos e apresentaram alta afinidade com sinaptossomos do cérebro de ratos; α -like, que atuam tanto em canais iônicos de mamíferos quanto de insetos, porém não demonstrou afinidade pelo tecido cerebral de ratos; e as insetos α -toxinas específicas (Bosmans & Tytgat., 2007).

Devido à presença de proteínas com atividade hialuronidásica, o veneno se difunde rapidamente e atinge diferentes

tecidos em curto intervalo de tempo. Santana et al. (1996) demonstraram que a absorção do veneno do local da inoculação para o sangue é rápida, bem como a distribuição para os tecidos. A afinidade pelos tecidos é alta, já a excreção é lenta, ocorrendo em tempo 5,5 vezes maior que a distribuição. Nunan et al., (2003 e 2004) verificaram que o veneno de *T. serrulatus* é absorvido e distribuído mais rapidamente em ratos jovens do que em adultos, e a eliminação se dá de forma mais lenta.

Com relação ao veneno de *T. fasciolatus*, pouco se sabe sobre sua estrutura e composição. Dois trabalhos foram encontrados na literatura consultada (Castro et al., 2000; Wagner et al., 2003). Estes estudos indicaram presença de uma neurotoxina, chamada Tf4, semelhante às toxinas TsTx-VI e TsNTxP do veneno de *T. serrulatus*.

Estudos sobre letalidade em camundongos dos venenos das principais espécies de interesse no Brasil determinaram as seguintes doses letais mínimas para 50% da população estudada: *T. fasciolatus* – 72,92µg/animal ou 3,646mg/kg (Wagner et al., 2003); *T. serrulatus* – 1,160mg/kg; *T. bahiensis* - 1,062mg/kg; *T. stigmurus* - 0,773mg/kg; *T. costatus* - 1,590mg/kg e *T. cambridgeis* - 12,136mg/kg (Nishikawa et al., 1994).

2.5 Conseqüências clínicas

O envenenamento escorpiônico pode ser classificado como discreto, moderado ou grave (Cupo e Hering, 2002). As alterações são decorrentes da liberação de acetilcolina e noradrenalina nas sinapses pós-ganglionares e adrenalina pela zona medular da adrenal (Freire-Maia e Ferreira, 1961; Ismail, 1995).

A manifestação clínica pode ser local ou sistêmica e apresentar-se com quadros adrenérgicos e/ou colinérgicos. Segundo Gueron et al. (1993) inicialmente observam-se sinais parassimpáticos que diminuem com o avançar do quadro. As manifestações cardiovasculares são as de maior relevância e determinam maior gravidade.

O sinal clínico mais precoce é a dor imediata à inoculação do veneno. É predominante no escorpionismo, e em alguns casos, pode ser acompanhada de hiperemia e edema discretos, sudorese e piloereção (Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Bucarechi et al., 1995; Ismail, 1995; Rezende et al., 1996; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004b). Nascimento et al. (2005)

e Pessini et al. (2008) mostraram atuação de resposta nociceptiva no mecanismo da dor no envenenamento por *T. serrulatus*.

A junção das conseqüências clínicas é denominada “Síndrome do Envenenamento Escorpiônico”. Além da interferência das catecolaminas em diferentes sistemas, muitos autores atribuem a SEE à resposta inflamatória evocada pelo veneno, que atua sinergicamente, por exemplo, no edema pulmonar e síndrome febril (Freire-Maia e Campos, 1987; Sofer et al., 1996; Fatani et al., 1998; Meki e El-dean, 1998; Magalhães et al., 1999; D’Suze et al., 2003; Fukuhara et al., 2003; Fukuhara et al., 2004; Pessini et al. 2006; Petricevich et al., 2007). No trato gastrointestinal observa-se aumento de secreções e da motilidade, resultando em dor abdominal. Perdas hídricas significativas por sialorréia, vômitos e diarréias podem levar a desidratação e desequilíbrio hidroeletrólítico (Freire-Maia et al., 1994; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004b). Cunha-Melo et al. (1983) demonstraram aumento das secreções decorrente de efeito colinérgico direto e em resposta à histamina liberada. Além disso, verificaram que o veneno de *T. serrulatus* é potente estimulador de secreção gástrica e de pepsina. Com isso podem ocorrer lesões ulcerativas na mucosa estomacal. Os eletrólitos envolvidos na SEE são principalmente sódio, potássio, cálcio e magnésio. Além das perdas gastroentéricas, o desequilíbrio pode decorrer da atuação do veneno nos canais iônicos.

A pancreatite é relatada em humanos como efeito colinérgico que culmina em aumento da função exócrina do órgão e consequente elevação dos níveis séricos de amilase, além de ampliar a dor abdominal (Bartholomeu, 1970; Sofer et al., 1991). A ativação exagerada das células acinares ocorre em função da interferência das neurotoxinas em canais de sódio, semelhante ao que ocorre nos neurônios. Estudos realizados em cães e ratos constataram, respectivamente, pancreatite hemorrágica (Machado e Silveira Filho, 1977)

e pancreatite aguda até 48 horas, e pancreatite crônica até 20 dias após o envenenamento por *T. serrulatus* (Novaes et al., 2002). Entretanto, estudo conduzido por Ribeiro (2008) em cães adultos não revelou dano pancreático no envenenamento pela mesma espécie de escorpião.

A pancreatite pode cursar com hiperglicemia, situação comum em envenenamentos humanos. Entretanto, seu desencadeamento envolve outros fatores, como efeito estimulante das catecolaminas à glicogenólise e gliconeogênese no tecido hepático (Murthy e Haghnazari, 1999). Cupo e Hering (2002) encontraram níveis plasmáticos de glicose até três vezes maior que o normal em vítimas de picadas, enquanto Bucarechi et al. (1995) verificaram dosagens na ordem de cinco vezes maior.

Leucocitose com neutrofilia é um achado comum em envenenamentos escorpiônicos e pode decorrer de resposta inflamatória em si ou pela a mobilização destes leucócitos do compartimento marginal como resposta fisiológica à dor.

Conforme mencionado, as alterações cardiovasculares são as mais relevantes no escorpionismo e responsáveis pelo óbito de muitos pacientes, especialmente de indivíduos jovens. São principalmente resultantes da descarga de catecolaminas e manifestam-se por alteração da pressão arterial com hipertensão e posterior choque hipotensivo, arritmias, taquicardia e/ou bradicardia, freqüentemente cursando com edema pulmonar (Freire-Maia e Campos, 1987; Gueron e Ovsyshcher, 1987; Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Gueron et al., 1992; Ismail, 1995). Adicionalmente, estudos indicam possível ação cardiotoxicidade direta do veneno escorpiônico (Ismail, 1995; Teixeira et al., 2001). Um exame complementar útil nos atendimentos a vítimas de acidentes é o eletrocardiograma, que pode indicar alterações como miocardite, hipóxia de miocárdio, arritmias, entre outras. Em humanos pode-se detectar variações no segmento ST e ondas Q nas derivações I e

aVL, fibrilação atrial ou ventricular, dissociação atrioventricular com ritmo juncional, complexos atriais e/ou ventriculares prematuros, marcapasso migratório, infra ou supradesnívelamento do segmento ST, bloqueios atrioventriculares (Gueron et al., 1967; Gueron e Yaron, 1970; Ismail et al., 1976; Campos et al., 1979; Gueron e Ovsyshcher, 1984; Brand et al., 1988; Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Amaral et al., 1991; Cupo et al., 1994, 2007; Freire-Maia et al., 1994; Bucarechi et al., 1995; Ismail, 1995; Cupo e Hering, 2002; Melo et al., 2004b). Além disso, o ECG pode apontar desequilíbrio eletrolítico, conforme relatado por Ismail (1995) que observou traçados condizentes com hipercalemia, hipocalcemia e hipomagnesemia.

A função respiratória pode ser afetada pela ocorrência de secreção nasal, tosse, espirros, dispnéia e edema pulmonar de origem cardiogênica ou não-cardiogênica, que representa a consequência mais grave do envenenamento (Campos et al., 1979; Cupo et al., 2003). Hipertensão arterial, falência cardíaca esquerda, aumento de permeabilidade vascular no pulmão provocado por mediadores inflamatórios, aumento do retorno venoso por ação de catecolaminas sobre o músculo liso de veias periféricas, e miocardite atuam no desencadeamento do edema (Gueron e Ovsyshcher, 1984, 1987; Freire-Maia e Campos, 1987; Ismail, 1995). Entretanto, existem relatos de edema pulmonar sem hipertensão, reforçando a hipótese da origem extra-cardíaca (Gueron e Ilia, 1996). O fator ativador plaquetário (PAF) parece estar envolvido na gênese do edema pulmonar (Coelho et al., 2007).

Nos casos mais graves o sistema nervoso é acometido, podendo ocorrer tremores e espasmos musculares, fasciculações, convulsões, letargia ou agitação, mioclonia, hemiplegia, opstótonos, inconsciência e coma. A vasoconstrição causada pelas catecolaminas no cérebro leva a hipóxia, congestão e infartos (Gueron et al., 1967; Campos et al., 1979; Ismail, 1995;

Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004b). Estas conseqüências são vistas principalmente em indivíduos jovens, considerados naturalmente mais sensíveis ao envenenamento escorpiônico.

2.6 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico é dado pela associação do histórico do paciente e suas manifestações clínicas, e achados laboratoriais.

Pode-se detectar o veneno na circulação sangüínea por meio do teste imunoenzimático de ELISA padronizado por Chávez-Olórtegui et al. (1994). Este teste determina a concentração de antígenos circulantes, auxiliando na soroterapia instituída e na avaliação da sua eficácia.

Provas laboratoriais que auxiliam no diagnóstico e acompanhamento incluem a determinação do perfil de enzimas indicadoras de lesão muscular como a aspartato-amino transferase, lactato desidrogenase, creatina quinase e sua isoenzima CKMB, marcadora de dano da musculatura cardíaca.

A AST é uma enzima presente nas mitocôndrias dos miócitos e hepatócitos utilizada como marcadora de lesões principalmente de origem muscular. Sua meia-vida na circulação é de 5 a 12h.

A LDH apresenta várias isoenzimas presentes em eritrócitos, hepatócitos, musculatura estriada esquelética, principalmente em músculos de contração rápida. Sendo assim, alterações diversas podem levar a aumentos na concentração da LDH que, por apresentar pouca especificidade, deve ser utilizada em associação a outras enzimas para determinar lesão tecidual (Kramer e Hoffmann, 1997).

CK é uma das principais marcadoras de lesão muscular utilizada devido à sua localização específica e atuação no funcionamento do tecido. (Cardinet, 1997; Kramer e Hoffmann, 1997; Thompson, 1997). Sua meia-vida é de poucas horas na circulação.

Assim como a LDH, a CK apresenta isoenzimas: CK-MM presente na musculatura estriada esquelética e cardíaca, CK-BB presente no cérebro, e CK-MB que se encontra principalmente no miocárdio. A fração MB vem sendo cada vez mais utilizada especificamente para indicar lesões cardíacas em humanos causadas por infarto do miocárdio (Hetland e Dickstein, 1998; Ooi et al., 2000) e na Síndrome do Envenenamento Escorpiônico (Cupo e Hering, 2002; Cupo et al., 2003; Meki et al., 2003). Quando ocorre dano tecidual, a CK-MB começa a ser liberada em 3h, e seu pico de concentração na circulação ocorre entre 8 e 30h, retornando aos valores basais entre 48 e 72h.

Já a troponina I (cTnI) é uma subunidade da proteína estrutural muscular, a troponina. (Cardinet, 1997). Segundo dados da literatura humana, a troponina I encontrada no miocárdio também pode ser empregada no diagnóstico de lesões indetectáveis por métodos enzimáticos convencionais (Bodor et al., 1992; Cupo e Hering, 2002; Meki et al., 2003; Diniz et al., 2007). A cTnI é liberada na corrente circulatória após 4 a 6 horas da lesão, e permanece elevada por até 6 a 10 dias.

O proteinograma também pode auxiliar no diagnóstico laboratorial do envenenamento, indicando patologias sistêmicas que acarretam em alteração da concentração protéica no organismo. As proteínas plasmáticas estão envolvidas nos processos de nutrição celular, transporte de íons e moléculas, e principalmente na manutenção da pressão osmótica. A técnica de eletroforese promove a separação das proteínas totais em duas frações principais, albumina e globulinas, sendo estas divididas em três sub-frações: alfa, beta e gama-globulinas. A albumina é a mais abundante, correspondendo a quase 50% das PT. É importante na regulação e manutenção da pressão osmótica do sangue, além de atuar no transporte de compostos e na solubilização de substâncias. O grupo das α -globulinas é composto por α -1-

glicoproteína-ácida, α -antiquimotripsina; α -2-macroglobulina, naturalmente elevada em crianças e idosos; α -1-antitripsina, a mais importante e responsável por neutralizar enzimas proteolíticas bacterianas ou leucocitárias da inflamação; e a haptoglobina, que aparece reduzida em quadros de hemólise e representa as principais proteínas de fase aguda nos processos inflamatórios. Já as β -globulinas ou transferrinas realizam o transporte de ferro no plasma, diminuem nas hepatopatias crônicas e também participam de processos inflamatórios agudos. Gama-globulinas são glicoproteínas que atuam na resposta antigênica. Correspondem às imunoglobulinas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

O tratamento é feito por meio de soroterapia, visando neutralizar a toxina circulante e combater os sintomas. A dor local pode ser tratada com analgésicos, e as correções do desequilíbrio hidroeletrolítico por fluidoterapia. Entretanto, o soro anti-escorpiônico não está disponível na Medicina Veterinária, devendo-se estabelecer terapia de suporte às funções vitais e no controle da dor dos animais acometidos (Melo et al., 2004b).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o quadro clínico causado por diferentes doses de venenos dos escorpiões *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus* em ratos recém-desmamados.

3.2 Objetivos específicos

Parte I. *Tityus fasciolatus*

- Traçar o perfil eletrocardiográfico de ratos recém-desmamados durante os primeiros 30 minutos após inoculação de 300 μ g/animal do veneno de *Tityus fasciolatus*;

- Determinar os perfis hematológico, protéico eletroforético e bioquímico sérico dos ratos oito horas após inoculação de 300 μ g/animal do veneno de *Tityus fasciolatus*;
- Avaliar macroscópica e microscopicamente o cérebro, pulmões e coração dos ratos, oito horas após inoculação de 300 μ g/animal do veneno de *Tityus fasciolatus*;

Parte II. *Tityus serrulatus*

- Traçar o perfil eletrocardiográfico de ratos recém-desmamados durante os primeiros 30 minutos após inoculação de 100 μ g/animal e 450 μ g/animal do veneno de *Tityus serrulatus*;
- Determinar os perfis hematológico, protéico eletroforético e bioquímico sérico dos ratos 40 minutos após inoculação de 100 μ g/animal e 450 μ g/animal do veneno de *Tityus serrulatus*;
- Avaliar macroscópica e microscopicamente o cérebro, pulmões e coração dos ratos 40 minutos após inoculação de 100 μ g/animal e 450 μ g/animal do veneno de *Tityus serrulatus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

- COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Este projeto foi realizado após avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), sob protocolo número 171/08, de 14 de março de 2008. Todos os procedimentos adotados obedeceram às normas e recomendações deste Comitê.

4.1 Venenos

Os venenos foram extraídos de exemplares das espécies *T. fasciolatus* e *T. serrulatus* cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Ituiutaba/ MG e mantidos no laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG em terrários apropriados (Figura 2A).

O método de extração empregado foi manual, conforme recomendado pelo Prof. Dr. Chávez-Olórtegui¹ que consiste em compressão do telson em papel parafilme, perfuração deste pelo agulhão e liberação das gotículas do veneno na superfície do papel (Figura 2B). As gotículas foram recolhidas utilizando-se pequenos volumes de água ultra-pura, e agrupadas para a formação do *pool* dos respectivos venenos que, em seguida, foram liofilizados.

4.1.1 Determinação da concentração protéica

Os venenos foram retomados em 1ml de água ultra-pura para dosagem de proteínas por meio da técnica descrita por Lowry (1951) adaptada para placas de ELISA. Em seguida, foram estocados a -20°C em tubos tipo ependorff em alíquotas de 100µl até o momento da utilização.

4.1.2 SDS-PAGE

Foi padronizado o gel SDS poliacrilamida na concentração de 12% para o gel de separação, composto de água ultra-pura, solução acrilamida/bisacrilamida a 30%, Tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS a 10%, persulfato de amônia a 10% e Temed 0,025%. O gel de concentração foi padronizado a 4%, e seus constituintes são os mesmos, alterando-se apenas o Tris-HCl, neste caso de pH 6,8. Os géis foram

preparados em placas de vidro de 10 X 8 X 8cm.

A corrida eletroforética ocorreu verticalmente por aproximadamente uma hora sob corrente de 150V e 40mA, e após os géis foram corados com Comassie Blue. Em seguida, foram descorados (metanol, ácido acético e água destilada) revelando-se, assim, as bandas protéicas de cada veneno. Como marcador de referência, utilizou-se peso molecular *BenchMark Protein Ladder*².

4.2 Animais e local

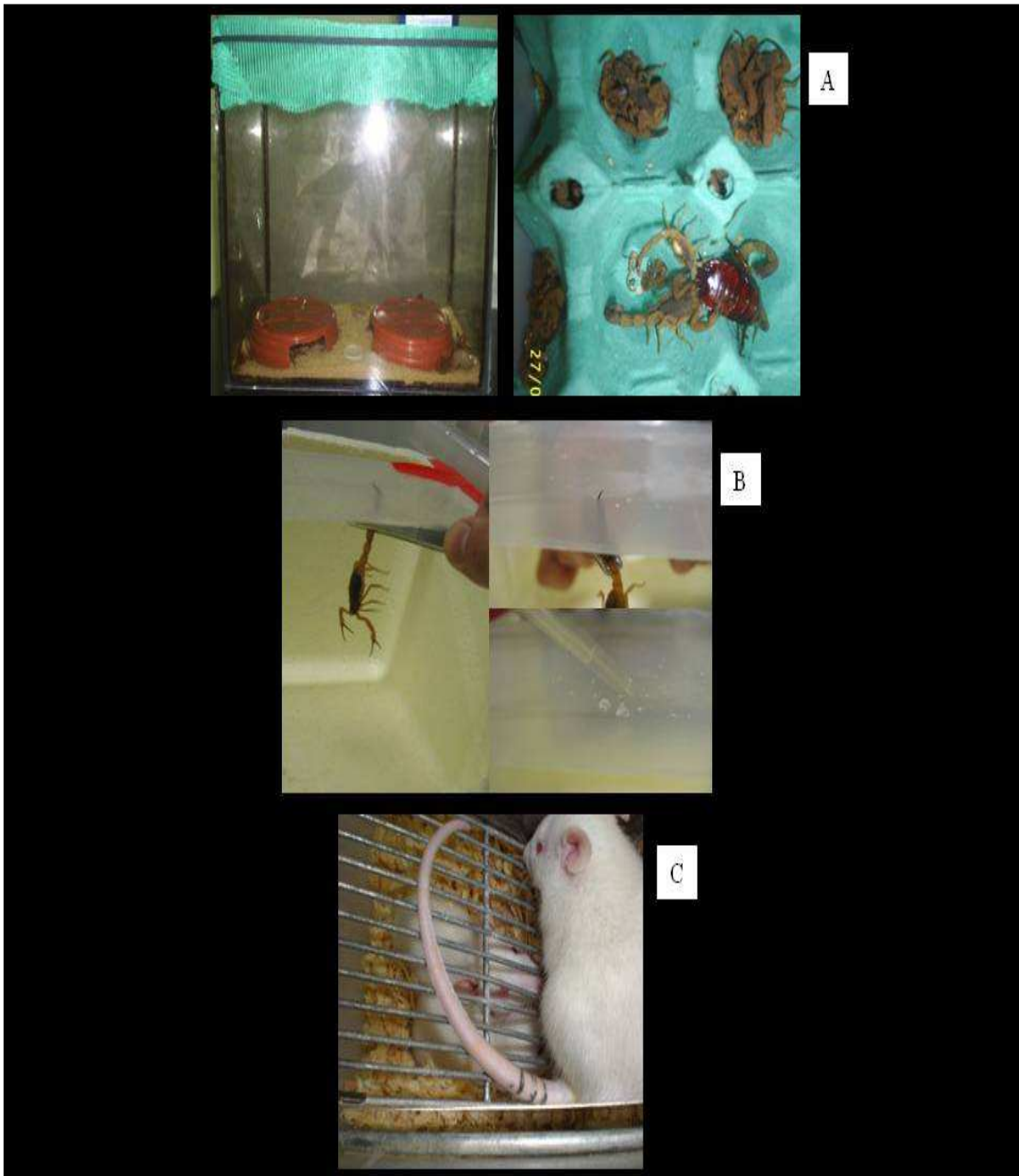
O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na caracterização do envenenamento por *T. fasciolatus*, na qual se utilizaram 12 ratos Wistar machos (Figura 2C) recém-desmamados, peso médio de 130g (110-150g), oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO), acomodados em caixas de 40 X 45 X 25 cm, mantidos nas dependências do Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG, recebendo alimentação à base de ração comercial³ e água *ad libitum*. No momento de realização dos exames eletrocardiográficos, eram alocados no consultório de cardiologia do Hospital Veterinário da UFMG.

Para a segunda etapa, que consistiu na caracterização do envenenamento por *T. serrulatus* com duas doses distintas do veneno, utilizaram-se 15 ratos da mesma

¹ Comunicação pessoal. Professor Carlos Delfin Chávez-Olórtegui, Departamento de Bioquímica e Imunologia- ICB/ UFMG.

² INVITROGEN - Carlsbad, Califórnia, USA

³ Labina- ração para animais de laboratório® - PURINA



Seção 2: *Figura 2A.* Terrários de vidro em que foram mantidos os escorpiões utilizados. *Figura 2B.* Extração do veneno; compressão do télson em papel parafilme, perfuração do papel, e obtenção das gotículas do veneno. *Figura 2C.* Imagem dos ratos *Wistar* utilizados no trabalho.

linhagem, idade, peso, sexo e procedência dos animais da etapa anterior, mantidos sob as mesmas condições e submetidos aos mesmos procedimentos.

4.3 Grupos experimentais e tratamentos

Na primeira etapa, foram formados aleatoriamente dois grupos experimentais (G) contendo seis indivíduos cada (n=6), sendo GI – controle, recebendo placebo; GII – veneno de *T. fasciolatus*. Ao GI foram administrados 400µl de água ultra-pura/animal. A dose de veneno administrada ao GII foi determinada em experimento piloto previamente realizado, baseando-se na DL₅₀ do veneno para camundongos (Wagner et al., 2003), diluída em igual volume de água utilizada para o GI.

Na segunda etapa, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais contendo cinco indivíduos cada (n=5), sendo grupo A – controle, recebendo placebo; grupo B – 100µg de veneno de *T. serrulatus*/animal; e grupo C – 450µg de veneno de *T. serrulatus*/animal, doses estas também determinadas em experimento piloto anterior. Novamente, ao grupo controle foram administrados 400µl de água ultra-pura/animal e os venenos foram diluídos em igual volume.

O local de inoculação nos animais de todos os grupos foi a região inter-escapular, pela via subcutânea, utilizando-se seringa hipodérmica descartável (insulina).

4.4 Exames eletrocardiográficos

As análises eletrocardiográficas foram realizadas em aparelho eletrocardiógrafo⁴ na derivação DII, com registro em papel eletrocardiográfico termo-sensível⁵, velocidade de 25 e 50mm/s e sensibilidades N e 2N, antes da

administração dos tratamentos e após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, em ambas as etapas.

Para isto, os animais foram mantidos sob anestesia geral inalatória⁶ utilizando-se como medicação pré-anestésica a associação entre morfina (2,5mg/kg) e diazepam (2,5mg/kg) (Flecknell, 1996) via intramuscular, e isoflurano para indução e manutenção da anestesia geral.

Os eletrodos foram conectados aos animais por meio de contato com agulhas descartáveis de acupuntura inseridas nos membros torácicos direito e esquerdo na altura da articulação úmero-radio-ulnar, e nos membros pelvicos direito e esquerdo na altura da articulação femoro-tibio-patelar para o registro eletrocardiográfico.

4.5 Coletas de sangue e Análises laboratoriais

Os grupos da primeira etapa foram submetidos às coletas de sangue oito horas após os tratamentos. Já na segunda etapa a coleta foi procedida após 40 minutos. Tal diferença entre os tempos de coleta foi decorrente da sensibilidade aos respectivos venenos pelos ratos.

Para isto, foi adotado protocolo anestésico utilizando-se associação de cloridrato de xilazina e quetamina na dose recomendada pelo CETEA, ou seja, 10mg/kg e 75mg/kg respectivamente, via intra-muscular. As amostras foram colhidas pela via intra-cardíaca em tubos sem anticoagulante e com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) a 10%.

4.5.1 Hematologia

Foram realizadas contagens totais de eritrócitos e leucócitos e concentração de hemoglobina em contador eletrônico⁷. Esfregaços sangüíneos foram

⁴ Eletrocardiógrafo ECG40 – FUNBEC

⁵ ECG – 48mm X 30m - CG Daru S/A

⁶ Aparelho de Anestesia Inalatória Metalvet Plus® - METALVET

⁷ Celm CC-530® - CELM

confeccionados em lâminas de vidro (26 X 79mm), fixados e corados com panótico⁸ para contagem diferencial de leucócitos e total de plaquetas de acordo com Ferreira Neto et al. (1982). O volume globular foi determinado utilizando-se centrífuga para microhematócrito⁹ e concentração das proteínas totais por refratometria¹⁰.

4.5.2 Eletroforese

O perfil protéico dos animais foi obtido utilizando-se filmes de agarose¹¹ em tampão Tris¹² para corrida eletroforética e coloração com amido black. Para determinação da concentração de albumina e globulinas utilizou-se software CELM SE-250.

4.5.3 Bioquímica sérica

O perfil bioquímico foi obtido por meio das dosagens séricas de creatina quinase e a isoenzima CK-MB, desidrogenase láctica, aspartato amino-transferase, uréia, creatinina, amilase e glicose por método colorimétrico cinético utilizando kits comerciais¹³ e leitura em espectrofotômetro¹⁴.

Dosagens de cortisol e insulina foram realizadas por radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais¹⁵ de fase-sólida marcada com ¹²⁵I e leitura em contador gama¹⁶; além de determinação semi-quantitativa de troponina por teste de imunocromatografia¹⁷.

⁸ Panótico Rápido LB® - LB

⁹ Micro Spin

¹⁰ Ningbo Utech International CO LTD

¹¹ Filme de Agarose Geral CELMGEL®-CELM

¹² Tampão Tris para eletroforese em CELMGEL® - CELM

¹³ Bioclin® E Synermed®

¹⁴ Cobas Mira Classic – ROCHE

¹⁵ Coat-a-Count® – DPC

¹⁶ COBRA II Auto Gama – PACKARD BIOSCIENCE COMPANY

¹⁷ Hexagon Troponin® - HUMAN

4.6 Avaliações histopatológicas

Após anestesia, os animais foram eutanasiados por hipovolemia pela punção cardíaca e foram necropsiados. Coletaram-se cérebro, pulmões e coração, posteriormente fixados em formol a 10% neutro tamponado e processados segundo técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet, 1992). Cortes histológicos de 4µm foram obtidos e corados pela hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica.

4.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram tabulados e analisados pelos programas de computador SAS (*Statistical Analysis System*) e SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas). Foram feitos testes de normalidade (Lillifors, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) e para as variáveis que apresentaram distribuição normal no primeiro experimento, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste F. Para as variáveis com distribuição não-normal foi aplicado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Para os resultados da segunda etapa, os mesmos testes de normalidade foram aplicados, e as variáveis de distribuição normal foram submetidas à ANOVA e comparação das médias pelo teste SNK. As variáveis não-paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal- Wallis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO I (*Tityus fasciolatus*)

5.1 Venenos

Os resultados do SDS-PAGE revelaram grande semelhança entre os venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*, indicada pelos perfis de corrida eletroforética e similaridade entre os pesos

moleculares dos grupamentos protéicos. Em ambos, foram encontradas bandas de alto e baixo pesos, entre 220 e menos de 10kda. Sabe-se que as toxinas de baixo peso molecular são importantes por se difundirem rapidamente do sítio de inoculação para os tecidos, atravessando facilmente membranas celulares. Segundo Almeida et al. (2002) as neurotoxinas, principais componentes do veneno escorpiónico, apresentam peso molecular entre 3,5 e 8kda e por este motivo são de fundamental importância para o mecanismo de ação.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram tanto para o veneno de *T. fasciolatus* quanto de *T. serrulatus* maiores concentrações protéicas (bandas mais largas) na região de peso molecular inferior a 10kda, corroborando os dados da literatura acerca das principais toxinas descritas até o momento. Wagner et al. (2003) isolaram por cromatografia o primeiro peptídeo bioativo do veneno de *T. fasciolatus*, identificado como uma neurotoxina de peso molecular 6,6kda, nomeada Tf4 por apresentar estrutura primária homóloga à de toxinas de classe 4 do veneno de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*.

Embora o veneno de *T. fasciolatus* apresente menor toxicidade em relação ao de *T. serrulatus* (Wagner et al., 2003), a composição protéica de ambos mostrou-se semelhante, sugerindo que os venenos diferem entre si sob o ponto de vista de estrutura química. Esta semelhança auxilia a justificar os achados clínicos similares, apresentados e discutidos a seguir.

5.2 Observações gerais após o envenenamento

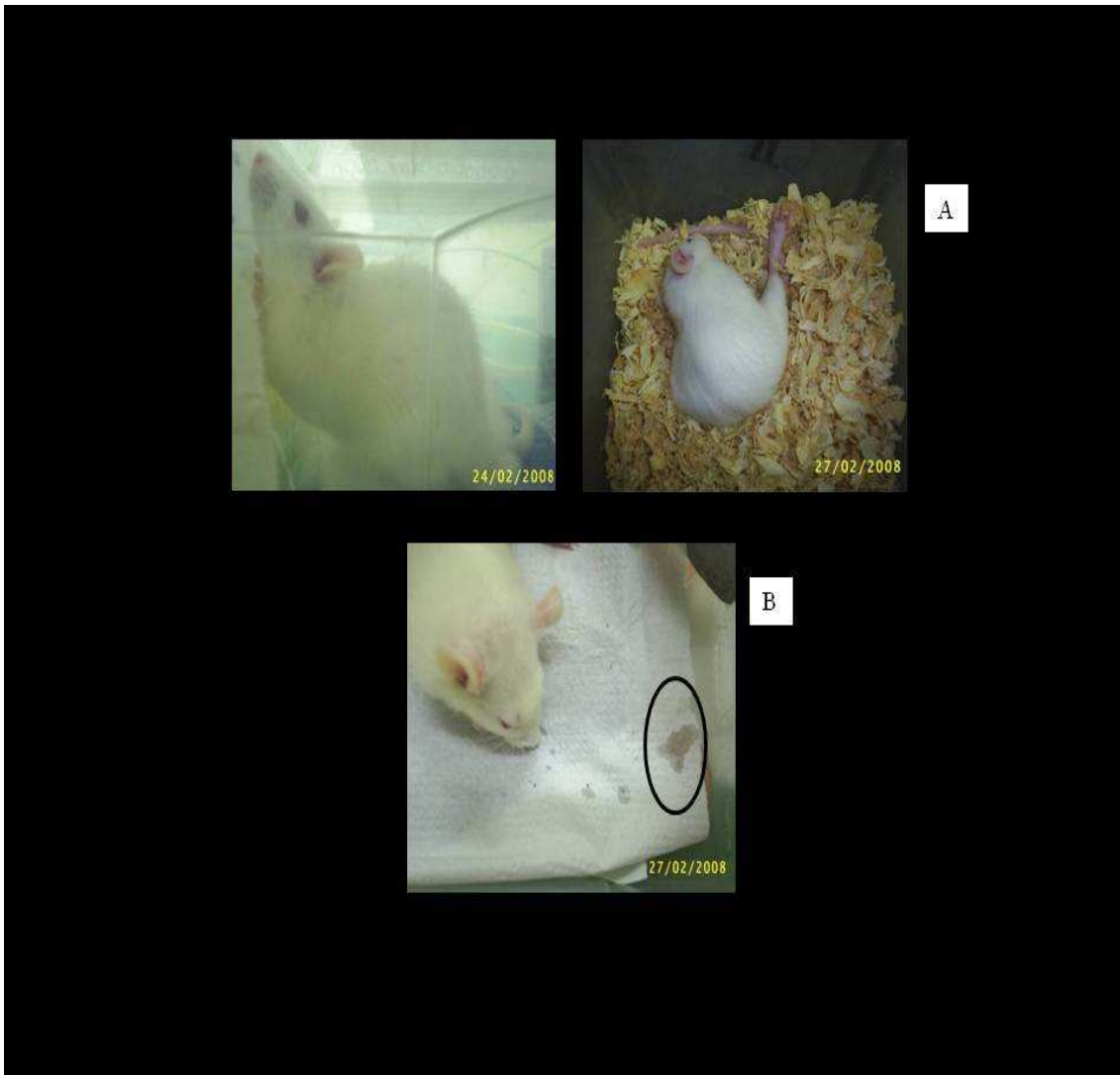
Imediatamente após a inoculação do veneno, mesmo anestesiados todos os animais do GII manifestaram desconforto, indicado por aumento da frequência cardíaca e alteração do padrão respiratório, que se tornou abdominal. Desde o retorno

anestésico até o momento das coletas de sangue os animais permaneciam com sensibilidade dolorosa no local de inoculação do veneno, adotando postura corporal encurvada, buscando posição mais confortável (Figura 3A).

Além disso, os animais envenenados apresentaram moderada secreção oro - nasal serosa (Figura 3B), prurido facial até três horas do envenenamento, agitação e hiperresponsividade a estímulos externos, e movimentavam bastante a boca, como se estivessem mastigando algo.

Um efeito clínico frequentemente observado é a dor no local de inoculação do veneno, embora possa apresentar-se em regiões distantes. Alterações locais como hiperemia, edema, piloereção aparecem com menor frequência. Ribeiro (2008) observou no envenenamento por *T. serrulatus* em cães manifestação dolorosa e hipersensibilidade nos membros que receberam veneno, e edema local discreto em alguns casos.

Nocicepção é o conjunto das percepções de dor que o organismo é capaz de distinguir. Envolve mecanismos relacionados a receptores mecânicos, térmicos e químicos que respondem a alterações do meio e a ligação de mediador químico ou neurotransmissor. Pessini et al. (2008) observaram que o veneno de *T. serrulatus* induziu resposta nociceptiva mecânica dose e tempo-dependente e nociceptiva espontânea em ratos. Ambas as respostas foram relacionadas com a síntese e liberação de mediadores inflamatórios primários como eicosanóides, aminas bioativas, citocinas e óxido nítrico. Estudo semelhante conduzido por Nascimento Junior et al. (2005) indicou resposta nociceptiva em camundongos, com lambeduras e recolhimento do membro inoculado durante 15 minutos após o envenenamento. Além disso, os pesquisadores avaliaram a ação de drogas antagonistas de mediadores inflamatórios e



Seção 3. Manifestação clínica dos animais do GII após o envenenamento: *Figura 3A*. Postura corporal encurvada adotada por até 8h. *Figura 3B*. Secreção oro-nasal serosa.

observaram ausência das manifestações nociceptivas. Sendo assim, é postulado que a dor imediata à inoculação do veneno escorpiónico ocorra em função da liberação de mediadores inflamatórios no local da picada e de forma sistêmica, já que são capazes de sensibilizar fibras nociceptivas aferentes. Diversos estudos demonstraram envolvimento de citocinas no envenenamento escorpiónico: bradicinina (Fatani et al., 1998); IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (Magalhães et al., 1999; D'Suze et al., 2003

Fukuhara et al., 2003); estimulação pela toxina Ts1 do veneno de *T. serrulatus* à produção de citocinas por macrófagos (Petricevich et al., 2007); redução da IL-10 que inibe fatores inflamatórios como ciclooxigenase-2 e óxido nítrico-sintase (Fukuhara et al., 2003).

Além de atuarem no mecanismo da dor, os mediadores inflamatórios também podem justificar as secreções de trato respiratório superior e oral bem como o prurido, uma vez que bradicinina, histamina e eicosanóides, por exemplo, atuam no sistema respiratório levando a aumento da

secreção de muco por ação em receptores B2 ou diretamente nas glândulas secretoras, além de causarem vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de líquidos.

5.3 Eletrocardiografia

Verificou-se em três animais do GII arritmia sinusal com discreta elevação da frequência cardíaca de 400bpm para 460-480bpm em dois animais e atingindo 700bpm no terceiro (Figura 4A). Além disso, foram detectados ritmo juncional, traçado sugestivo de silêncio atrial (Figura 4B), parada sinusal (Figura 4C) e complexos supraventriculares prematuros (Figura 4D).

O aumento da frequência cardíaca ocorreu como consequência à dor imediata ao envenenamento. Adicionalmente, a descarga de adrenalina apresenta efeito cronotrópico positivo. O ritmo juncional é caracterizado pela presença de sucessivos complexos juncionais, originários de foco ectópico, em função de bloqueio ou inatividade do marcapasso natural do coração, o nodo sinoatrial (SA). Esta observação pode sugerir envolvimento dos canais de cálcio, além dos canais de sódio, uma vez que a condução do impulso elétrico nas fibras cardíacas de resposta lenta, predominantes no nodo SA, depende deste íon (Matthew et al., 2006). Parada sinusal e silêncio atrial também sugerem interferência nos canais iônicos, havendo ausência momentânea de formação do impulso no nodo SA e de sua passagem pelo átrio. Ritmo juncional e parada sinusal são alterações que ocorrem por desequilíbrio entre sódio e potássio no meio intra e extracelular. Consequentemente há aumento da fase de despolarização da célula, deixando-a hiperexcitável (Tilley, 1992). Geram-se, assim, focos ectópicos que justificam os complexos juncionais observados, bem como as contrações supraventriculares prematuras. Estímulo vagal exacerbado decorrente da descarga

colinérgica provavelmente pode ter atuado sinergicamente, levando à parada sinusal.

Alterações sugestivas de desequilíbrio eletrolítico como presença de onda rS (Figura 4E) e aumento da onda T (Figura 4F), além de onda T invertida e bloqueios atrioventriculares de primeiro e segundo grau foram observados.

Nos envenenamentos graves é relatada ocorrência de distúrbios em função da ação sistêmica do veneno, com perdas hídricas e eletrolíticas nas manifestações respiratórias e gastrointestinais. Magalhães et al. (1999) observaram acidose respiratória no envenenamento por *T. serrulatus* em ratos. Os animais apresentaram acidose metabólica pelo excesso de secreção ácida do estômago, também descrita por El-Asmar (1984) e Melo et al. (2004b). Além disso, é conhecido que veneno escorpiônico causa alterações nas concentrações de alguns íons por interferência nos canais iônicos, por mecanismo compensatório renal com aumento na excreção de íons hidrogênio e retenção de potássio, por inibição de insulina que aumenta os níveis de potássio, e redução de cálcio por diminuição na absorção intestinal e aumento de excreção renal (El-Asmar, 1984; Ismail, 1995; Guyton, 1996).

Os outros três animais do GII apresentaram modificações dos traçados apenas aos 30 minutos com aumento da onda T, sugerindo início de alterações significativas, já que este é um parâmetro sensível a distúrbios eletrolíticos.

As alterações indicadas pelo ECG dos animais deste trabalho assemelham-se às descritas na literatura tanto em função da descarga de catecolaminas quanto do desbalanço eletrolítico. Além disso, sugerem envolvimento dos canais de cálcio no envenenamento por *T. fasciolatus*.

Os animais do grupo controle apresentaram traçados de acordo com o padrão para a espécie (Pimentel, 2006; Normann et al., 1961) com frequência cardíaca e ritmo normais e ausência de alterações.



Seção 4: Traçados eletrocardiográficos dos ratos após envenenamento por *T. fasciolatus*, realizados a 50mm/s. *Figura 4A.* Aumento da frequência cardíaca (700bpm); sensibilidade 2N. *Figura 4B.* Silêncio atrial: sucessivos complexos QRS com ausência de onda P; sensibilidade N. *Figura 4C.* Parada sinusal: inversão da onda P (seta) e complexo QRS seguido por pausa referente duas vezes o intervalo R-R normal (delimitado pelas hastes); sensibilidade 2N. *Figura 4D.* Complexo supraventricular prematuro (seta); sensibilidade 2N. *Figura 4E.* Ondas rS; sensibilidade 2N. *Figura 4F.* Aumento onda T (setas); sensibilidade 2N.

5.4 Hematologia

O eritrograma dos animais dos grupos I e II está apresentado na Tabela 1. Observa-se que não houve diferença ($P>0,05$) nos parâmetros avaliados após envenenamento por *T. fasciolatus*.

Tabela 1. Valores médios de hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	VG (%)	VGM (FL)	HGM (PG)	CHGM (%)
I	6,71±	12,7±	39 ±	58,4±	18,5±	32,6±
	0,59	0,5	2,1	2,6	0,7	
	A	A	A	A	A	0,9A
II	6,80 ±	13,3±	41±	60,0±	19,6±	32,7±
	0,76	0,6	1,8	4,8	1,4	
	A	A	A	A	A	0,7A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P<0,05$.

Não existem relatos na literatura acerca de hemólise ou ação vasculotóxica, bem como de anemias decorrentes do envenenamento escorpiónico. Desta forma, justifica-se a semelhança entre os valores médios dos eritogramas.

O leucograma dos ratos do GI e GII está apresentado nas tabelas a seguir. Embora os valores médios da contagem total de leucócitos e linfócitos não tenham sido estatisticamente diferentes entre os grupos (Tabela 2), verifica-se que estes foram superiores no grupo envenenado. Considerando-se valores individuais (Tabela 3) observou-se nos animais 8, 9 e 12 considerável aumento de leucócitos totais, elevando a média do grupo. Nos roedores, a principal célula da linhagem branca é o linfócito, representando até 70% do total em animais saudáveis, conforme demonstrado pelos ratos do grupo controle. No GII este representou aproximadamente 50%, em

função do aumento significativo ($P<0,05$) de neutrófilos. Leucocitose com neutrofilia é relatada em acidentes escorpiónicos (Bucaretschi et al., 1995; Cupo e Hering, 2002; Cupo et al., 2003). Conforme mencionado, 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. Estudos recentes indicaram que o edema pulmonar, comum em acidentes escorpiónicos, ocorre com grande influxo de neutrófilos (Coelho et al., 2007). Estes pesquisadores observaram intensa quantidade de neutrófilos nos pulmões duas horas após a injeção do veneno de *T. serrulatus* em camundongos, que permaneceu elevada até seis horas, mesmo período em que se constatou aumento dos níveis de quimiocina ativadora de neutrófilos. As quimiocinas são um grupo de citocinas envolvidas na migração leucocitária *in vivo* (Lira et al., 1994). Os neutrófilos expressam em suas membranas receptores a estas citocinas, chamados de CXR1 e CXR2 que, quando bloqueados, inibem o influxo destes granulócitos na resposta inflamatória.

Tabela 2. Contagens médias de leucócitos totais, neutrófilos, *Ring Cell* e linfócitos ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Leucócitos Totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	<i>Ring Cell</i> ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
I	13,3 ±	2,5 ±	0,44 ±	9,4 ±
	3,4 A	0,7 B	0,23 B	2,5 A
	18,9 ±	5,8 ±	0,87 ±	10,6 ±
II	6,1 A	2,4 A	0,17 A	4,8 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P<0,05$.

Tabela 3. Contagens individuais de leucócitos totais de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Número de ordens	Leucócitos totais (X10 ³ /μl)
I	1	11,7
I	2	13,3
I	3	15,2
I	4	17,9
I	5	13,8
I	6	7,91
II	7	12,1
II	8	24,9
II	9	26,5
II	10	16,6
II	11	12,6
II	12	20,5

Além disso, a neutrofilia pode ser associada ao estresse em eventos dolorosos por maximização da descarga de adrenalina e desprendimento de neutrófilos do compartimento marginal dos vasos sanguíneos (Jain, 1993; Cordeiro et al., 2006; Silva, 2008). Conforme relatado, mesmo anestesiados os animais do GII demonstraram sinais indicativos de dor ao receberem o veneno.

Uma característica da espécie utilizada como modelo experimental é a presença de neutrófilos heterófilos que possuem núcleo em forma de anel ou *Ring Cells*. Estas células não diferem funcionalmente dos neutrófilos segmentados, porém na leitura diferencial de leucócitos são considerados separadamente. Semelhante ao observado na contagem de neutrófilos houve aumento estatisticamente significativo das *Ring Cells* dos animais do GII, pelas mesmas causas citadas.

As contagens de bastonetes, monócitos e eosinófilos estão apresentadas na Tabela 4. O basófilo não foi visualizado em nenhum esfregaço.

Tabela 4. Contagens médias de bastonetes, monócitos e eosinófilos de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Bastonetes (x10 ³ /μl)	Monócitos (x10 ³ /μl)	Eosinófilos (x10 ³ /μl)
I	0,16 ± 0,65 A	0,62 ± 0,37 A	0,18 ± 0,12 A
II	0,33 ± 0,22 A	0,81 ± 0,62 A	0,38 ± 0,29 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com P<0,05.

Não foi observada alteração de neutrófilos jovens (bastonetes) na circulação após o envenenamento, indicando que a neutrofilia foi uma resposta fisiológica, com recrutamento de células maduras. Também não foram observadas diferenças nas contagens de monócitos entre os grupos.

O eosinófilo participa de processos [alérgicos](#) e é atraído ao local da inflamação por agentes quimiotáticos, principalmente [histamina](#). Seus grânulos compõem mecanismo de defesa juntamente com a fagocitose de complexos [antígeno-anticorpo](#) (Thrall, 2004). Nascimento et al., (2005)

demonstraram que a hiperalgesia e o edema pulmonar induzidos pelas toxinas escorpiônicas envolvem mediadores inflamatórios, especialmente eicosanóides e histamina. Além disso, estudos anteriores isolaram aminas bioativas do veneno escorpiônico, entre elas a histamina. Embora não tenha ocorrido diferença significativa na contagem deste leucócito entre grupos, observaram-se valores médios mais elevados nos animais envenenados.

A contagem total de plaquetas mostrou-se significativamente diminuída nos animais do GII (Tabela 5). A análise histológica indicou hemorragias pulmonares que levaram ao consumo destas plaquetas. Coelho et al. (2007) verificaram que a resposta inflamatória sistêmica decorrente do envenenamento por *T. serrulatus* é favorecida pela liberação do fator de ativação plaquetário e da produção de quimiocina KC dependente do PAF. Este fator estimula a agregação plaquetária como o próprio nome diz, degranulação de neutrófilos e eosinófilos, e a síntese de prostaglandinas. Diante disso, pode-se considerar que as hemorragias ocorridas suscitaram ação das plaquetas que foram consumidas, e sua ativação levou à liberação do PAF que provavelmente auxiliou na resposta inflamatória dos animais do GII.

Tabela 5. Contagens médias de plaquetas de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
I	761,3 \pm 189,3 A
II	459,2 \pm 109,8 B

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P < 0,05$.

O proteinograma dos animais está apresentado na Tabela 6 e revela ausência de diferença entre grupos ($P > 0,05$) indicando que o veneno não causou danos que cursam com redução da concentração protéica, liberação de

proteínas de fase aguda da inflamação e de resposta antigênica.

Tabela 6. Valores médios de proteínas totais, albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas e gama-globulinas de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	PT (g/dl)	Albumina (g/dl)	Alfa- globulinas (g/dl)	Beta- globulinas (g/dl)	Gama - globulinas (g/dl)
	5,9 \pm	3,45 \pm	0,42 \pm	1,58 \pm	0,45 \pm
I	0,2 A	0,33 A	0,13 A	0,25 A	0,23 A
	6,1 \pm	3,13 \pm	0,48 \pm	1,67 \pm	0,82 \pm
II	0,2 A	0,34 A	0,12 A	0,12 A	0,39 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P < 0,05$.

5.5 Bioquímica sérica

As concentrações de CK, CK-MB, LDH e AST dos grupos I e II estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Valores médios de CK, CK-MB, LDH e AST de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	CK (U/I)	CK-MB (U/I)	LDH (U/I)	AST (U/I)
	1439 \pm	1112 \pm	689 \pm	243 \pm
I	565 B	434 B	387 B	17 A
	4592 \pm	2816 \pm	1453 \pm	208 \pm
II	1930 A	793 A	1127 A	47 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P < 0,05$.

Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) das enzimas CK, CK-MB e LDH entre grupos. Ribeiro (2008), estudando o envenenamento por *T. serrulatus* em cães adultos observou aumento significativo da AST até 6h após inoculação do veneno, mesmo período em que houve aumento da enzima alanina amino-transferase (ALT), também presente em hepatócitos. Portanto ao se associar a análise de ambas confirmou-se lesão hepática reversível, já que após 12h as enzimas retornaram aos níveis basais.

Embora não tenha sido observada diferença da AST neste estudo, a elevação de LDH e CK no GII indicou lesão muscular. Corrêa et al. (1997) encontraram valores elevados de LDH e CK em ratos após receberem veneno de *T. serrulatus* e a Tityustoxina-I isolada. Apesar de a LDH apresentar grande faixa de variação, ao se observar resultados individuais (Tabela 8) e médios é notável a predominância de valores superiores nos animais envenenados. Dosagens individuais e médias de CK do GII também mostraram-se elevadas em relação às do grupo controle. Tal resultado foi consequente de lesão no miocárdio pelo

envenenamento, revelado pelo aumento da CK-MB nestes animais. Cordeiro et al. (2006) obtiveram dosagens séricas de CK-MB aumentadas em cães seis horas após envenenamento por *T. serrulatus*. Amaral et al. (1991) encontraram elevação de CK-MB em duas das cinco crianças admitidas no centro de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da UFMG vítimas de acidente escorpiônico, sendo que uma delas apresentou também aumento significativo de CK e alterações eletrocardiográficas compatíveis com infarto agudo do miocárdio.

Tabela 8. Valores séricos individuais de creatina quinase (CK), isoenzima cardíaca (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato-aminotransferase (AST) de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Número de ordens	CK	CK-MB	LDH	AST
I	1	1440	1120	606	257
I	2	1532	1180	1220	248
I	3	2415	1860	420	210
I	4	1080	840	1042	244
I	5	727	560	174	256
I	6	1438	1112	671	243
II	7	4660	3740	3680	207
II	8	7840	1440	1263	269
II	9	4620	1560	1141	172
II	10	1800	1400	1019	144
II	11	4040	5940	1151	252
II	12	4592	2816	463	208

Pesquisas de troponina I em acidentes escorpiônicos humanos obtiveram níveis sanguíneos superiores a 50 vezes os valores normais (Cupo et al., 1994, 2003; Bucarechi et al., 1995; Cupo e Hering, 2002). No presente trabalho todos os animais tiveram resultado negativo. Porém, o teste utilizado é semiquantitativo, ou seja, necessita de concentrações superiores ao mínimo detectável. Com isso, não se pode miócitos. Com isso, podem ocorrer hipóxia e degenerações focais. As lesões de miocárdio

afirmar que os animais não apresentaram extravasamento da proteína, mas sim que esta não atingiu valor de 0,5ng/ml.

As alterações cardíacas resultam da intensa liberação de catecolaminas por ação do veneno em canais iônicos neuronais e glândula adrenal (Freire-Maia e Ferreira, 1961; Henriques et al., 1968; Possani et al., 1999) e que acarretam lesões por induzirem aumento do consumo de oxigênio pelos também podem ser atribuídas à angiotensina II que se mostrou aumentada em coelhos

após receberem altas doses de noradrenalina e se manifestaram sob forma de necrose multifocal a coalescente semelhantes às apresentadas pelo grupo que recebeu apenas infusão de angiotensina (Gavas et al., 1975). O somatório de ações de catecolaminas e angiotensina II resultam na “Síndrome de Déficit de Energia”, descrita por Murthy e Hase (1994). Além disso, Fatani et al., (1998) investigaram a participação de cininas no envenenamento de coelhos por *L. quinquestratus* e encontraram alta correlação entre a sua concentração plasmática e alterações cardiovasculares.

Adicionalmente, estudos apontam as lesões de miocárdio como resultantes de ação direta do veneno, embora o mecanismo não tenha sido elucidado até o momento. A excessiva liberação de catecolaminas por si só não explicaria completamente a manifestação clínica e o desequilíbrio hemodinâmico que culminam em edema pulmonar e falência cardíaca, conforme observado por Teixeira Júnior et al. (2001). Estes pesquisadores observaram que o veneno induziu contratilidade cardíaca mesmo em animais previamente tratados com fármacos inibidores seletivos de terminações nervosas simpáticas, mostrando ação inotrópica do veneno de *T. serrulatus* independente da liberação de neurotransmissores. Ismail (1995) identificou em animais envenenados, à microscopia eletrônica, lesões diferentes das causadas por grandes concentrações de catecolaminas, como edema intracelular, dilatação de sistema tubular, destruição de bandas I e deposição de lipídeos.

Os perfis muscular e cardíaco dos animais do grupo II corroboram os dados da literatura que indicam danos ao miocárdio decorrentes do envenenamento escorpiónico.

Os resultados das dosagens séricas de uréia e creatinina estão apresentados na tabela 9. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre grupos, indicando que o veneno de *T. fasciolatus* não alterou a

função renal dos ratos até oito horas após o envenenamento. Sabe-se que o rim é o principal órgão de eliminação de substâncias tóxicas do organismo e alvo de diversas toxinas, entretanto o veneno utilizado não se demonstrou lesivo.

Tabela 9. Valores médios de uréia e creatinina de ratos do grupo I (placebo) e II(veneno de *Tityus fasciolatus*)

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P < 0,05$.

Também não houve diferença entre

Grupo	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
I	43 ± 10 A	0,6 ± 0,4 A
II	37 ± 11 A	0,6 ± 0,3 A

concentrações séricas de amilase entre grupos (Tabela 10), indicando que o veneno não alterou a função pancreática. A amilase é uma enzima de meia-vida alta que possui valores de referência com intervalo amplo e pode apresentar-se aumentada na inflamação do pâncreas (Brobst, 1997; Kramer e Hoffmann, 1997). Nos acidentes escorpiónicos humanos existem relatos de pancreatite (Sankaran et al., 1983; Possani et al., 1992; Bucarechi et al., 1995; Fletcher et al., 1996; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004b). Novaes et al. (1982) demonstraram significativo aumento na secreção de amilase e alteração na composição do suco pancreático em ratos anestesiados após injeção do veneno de *T. serrulatus*. O mesmo autor relatou, em 2002, alterações histopatológicas compatíveis com o diagnóstico de pancreatite.

Tabela 10. Valores médios de amilase, insulina, cortisol e glicose de ratos do grupo I (placebo) e II (veneno de *Tityus fasciolatus*)

Grupo	Amilase (U/l)	Insulina (μ U/ml)	Cortisol (ng/dl)	Glicose (mg/dl)
I	866 \pm 105 A	76 \pm 8 A	94 \pm 1 A	242 \pm 41 A
II	758 \pm 155 A	76 \pm 16 A	94 \pm 4 A	268 \pm 93 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste F, com $P < 0,05$.

Os resultados das análises de cortisol e insulina indicaram que não houve diferença entre grupos ($P > 0,05$). Considerando a insulina, confirmou-se ausência de lesão pancreática já indicada pela análise de amilase. Com isso, os valores médios de glicose também não apresentaram diferença. A hiperglicemia relatada em alguns casos (Bucarechi et al. 1995; Cupo e Hering, 2002) é atribuída à pancreatite que resulta em diminuição da secreção de insulina, e também à ação do cortisol que pode se apresentar elevado nos envenenamentos pelo estresse da dor (El-Asmar, 1984; Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Murthy e Hase, 1994; Murthy e Hagnazari, 1999; Yugandar et al., 1999). Contudo, deve-se destacar o tempo de meia-vida destes hormônios. A insulina permanece circulante por um breve período (5 a 10 minutos), e o cortisol por até 1h indicando que o organismo responde ao estresse e à hiperglicemia de forma rápida (Kaneko, 1997a; Cunningham, 2004). Como as coletas de sangue foram realizadas oito horas após o envenenamento, não se pode afirmar que não houve alterações, mas sim que após este intervalo os animais apresentaram concentrações semelhantes às do grupo controle.

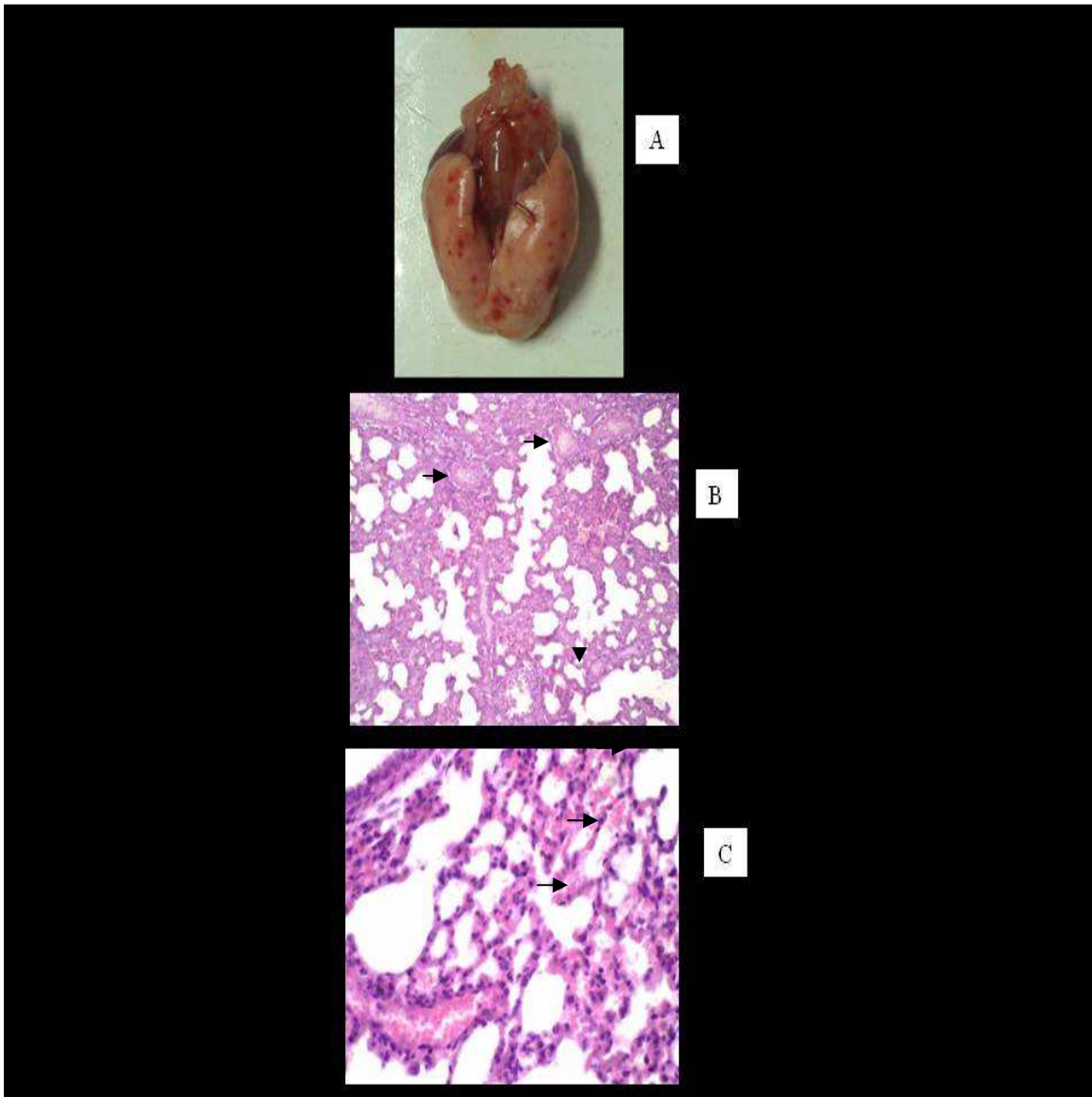
5.6 Avaliações macro e microscópicas

Os animais do GII apresentaram hemorragias petequiais multifocais nos lobos craniais e caudais dos pulmões vistas macroscopicamente (Figura 5A).

À microscopia, observaram-se nos pulmões de todos os animais que receberam veneno, capilares alveolares moderadamente congestionados e hemorragia petequial multifocal moderada (Figura 5B) caracterizada pela presença de hemácias nos septos interalveolares e na luz dos alvéolos (Figura 5C). Este quadro provavelmente resultou de ação direta do veneno.

Não foram visualizadas alterações morfológicas no coração de nenhum animal. Alterações conseqüentes ao envenenamento por *T. serrulatus* como degeneração de fibras, necrose e edema intersticial (Yaron e Braun, 1970; Ismail, 1995); infiltração difusa de linfócitos e polimorfonucleares (Gueron e Ovsyshcher, 1984); focos de hemorragia e sarcômeros rompidos e hipercontraídos (Cupo et al., 1994; Benvenuti et al., 2002) foram descritas. Embora não tenham sido visualizadas à microscopia óptica, o aumento da enzima CK-MB sugere que o dano decorrente do envenenamento por *T. fasciolatus* pode ter ocorrido em termos de estrutura molecular, sendo necessária nesse caso avaliação por meio de microscopia eletrônica.

Não foi observada alteração morfológica no tecido nervoso dos animais do GII após inoculação do veneno.



Seção 5. Alterações macroscópicas e histopatológicas dos pulmões de animais do GII. *Figura 5A.* Hemorragia petequial multifocal. *Figura 5B.* Congestão moderada (setas) e hemorragias multifocais. *Figura 5C.* Hemácias na luz dos alvéolos (setas).

Com base nos resultados, pode-se inferir que o envenenamento por *Tityus fasciolatus*:

- ✓ Envolve mecanismos nociceptivos na manifestação de dor dos animais envenenados;
- ✓ Sugere liberação de mediadores inflamatórios que atuam em diferentes sistemas e auxiliam na neutrofilia e danos cardíacos observados;
- ✓ Sugere ação em canais iônicos semelhante ao veneno de outras espécies do gênero *Tityus* resultando em alterações eletrocardiográficas como arritmias, contrações supraventriculares prematuras, bloqueios atrioventriculares, indicativas de distúrbio eletrolítico e, além disso, sugere envolvimento de canais de cálcio no mecanismo de ação sobre coração;

- ✓ Esta ação nos canais iônicos resulta em liberação de catecolaminas, primordiais no desencadeamento de lesões no miocárdio, reveladas pelo aumento significativo das enzimas CK, CK-MB e LDH, interferindo em seu funcionamento e preservação
- ✓ Resultou em hemorragia pulmonar ptequial multifocal.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO – EXPERIMENTO II (*Tityus serrulatus*)

6.1 Observações gerais após o envenenamento

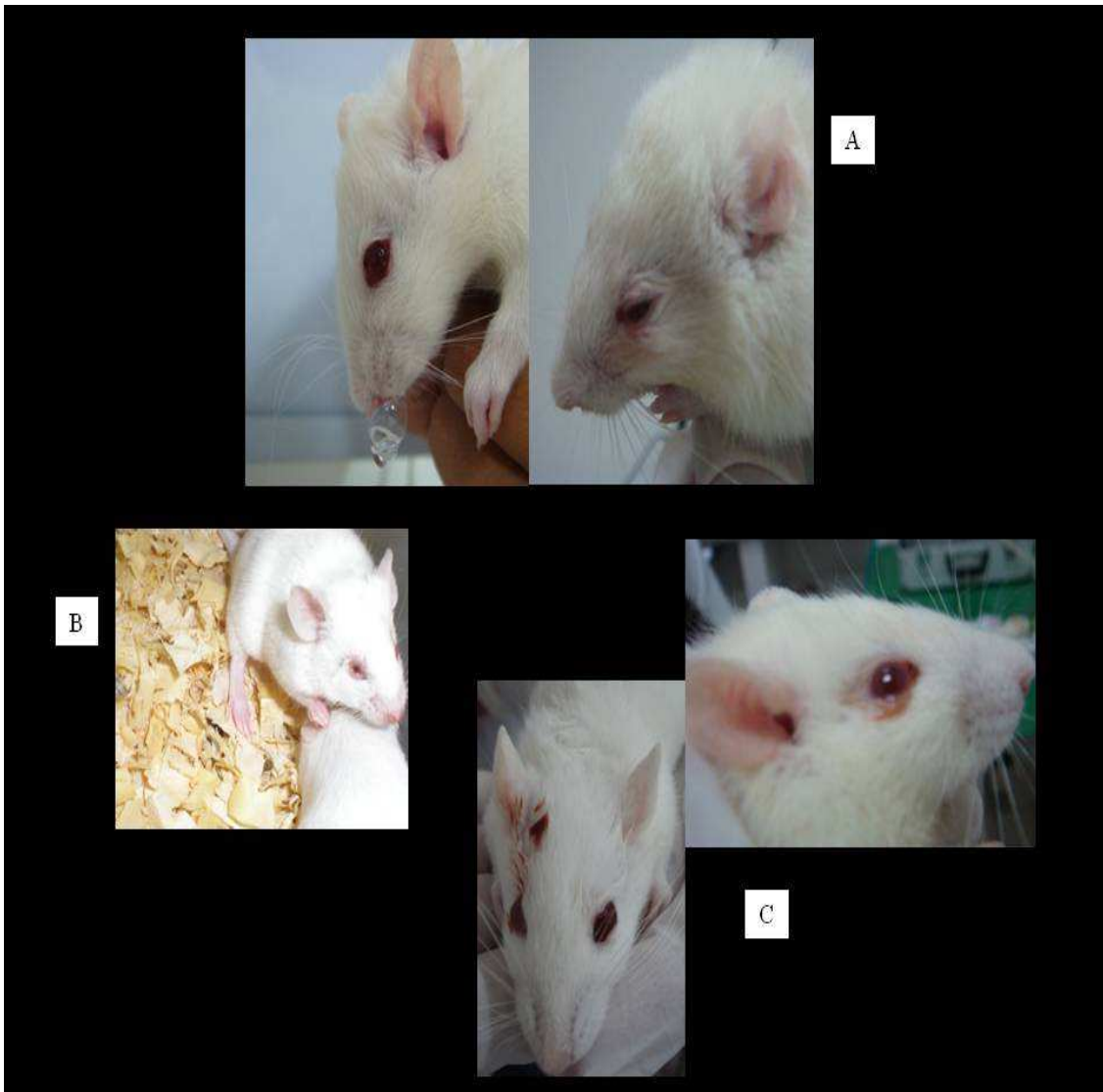
Os animais dos grupos B e C apresentaram sinais de desconforto após a inoculação do veneno, representados por dispnéia, padrão respiratório abdominal e intensificação da contração da musculatura respiratória durante a expiração. Os animais de ambos os grupos apresentaram sintomatologia aguda ao ser finalizada a anestesia geral inalatória, cerca de 40 minutos da inoculação, sugerindo que, por mecanismos não elucidados, os fármacos ou o procedimento adotado na contenção auxiliaram na manutenção da vida dos ratos após o envenenamento. Piloereção e secreção oro- nasal serosa também foram observadas, entretanto marcadamente mais intensas em relação ao experimento com *T. fasciolatus* (Figura 6A). Alguns ratos do grupo C apresentaram edema de pálpebras (Figura 6B).

Além disso, observou-se intensa secreção ocular amarronzada (Figura 6C). A avaliação microscópica não indicou presença de hemácias no material.

Decorridos 20 minutos, os ratos dos grupos B e C apresentavam mucosas e extremidades dos membros pálidas e espirros. Momentos antes do procedimento anestésico para a coleta de sangue observou-se intensa protrusão dos olhos (buphalmia).

A manifestação dolorosa é explicada pela resposta nociceptiva mencionada no envenenamento por *T. fasciolatus*. Acidentes por *T. serrulatus* são os mais frequentes no Brasil e a dor local está presente na quase totalidade dos casos. O comportamento nociceptivo no envenenamento por este escorpião foi confirmado por Nascimento et al. (2005) e Pessini et al. (2008).

A secreção oro-nasal em grande quantidade e o edema palpebral foram, de forma análoga ao estudo anterior, atribuídos à atuação dos mediadores inflamatórios, principalmente a histamina. Pessini et al. (2008) observaram edema no local de inoculação do veneno de *T. serrulatus* iniciado após 15 minutos e com pico de manifestação aos 30 minutos. Além disto, foram testados diferentes fármacos antiinflamatórios e com exceção da indometacina, todos reduziram significativamente o edema. No presente trabalho o edema se manifestou na região das pálpebras, sugerindo que o mecanismo de sua formação seja semelhante, já que a resposta inflamatória evocada pelo veneno se dá de forma sistêmica. Além disso, o edema pode ter sido causado por reações de hipersensibilidade.



Seção 6. Manifestação clínica dos animais dos grupos B e C após o envenenamento. *Figura 6A.* Intensa secreção oro- nasal. *Figura 6B.* Edema de pálpebra observado em animais do grupo C. *Figura 6C.* Secreção ocular bilateral escura.

6.2 Eletrocardiografia

Foram verificadas alterações no ECG já aos cinco minutos nos animais dos grupos B e C, entretanto nos momentos mais tardios revelaram-se as de maior gravidade.

Em ambos os grupos, detectaram-se alterações indicativas de distúrbio eletrolítico como aumento da onda T (Figura 7A) e presença de onda rS (Figura 7B). As causas são as mesmas comentadas no experimento I. Porém, ressalta-se que os

animais desta etapa apresentaram-nas de forma mais intensa e duradoura. A onda rS pode indicar desvio do eixo de repolarização por aumento do ventrículo direito, ligado diretamente à circulação pulmonar (Tilley, 1992). Dessa forma, sugere-se sobrecarga no VD em função das extensas áreas de hemorragias pulmonares vistas macro e microscopicamente em todos os animais dos grupos B e C, com comprometimento do fluxo sanguíneo e levando às complicações cardíacas observadas.

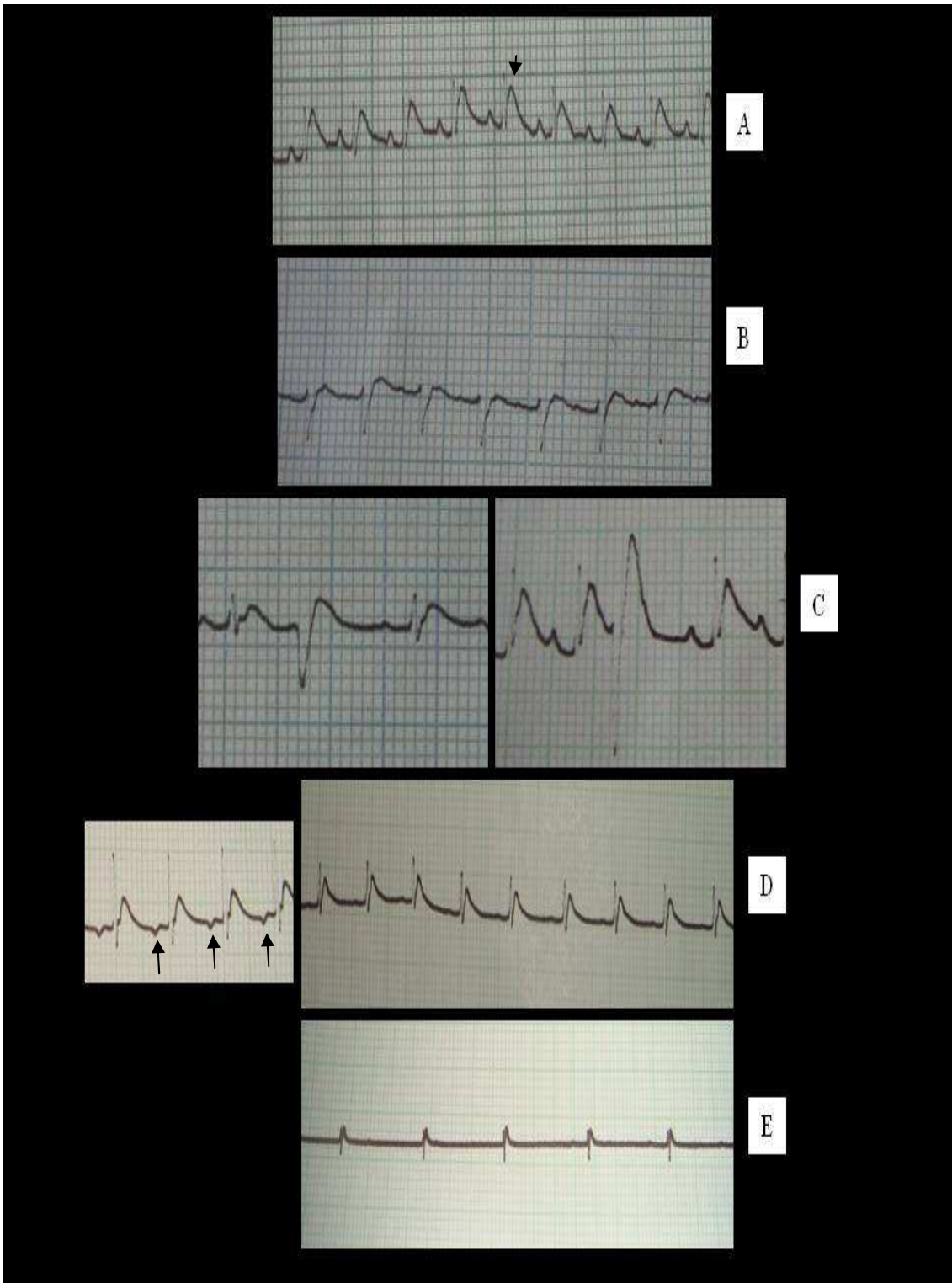
Detectaram-se ainda onda T variando de morfologia e complexos ventriculares prematuros ilustrados na figura 7C. Os VPCs são impulsos originados nos ventrículos decorrentes de aumento da automaticidade dos miócitos. Podem resultar em conseqüências diretas no sistema cardiovascular ou secundárias devido à perfusão inadequada (Tilley, 1992). São associados a quadros de miocardite, que pode estar presente no envenenamento escorpiônico segundo Raab (1960); Murthy e Hase (1994); Ismail (1995); Sofer et al. (1996); Meki e Eldean (1998); Magalhães et al. (1999); Teixeira Júnior et al. (2001); Meki et al. (2003). A miocardite pode ser ocasionada por diversos mecanismos, mas principalmente pela ação das catecolaminas e citocinas.

Inicialmente, todos os animais dos grupos B e C apresentaram aumento da FC em função do estímulo doloroso e da adrenalina. Aos 25 minutos apresentaram quadro de bradicardia (Figura 7D), chegando a frequências de 200-250bpm e de 80-140bpm em um animal do GC. Neste mesmo momento, observou-se inversão da onda P nos traçados (Figura 7D) que é associada à geração de foco ectópico na junção AV em sentido inverso ao normal, ou condução retrógrada (Tilley, 1992), resultante da interferência na atividade elétrica do coração. Esta bradicardia foi provocada pelo aumento do tônus vagal decorrente dos efeitos colinérgicos, e a associação a outros fatores auxiliou no seu agravamento, como insuficiência renal aguda desenvolvida após o envenenamento. A hipercalemia, que pode ser ampliada na IRA pela baixa perfusão renal, também pode estar envolvida já que deprime a condução cardíaca (Tilley, 1992). Aos 30 minutos

observou-se agravamento desta bradicardia (Figura 7E), momento em que ocorreram BAVs de terceiro grau, refletindo distúrbio hemodinâmico de maior gravidade, com completa dissociação dos batimentos atriais e ventriculares por bloqueio ou inatividade das células da junção atrioventricular ou dos feixes direito e esquerdo. Ritmo de escape também foi detectado, indicando que o nodo SA reduziu sua frequência ou até mesmo parou, e com isso a atividade intrínseca do marcapasso da junção AV ou dos ventrículos assumiu o ritmo cardíaco (Tilley, 1992). A presença do ritmo de escape é associada a quadros de bradicardia e distúrbios eletrolíticos, presentes no envenenamento.

Cordeiro et al. (2006) observaram arritmia sinusal e inversão da onda T com aumento de sua amplitude, bem como das ondas P e Q em cães após envenenamento experimental por *T. serrulatus*. Em estudo semelhante, Cardoso et al. (2004) observaram taquicardia sinusal, marcapasso ectópico, extra-sístoles e alteração do segmento ST em cão vítima de acidente com *T. bahiensis*. Cupo et al (2003), descreveram traçados eletrocardiográficos similares aos obtidos no presente estudo em acidentes escorpiônicos de forma geral. Os parâmetros do ECG alterados nos ratos dos grupos B e C são semelhantes entre si e aos descritos na literatura. Entretanto ressalta-se que a resposta ocorreu de forma mais intensa nos animais do GC, que receberam maior dose de veneno.

Os animais do grupo controle apresentaram traçados de acordo com o padrão para a espécie (Pimentel, 2006; Normann et al., 1961) com frequência cardíaca e ritmo normais e ausência de alterações.



Seção 7: Traçados eletrocardiográficos dos ratos após envenenamento por *T. serrulatus*. *Figura 7A*. Aumento da onda T (seta); sensibilidade 2N. *Figura 7B*. Ondas rS; sensibilidade 2N. *Figura 7C*. Complexos ventriculares prematuros; sensibilidade 2N. Todos realizados a 50mm/s *Figura 7D*. Bradicardia aos 25 minutos; inversão da onda P em destaque à esquerda (setas); sensibilidade 2N. *Figura 7E*. Bradicardia acentuada aos 30 minutos; sensibilidade N. Ambos realizados a 25mm/s.

6.3 Hematologia

A Tabela 11 contém os valores do eritrograma dos animais dos grupos A, B e C. Observa-se que não houve alterações após o envenenamento. Embora alguns estudos tenham demonstrado aumento da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina e do volume globular no envenenamento por *T. serrulatus* por hemoconcentração resultante de quadros de desidratação (Bertazzi et al., 2003; Ribeiro, 2009) ressalta-se que nestes casos as coletas de sangue foram procedidas com intervalo de tempo após a inoculação do veneno superior ao do presente trabalho. Sendo assim, pode-se sugerir que 40 minutos não foram suficientes para haver alterações detectáveis no exame.

O leucograma está apresentado nas tabelas a seguir. Observa-se na Tabela 12 que houve aumento significativo ($P < 0,05$) nas contagens de leucócitos totais dos animais envenenados, sendo mais elevada no GC. A leucocitose com neutrofilia é relatada em acidentes escorpionicos humanos (Gueron et al., 1967; Gueron et al., 1993; Bucarechi et al., 1995; Melo et al., 2004b) e em animais (Cordeiro et al., 2006; Ribeiro, 2008) em função do estresse pela dor e recrutamento de neutrófilos do compartimento marginal para a circulação. De forma análoga, houve aumento da contagem de *Ring Cells*.

O número de linfócitos aumentou significativamente ($P < 0,05$) nos animais envenenados. Entretanto, observa-se que a proporção em relação aos demais leucócitos manteve-se, representando cerca de 70% da contagem total. Como o linfócito é a principal célula da linhagem branca em ratos saudáveis (Thrall, 2004) pode-se dizer que a linfocitose foi fisiológica.

Tabela 11. Valores médios de hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de ratos dos grupos A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Hemácias (x10 ⁶ /µl)	HB (g/dl)	VG (%)	VGM (fl)	HGM (pg)	CHGM (%)
A	6,62 ± 0,66 A	13,3 ± 0,55 A	43 ± 1,0 A	65,3 ± 7,3 A	20,1 ± 2,3 A	30,9 ± 1,6 A
B	6,69 ± 1,32 A	13,5 ± 1,54 A	41 ± 6,1 A	61,4 ± 4,5 A	20,4 ± 1,9 A	33,1 ± 1,1 A
C	7,09 ± 0,45 A	13,8 ± 0,72 A	45 ± 2,5 A	63,2 ± 4,5 A	19,4 ± 1,3 A	30,8 ± 0,7 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com $P < 0,05$.

Tabela 12. Contagens médias de leucócitos totais, neutrófilos, *Ring Cell* e linfócitos de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Leucócitos totais (x10 ³ /µl)	Neutrófilos (x10 ³ /µl)	<i>Ring Cell</i> (x10 ³ /µl)	Linfócitos (x10 ³ /µl)
A	6,6 ± 1,1 B	0,98 ± 0,1 B	0,2 ± 0,1 B	5,06 ± 1,1 B
B	15,7 ± 7,1 A	2,46 ± 1,3 AB	0,89 ± 0,2 A	11,03 ± 5,2 AB
C	29,6 ± 10,7 A	5,32 ± 3,5 A	0,62 ± 0,2 A	19,80 ± 8,1 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com $P < 0,05$.

Novamente, basófilos não foram visualizados nos esfregaços. Bastonetes e eosinófilos não diferiram entre grupos, conforme ilustra a Tabela 13.

Embora o monócito seja envolvido em processos inflamatórios crônicos, observou-se aumento ($P < 0,05$) de sua

contagem 40 minutos após o envenenamento por *T. serrulatus*. Estudos indicam ação do veneno na imunomodulação de macrófagos. Petricevich et al. (2002) verificaram aumento de INF- γ , citocina liberada em estágios primários da resposta e que apresenta habilidade de ativar a atividade fagocítica de macrófagos, leucócito cujo precursor é o monócito.

Tabela 13. Contagens médias de bastonetes, eosinófilos e monócitos de ratos do grupo A (placebo), B (100 μ g do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450 μ g do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Bastonetes (x10 ³ / μ l)	Eosinófilos (x10 ³ / μ l)	Monócitos (x10 ³ / μ l)
A	0,15 \pm 0,8 A	0,8 \pm 0,6 A	0,13 \pm 0,1 B
B	0,35 \pm 0,2 A	0,2 \pm 0,8 A	1,42 \pm 0,7 A
C	0,72 \pm 0,5 A	0,3 \pm 0,2 A	0,92 \pm 0,6 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com P<0,05.

A contagem total de plaquetas mostrou-se significativamente diminuída nos animais envenenados (Tabela 14). Hemorragias pulmonares foram visualizadas macro e microscopicamente nestes animais, justificando tal redução. Longenecker e Longenecker (1981) relataram agregação plaquetária e síndrome intravascular disseminada em cães após envenenamento pelo escorpião *Centruroides sculpturatus* por ativação do PAF. Adicionalmente, Correa et al. (1997) descreveram lesões hemorrágicas no coração, pulmões e rins de ratos submetidos ao envenenamento por *T. serrulatus*, confirmando a trombocitopenia verificada. Novamente, observa-se que a resposta mais intensa foi do grupo C.

Tabela 14. Contagens médias de plaquetas de ratos do grupo A (placebo), B (100 μ g do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450 μ g do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Plaquetas (x10 ³ / μ l)
A	616,6 \pm 73 A
B	433,0 \pm 93 B
C	381,6 \pm 73 B

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com P<0,05.

A Tabela 15 contém os resultados do proteinograma dos grupos A, B e C. Houve aumento significativo (P<0,05) da concentração de proteínas plasmáticas acompanhado das frações β e γ globulínicas nos animais envenenados. Ressalta-se que entre estes grupos valores mais elevados de PT e β -globulinas ocorreu nos animais do grupo C. Aumento das PT pode decorrer de perdas hídricas, mas nesse caso seria acompanhado de aumento proporcional tanto de albumina quanto de globulinas. No presente estudo albumina e α -globulinas não alteraram, sugerindo-se outro fator causal. Nas injúrias teciduais sistêmicas por agentes externos há liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α , presentes na resposta inflamatória ao envenenamento, que estimulam a síntese hepática de proteínas, especialmente as de fase aguda. Este mecanismo pode justificar o aumento das β -globulinas. O aumento da fração γ -globulínica representa resposta à estimulação antigênica evocada pelo veneno.

Tabela 15. Valores médios de proteínas plasmáticas totais, albumina, alfa, beta e gama-globulinas de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	PT (g/dl)	Albumina (g/dl)	Alfa-globulinas (g/dl)	Beta-globulinas (g/dl)	Gama-globulinas (g/dl)
A	5,2 ± 0,2	3,68 ± 0,2 A	0,41 ± 0,6 A	1,10 ± 0,1 B	0,01 ± 0,0 C
B	5,7 ± 0,2	3,55 ± 0,3 A	0,40 ± 0,1 A	1,69 ± 0,3 A	0,08 ± 0,1 A
C	6,2 ± 0,2	3,95 ± 0,4 A	0,36 ± 0,2 A	1,82 ± 0,3 A	0,05 ± 0,1 B

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com P<0,05.

6.4 Bioquímica sérica

Observa-se na Tabela 16 que houve aumento estatisticamente significativo (P<0,05) de CK e CK-MB nos animais envenenados, sendo que o grupo C apresentou valores mais elevados. O aumento da CK é justificado, de forma análoga ao estudo anterior, pela liberação de sua isoforma MB, indicando lesão no miocárdio decorrente do envenenamento. A CK-MB do grupo B foi classificada como semelhante tanto à do GC quanto do GA em função do grande desvio-padrão. Porém, quando se analisam valores individuais, observa-se que foram predominantemente maiores em relação ao controle (Tabela 17). Estudos prévios relataram dano cardíaco pela expressiva liberação das catecolaminas e por possível ação direta das toxinas escorpionicas. Embora o pico de concentração plasmática das enzimas CK e CK-MB ocorra em um período mais tardio que o momento em que foi procedida a coleta de sangue dos animais deste experimento, o aumento de ambas indica ação aguda do veneno de *T. serrulatus* em ratos recém-desmamados.

Tabela 16. Valores médios de creatina quinase (CK), isoenzima cardíaca (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato-aminotransferase (AST) de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	CK (U/I)	CK-MB (U/I)	LDH (U/I)	AST (U/I)
A	1293 ± 390 B	413 ± 176 B	805 ± 128 A	69,2 ± 42 A
B	3770 ± 1662 A	1496 ± 1206 AB	1423 ± 1408 A	92,8 ± 70 A
C	4764 ± 2557 A	1492 ± 568 A	1199 ± 553 A	134,2 ± 63 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com P<0,05.

Tabela 17. Valores séricos individuais CK, CK-MB, LDH e AST de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Número de ordens	CK	CK-MB
A	1	1613	591
A	2	1748	461
A	3	1293	232
A	4	907	223
A	5	904	560
B	6	1480	400
B	7	5060	1160
B	8	2920	920
B	9	5620	1460
B	10	3770	3540
C	11	4340	2020
C	12	4120	1140
C	13	1260	740
C	14	5860	1500
C	15	8240	2060

Dosagens séricas de LDH e AST não apresentaram diferença significativa entre grupos, bem como de troponina que apresentou resultado negativo para os três grupos, provavelmente em função do momento de sua liberação após a lesão (algumas horas após a lesão) e do tempo decorrido até a coleta de sangue e o necessário para haver resposta.

Importante aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina nos ratos envenenados foi verificado, indicando que o veneno provocou insuficiência renal aguda por provável ação direta assim como resultante do déficit circulatório sugerido pela intensa bradicardia detectada ao ECG e pelas extensas hemorragias verificadas. As Tabelas 18 e 19 mostram, respectivamente, os valores médios e individuais de uréia e creatinina. A uréia no grupo C apresentou-se semelhante à do controle em função do animal 13, cuja concentração estava mais baixa em relação aos demais, diminuindo a média do grupo. O mesmo vale para creatinina em função dos animais 14 e 15. Isto pode ter sido influenciado pelo curto intervalo até as coletas de sangue, e a sensibilidade individual ao envenenamento.

Tabela 18. Valores médios de uréia e creatinina de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
A	35 ± 8 B	0,6 ± 0,2 B
B	76 ± 27 A	2,06 ± 1,2 A
C	62 ± 22 AB	1,12 ± 0,3 AB

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com P<0,05.

Estudos sobre a biodistribuição do veneno escorpiônico em ratos mostraram rápida difusão para os tecidos, atingindo os rins em altas concentrações 15 minutos após o envenenamento (Santana et al., 1996; Nunan

et al., 2003; Nunan et al., 2004). Alves et al. (2005) verificaram aumento da pressão de perfusão, diminuição da taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário, deposição de proteína nos túbulos renais e edema renal por aumento de pressão hidrostática 30 minutos após envenenamento por *T. serrulatus*.

Tabela 19. Valores individuais séricos de uréia e creatinina de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Número de ordens	Uréia	Creatinina
A	1	49	0,8
A	2	33	0,6
A	3	29	0,6
A	4	28	0,6
A	5	34	0,6
B	6	104	2,1
B	7	101	0,8
B	8	44	0,8
B	9	75	3,3
B	10	54	3,3
C	11	94	1,6
C	12	60	1,3
C	13	34	1,1
C	14	73	0,8
C	15	49	0,8

Ismail e Abd-Elsalam (1988) observaram aumento sérico de uréia e ácido úrico e decréscimo do volume urinário em vítimas de acidentes escorpiônicos. O veneno de algumas serpentes, especialmente do gênero *Bothrops* são reconhecidamente causadores de IRA tanto por ação nefrotóxica direta quanto indireta, em função da hipotensão. O veneno das cascavéis também pode causar falência renal aguda por ação direta ou em decorrência de miotoxicidade que leva a

quadros intensos de mioglobínúria, lesiva aos rins (Melo et al., 2004a). Os estudos de Corrêa et al. (1997) e Alves et al. (2005) sugerem ação nefrotóxica do veneno de *T. serrulatus* com congestão e hemorragia renais, diminuição da taxa de filtração glomerular, deposição de proteína nos túbulos renais e edema. Dessa forma, a avaliação renal dos animais envenenados por *T. serrulatus* corroboram os dados da literatura acerca do comprometimento do órgão.

Não foi verificada diferença dos valores séricos de amilase, glicose e cortisol entre grupos, conforme ilustra a Tabela 20. Entretanto, houve redução significativa ($P < 0,05$) de insulina nos animais envenenados.

Tabela 20. Valores médios de amilase, insulina, cortisol e glicose de ratos do grupo A (placebo), B (100µg do veneno de *Tityus serrulatus*/rato) e C (450µg do veneno de *T. serrulatus*/rato)

Grupo	Amilase (U/l)	Insulina (µU/ml)	Cortisol (ng/dl)	Glicose (mg/dl)
A	861 ± 82 A	76 ± 9 A	94 ± 2 A	126 ± 32 A
B	1306 ± 767 A	39 ± 17 B	92 ± 4 A	128 ± 18 A
C	1174 ± 406 A	26 ± 3 B	93 ± 4 A	122 ± 45 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre os grupos, submetidas à análise de variância e ao teste SNK, com $P < 0,05$.

O veneno escorpiônico pode causar pancreatite com lesões degenerativas de ilhotas pancreáticas, resultando em redução da síntese de insulina. Além disso, o envenenamento pode influenciar, por meio das catecolaminas, a regulação de hormônios com inibição da liberação de insulina e estímulo à secreção de glucagon (El-Asmar, 1984; Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Murthy e Hase, 1994; Murthy e Haghazari, 1999; Yugandar et al., 1999). A pancreatite pode ser considerada pelo

aumento, embora não estatisticamente significativo, da concentração sérica de amilase dos animais dos grupos B e C.

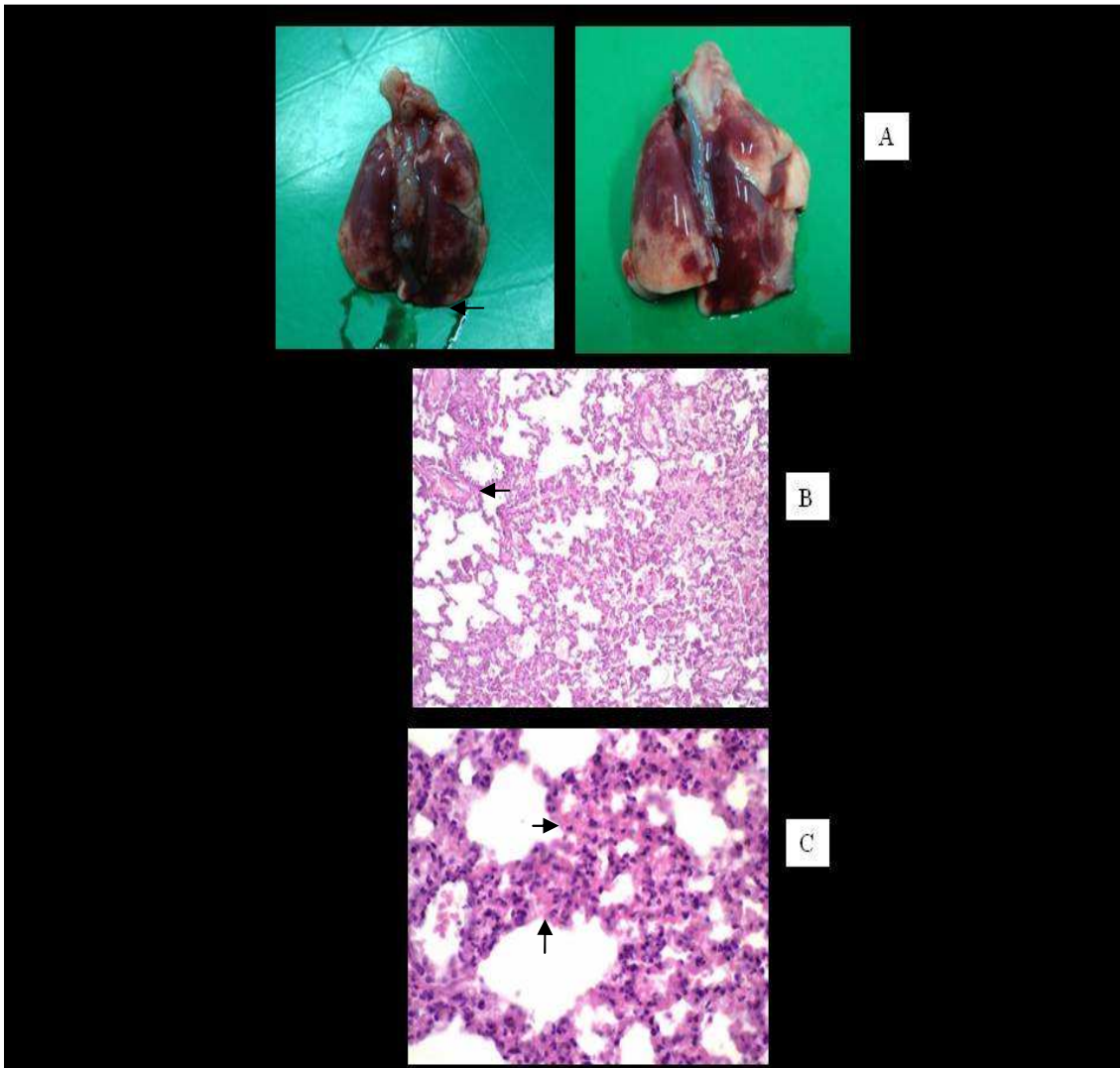
6.5 Alterações macro e microscópicas

À necropsia foram visualizadas áreas de hemorragia intensa e difusa nos lobos craniais e caudais dos pulmões dos animais dos grupos B e C (Figura 8A). Nos demais órgãos nenhuma alteração digna de nota foi detectada.

Microscopicamente, observou-se nos pulmões dos 10 animais que receberam veneno moderada congestão (Figura 8B) e hemorragia extensa caracterizada pela presença de hemácias distribuídas nos espaços intersticial e intra-alveolares (Figura 8C).

Estudos sobre a cinética do veneno de *T. serrulatus* realizados por Revelo et al. (1996) e Santana et al. (1996) demonstraram grande afinidade pelos tecidos, concentrações máximas no coração, pulmões, soro e baço após 30 minutos. Decorridas duas horas, tais concentrações caíram rapidamente e após oito horas o veneno não foi detectado em tecido algum. Murugesan et al. (1999), utilizando a marcação radioativa com tecnécio, observaram veneno de *Mesobuthus tamulus* nos pulmões cinco minutos após o envenenamento. As informações de detecção precoce associadas às intensas hemorragias pulmonares observadas apontam uma possível ação tóxica direta do veneno que provavelmente resultou nas alterações cardiorrespiratórias verificadas.

A análise histológica do coração não indicou alterações. Acredita-se que, de forma semelhante ao ocorrido no experimento com *T. fasciolatus*, a lesão cardíaca representada pelo aumento da CK-MB atingiu a estrutura molecular do tecido, não visível à microscopia óptica.



Seção 8. Alterações macroscópicas e histopatológicas dos pulmões dos animais dos grupos B e C. *Figura 8A.* Hemorragia intensa e difusa nos lobos craniais e caudais. *Figura 8B.* Congestão moderada (setas). *Figura 8C.* Presença de hemácias na luz dos alvéolos (setas).

No cérebro não foram visualizadas alterações, o que confirma os resultados do estudo farmacocinético de Revelo et al. (1996), que não detectaram veneno no sistema nervoso central em nenhum momento, entre quinze minutos e 8 horas após o envenenamento.

Os resultados deste experimento indicaram que o envenenamento por *Tityus serrulatus*:

- ✓ Ocorreu de forma aguda em ratos recém-desmamados, com graves conseqüências;
- ✓ Causou intensa hemorragia pulmonar, insuficiência renal aguda e dano pancreático;
- ✓ Sugere liberação de mediadores inflamatórios, que justificam uma série de alterações verificadas no presente trabalho;

- ✓ Resultou em lesões cardíacas compatíveis com as descrições da literatura consultada caracterizadas neste estudo pelas alterações eletrocardiográficas e do perfil enzimático cardíaco;
- ✓ Resultou em alterações dos mesmos parâmetros avaliados nos grupos B (100µg de veneno/rato) e C (450µg de veneno/rato), entretanto a intensidade de tais alterações foi predominantemente maior no GC.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicaram que:

- I. O veneno de *Tityus fasciolatus* foi capaz de causar alterações de parâmetros eletrocardiográficos, hematológicos, bioquímicos séricos e histopatológicos de ratos recém-desmamados semelhantes aos descritos para outras espécies de escorpiões, caracterizadas principalmente por danos no sistema cardiorrespiratório;
- II. O veneno de *Tityus serrulatus* foi capaz de alterar de forma aguda parâmetros eletrocardiográficos, hematológicos, bioquímicos séricos e histopatológicos de ratos recém-desmamados indicando, dessa forma, grande susceptibilidade dos mesmos frente ao envenenamento.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

CORRELAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS I E II

O envenenamento escorpiônico figura-se como situação de destaque na toxicologia e suas conseqüências devem ser

conhecidas para fornecer ao clínico informações aplicáveis à terapia visando a preservação da vida do paciente. Diante disso, verifica-se a relevância do presente estudo, cujos resultados indicaram a magnitude e gravidade do envenenamento causado pelos escorpiões *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus* em indivíduos jovens.

De forma geral, os mesmos parâmetros foram alterados, embora com manifestações distintas, em decorrência da similaridade dos venenos demonstrada no SDS-PAGE. Em ambos os experimentos, observaram-se desconforto imediato à inoculação do veneno, indícios de envolvimento de mediadores inflamatórios em diferentes respostas, eletrocardiograma revelando alterações do tecido de condução, desequilíbrio eletrolítico e miocardite, e perfil enzimático indicando lesão miocárdica.

Observou-se no experimento II o caráter agudo do envenenamento por *T. serrulatus* em ratos recém-desmamados, revelado por graves alterações do sistema cardiorrespiratório, associadas à falência renal aguda e pancreatite. Em relação ao *T. fasciolatus*, os animais apresentaram quadros de menor intensidade, entretanto não menos importantes, uma vez que alterações significativas foram detectadas.

Características intrínsecas do veneno de *T. serrulatus*, escorpião extremamente prevalente em Minas Gerais e em todo território nacional, determinaram maior ação tóxica, associadas à sensibilidade natural de indivíduos jovens ao envenenamento escorpiônico.

No envenenamento por *T. fasciolatus*, espécie endêmica no Brasil Central e responsável por acidentes nessa região, atenção especial também deve ser dada ao sistema cardiorrespiratório, já que este se apresentou como o principal afetado. As alterações do eletrocardiograma e do perfil bioquímico cardíaco indicaram ação semelhante ao veneno de outras espécies do gênero *Tityus*, levando a danos ao miocárdio e à fisiologia do coração.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.; LOPES, J.A.; MAGALHÃES, R.A.; et al. Eletrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. *The American Journal of Cardiology*, v.67, p.655-657, 1991.
- BARTHOLOMEU, C. Acute scorpion pancreatitis in Trinidad. *British Medical Journal*, v.1, p.666-668, 1970.
- 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.
- BENVENUTI, L. A.; DOUETTS, K.V.; CARDOSO, J.L.C. Myocardial necrosis after envenomation by the scorpion *Tityus serrulatus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.96, p.275-276, 2002.
- 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.
- BODOR, G.S.; PORTER, S.; LANDT, Y.; et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clinical Chemistry*, v.38, p.2203-2214, 1992.
- BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, v.49, p.142-158, 2007.
- BRAND, A.; KEREN, A.; KEREM, E.; et al. Myocardial damage after a scorpion sting: long-term echocardiographic follow-up. *Pediatric Cardiology*, v.9, n.1, p.59-61, 1988.
- BROBST, D.F. Pancreatic Function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997. p.353-366.
- 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, n.4, 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 escorpionicos 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.
- CAMPOS, J.A.; SILVA, O.A.; LOPEZ, M.; et al. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion sting in children. *Toxicon*, v.17, Suplemento n.1, p.1-214, 1979.
- CARDINET, G.H. Skeletal Muscle Function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997. p.407-440.
- CARDOSO, M.J.L.; SAKATE, M.; CIAMPOLINI, P.; et al. Envenomation by scorpion in dog – case report. *Journal Venom Animal Toxins incl. Tropical Disease*, n.10, v.1, p.99. 2004.
- CASTRO, M. S.; LARGURA, S. W. R.; FONTES, W. et al. *XIIIth World Congress of the International Society on Toxinology*. Purification and partial characterization of a 6.6 kDa

- neurotoxin from *Tityus fasciolatus* venom. Paris, 2000. 273p.
- CATTERAL, W.A. Neurotoxins the act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, n.20, p.15-43, 1980.
- 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.
- CORDEIRO, F.F.; SAKATE, M.; FERNANDES V.; et al. Clinical and cardiovascular alterations produced by scorpions envenomation in dogs. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. v.12, n.1, p.19-43, 2006.
- CORRÊA, M.M.; SAMPAIO, S.V.; LOPES, R.A.; et al. Biochemical and histopatological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*, v.35, p.1053-1067, 1997.
- COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J.M.; et al. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activations the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon*, v.20, n.1, p.9-16, 1982.
- COURAUD, F.; JOVER, E. Mechanism of action of scorpion toxins. In: TU, A.T. *Handbook of Natural Toxins, Insects, Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms*, v.2. New York: Marcel Dekker, 1984. p.659-678.
- CUNHA-MELO, J.R.; GONZAGA, H.M.; ALZAMORA, F.; et al. Effects of purified scorpion toxin (tityustoxin) on gastric secretion in the rat. *Toxicon*, v.21, n.6, p.843-848, 1983.
- CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579p.
- CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; et al. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratorial and anatomopathological aspects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.36, n. 1, p.67-76, 1994.
- 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.
- DIAS, M.B.; CAMPOLINA, D.; GUERRA, S.D.; et al. Escorpionismo. In: ANDRADE FILHO, A. *Toxicologia na Prática Clínica*. 1ed. Belo Horizonte: Folium, 2001. p.155-165.
- DINIZ, P.P.V.P.; SCHWARTZ, D.S.; COLLICCHIO-ZUANAZE, R.C. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dog: two cases reports. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.1, p.85-89, 2007.
- 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.
- EL-ASMAR, M.F. Metabolic effect of scorpion venom. In: TU, A. T. *Handbook of Natural Toxins, Insects, Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms*, v.2. New York:Marcel Dekker, 1984. p.551-575.
- FATANI, A.J.; FURMAN, B.L.; ZEITLIN, I.J. The involvement of plasma kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetized rabbits. *Toxicon*, v.36, n.3, p.523-536, 1998.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia Clínica Veterinária*. 2ed. Belo Horizonte: Rabelo, 1982. 279p.
- FLECKNELL, P. *Laboratory animal anaesthesia*. San Diego: Academic Press, 1996. 269p.

- FLETCHER, P.L.; FLETCHER, M.; FAINTER, L.K.; et al. Action of new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon*, v.34, n.11/12, p.1399-1411, 1996.
- FREIRE-MAIA, L.; FERREIRA, M.C. Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial produzidas pelo veneno de escorpião no cão. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.59, n.1, p.11-22, 1961.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. On the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, v.25, n.2, p.125-130, 1987.
- 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.
- FUKUHARA, Y.D.M.; REIS, M.L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; et al. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, v.41, n.1, p.49-55, 2003.
- FUKUHARA, Y.D.M.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q.C.; et al. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicology and Applied Pharmacology*, n.196, p.390-395, 2004.
- 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.
- GUERON, M.; STERN, J.; COHEN, W. Severe myocardial damage and heart failure in scorpion sting. *The American Journal of Cardiology*, v.19, p.71-726, 1967.
- GUERON, M.; YARON, R. Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting: clinicopathologic correlations. *Chest*, v.57, n.2, p.156-162, 1970.
- GUERON, M.; OVSYSCHER, I. Cardiovascular effects of scorpion venoms. In: TU, A. T. *Handbook of Natural Toxins, Insects, Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms*, v.2. New York:Marcel Dekker, 1984. p.639-657 .
- GUERON, M.; OVSYSCHER, I. What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation? *Toxicon*, v.25, n.2, p.121-124, 1987.
- 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.; MARGULIS, G.; ILIA, R.; et al. The management of scorpion envenomation, 1993. *Toxicon*, v.31, n.9, p.1071-1083, 1993.
- GUERON, M.; ILIA, R. Non-cardiogenic pulmonary oedema after scorpion envenomation: a true entity? *Toxicon*, v.34, n.4, p.393-395, 1996.
- GUYTON, A.C. Tratado de Fisiologia Médica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 548p.
- HETLAND, O.; DICKSTEIN, K. Cardiac troponins I and T in patients with suspected acute coronary syndrome: a comparative study in a routine setting. *Clinical Chemistry*, v.44, n.7, p.1430-1436, 1998.
- ISMAIL, M.; OSMAN, O.H.; PETKOVIC, D. Eletrocardiographic studies with scorpion (*Buthus minax*, L. Koch) venom. *Toxicon*, v.14, p.79-83, 1976.
- 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.
- ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, v.33, n.7, p.825-858, 1995.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. 417p.
- KANEKO, J. J. Carbohydrate metabolism e its diseases. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.45-81.

- KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical Enzymology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997. p. 303-325.
- LABARRERE, C.R.; MELO, M.M.; RIBEIRO, E.L.; et al. Perfil bioquímico cardíaco e hepático de cães inoculados com veneno de *Tityus serrulatus*. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 17, 2008, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2008a.
- LABARRERE, C.R.; MELO, M.M.; VERÇOSA JÚNIOR, D.; et al. Perfil protéico eletroforético de cães submetidos ao envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 17, 2008, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa - UFMG, 2008b.
- LABARRERE, C.R.; MELO, M.M.; RIBEIRO, E.L.; et al. Leucograma de cães submetidos ao envenenamento escorpiónico experimental. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 16, 2007. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2007a.
- LABARRERE, C.R.; PAES, P.R.O.; MERLO, F.A.; et al. Níveis plasmáticos de glicose em cães após envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 16, 2007, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2007b.
- LIRA, S.A.; ZALAMEA, P.; HEINRICH, J.N.; et al. Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermis of transgenic mice results in marked infiltration of a single class of inflammatory cells. *J. Exp. Med.* v.180, p.2039–2048, 1994.
- LONGENECKER, G.L.; LONGENECKER, H.E. *Centruroides sculpturatus* venom and platelet reactivity: possible role in scorpion venom induced defibrination syndrome. *Toxicon*, v.19, p.153-157, 1981.
- 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.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- MACHADO, J.C.; SILVEIRA FILHO, J.F. Indução de pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiónico de *T. serrulatus*. *Memórias do Instituto Butantan*, v.40/41, p.1-9, 1976/1977.
- MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M.E.S.; AMARAL, C.F.S.; et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, v.37, n.8, p.1155-1164, 1999.
- MATTHEW, N.L.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. *Fundamentos de Fisiologia*. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 832p.
- 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.
- MEKI, A.R.A.M.; MOHAMED, Z.M.M.; EL-DEEN, H.M.M. Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 in scorpion envenomed children. *Toxicon*, v.41, p.129-137, 2003.
- MELO, M.M.; SILVA JÚNIOR, P.G.P.; LAGO, L.A.; et al. Envenenamento botrópico. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.44, p.59-79, 2004a.
- MELO, M.M.; SILVA JÚNIOR, P.G.P.; VERÇOSA JÚNIOR, D.; et al. Escorpionismo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.44, p.90-97, 2004b.
- MERLO, F.A.; LABARRERE, C.R.; RIBEIRO, E.L.; et al. Eletrocardiograma de cães submetidos ao envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. In: SEMANA DE INICIAÇÃO

- CIENTÍFICA DA UFMG, 17, 2007, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2007a.
- MERLO, F.A.; MELO, M.M.; RIBEIRO, E.L.; et al. Pressão arterial em cães submetidos ao envenenamento escorpiónico experimental. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 16, 2007. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2007b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, 2001.
- MURTHY, K.R.K.; HASE, N.K. Scorpion envenoming and the role of insulin. *Toxicon*, v.32, n.9, p.1041-1044, 1994.
- MURTHY, K.R.K.; HAGHNAZARI, L. The blood levels of glucagon, cortisol and insulin following the injection of venom by the scorpion (*Mesobuthus tamulus concanesis*, POCOCK) in dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.5, n.1, p.47-55, 1999.
- MURUGESAN, S.; RADHAKRISHNA MURTHY, K.; NORONHA, O.P.D.; et al. 99m Tc-scorpion venom: labeling, biodistribution and scintimaging. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. v.5, p.35-46, 1999.
- NASCIMENTO JÚNIOR, E.B.; COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.45, n.7, p.585-593, 2005.
- NISHIGAWA, A.K.; CARICATI, C.P.; LIMA, M.L.; et al. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*, v.32, p.989-998, 1994.
- NORMANN, S.J.; PRIEST, R.E.; BENDITT, E.P. Electrocardiogram in the normal rat and its alteration with experimental coronary occlusion. *Circulation Research*, v.9, p.282-287, 1961.
- NOVAES, G.; CATANZARO, O. L.; BERVALDO, 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.
- NUNAN, E.A.; MORAES, M.F.D.; CARDOSO, V.N.; et al. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sciences*, v.73, p.319-325, 2003.
- NUNAN, E.A.; ARYA, V.; HOCHHAUS, G.; et al. Age effects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.385-390, 2004.
- OOI, D.S.; ISOLATO, P.A.; VEINOT, J.P. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clinical Chemistry*, v.46, n.3, p.338-344, 2000.
- 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.
- PLAZZI, M.I.A.; STUTZ, W.H.; PLAZZI SOBRINHO, A. Acidentes Escorpiónicos em Ituiutaba, Minas Gerais, Brasil: Um Estudo Epidemiológico Retrospectivo. 2000. <<http://www.escorpiao.vet.br/ituiutaba.html> > - Acessado em 16/11/08.
- 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, n.5, p.556-566, 2006.
- PESSINI, A.C.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D.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.

- PETRICEVICH, V.L.; PEÑA, C.F. The dynamics of cytokines and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*, v.11, p.173-180, 2002.
- PETRICEVICH, V.L.; CRUZ, A.H.; CORONAS, F.I.V.; et al. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom play an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, v.50, n.5, p.666-675, 2007.
- PIMENTEL, E.B. *Estabilidade temporal do registro do eletrocardiograma em ratos com infarto do miocárdio*. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- 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.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; et al. *Afip laboratory methods in histotechnology*. Washington: AM Registry of Pathology, 1992. 278p.
- RAAB, W. Key position of catecholamines in functional and degenerative cardiovascular pathology. *The American Journal of Cardiology*, v.5, n.5, p.571-578, 1960.
- 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.; 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, p.135-143, 2009.
- RIBEIRO, E. L. *Avaliação clínica e laboratorial de cães submetidos ao envenenamento escorpiónico experimental por Tityus serrulatus Lutz e Melo, 1922*. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SANKARAN, H.; DEVENEY, C.W.; BARTHOLOMEW, C.; et al. Action of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on pancreatic insulin secretion. *Biochemical Pharmacology*, v.32, n.6, p.1001-1004, 1983.
- 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.
- SILVA, F.A.; MELO, M. M.; LABARRERE, C.R.; et al. Perfil hematológico de ratos submetidos ao envenenamento escorpiónico experimental por *Tityus fasciolatus*. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 17, 2008, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2008.
- 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.
- SOFER, S.; GUERON, M.; WHITE, R.M.; et al. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, v.34, n.3, p.389-392, 1996.
- 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.

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

THRALL, M.A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004. 561p.

VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V.L.; BENDHACK, L.M.; et al. Effects of voltagegated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.141, n.4, p.85-92, 2005.

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.

TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography interpretation and treatment*. 3ed. Philadelphia: Lea & Sebiger, 1992. 470p.

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.

YARON, R.; BRAUN, K.; Cardiovascular effects of scorpion venom, morphological changes in the myocardium. *Toxicon*, v.8, n.1, p.41-46, 1970.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 171/2007**, relativo ao projeto intitulado "***Tityus fasciolatus: biocinética e ação do veneno sobre o perfil hematológico e bioquímico de camundongos***", que tem como responsável **Marília Martins Melo**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 03/2008**.

Este certificado expira-se em **12/ 03 / 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 171/2007**, related to the project entitled "***Tityus fasciolatus: body distribution and venom's action in hematological and biochemical profile in mice***", under the supervision of **Marília Martins Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 12, 2008**.

This certificate expires in **March 12, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Março de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

